

03088

1  
2ij

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL  
Y DE POSGRADO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CLONACION Y ANALISIS DE SECUENCIA DE LOS GENES *ccmA* Y *ccmB*  
INVOLUCRADOS EN LA  
EXPRESION DE LOS CITOCROMOS DE TIPO C  
EN *Rhizobium etli*.

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA

M. en IBB. GERMAN RUBEN AGUILAR GUTIERREZ.

Cuernavaca, Morelos, Febrero de 1997.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis 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.

**EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DEL  
DR. MARIO SOBERON CHAVEZ, PERTENECIENTE AL DEPTO. DE  
BIOLOGIA MOLECULAR DE PLANTAS, DEL INSTITUTO DE BIOTEC-  
NOLOGIA DE LA UNAM.**

**ESTE TRABAJO FUE ASESORADO POR EL COMITE TUTORIAL  
INTEGRADO POR:**

**DR. MARIO SOBERON CHAVEZ    TUTOR PRINCIPAL**

**DR. ENRIQUE MORETT SANCHEZ    CO-TUTOR**

**DR. JOSE EDGARDO ESCAMILLA MARVAN    CO-TUTOR**



# Instituto de Biotecnología

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

## PROYECTO ACADÉMICO DE ESPECIALIZACIÓN, MAESTRIA Y DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

**M. en IBB. Germán Rubén Aguilar Gutiérrez  
P r e s e n t e.**

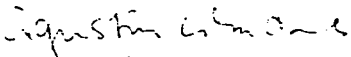
Por este conducto me permito informarle que la Comisión Académica acordó asignarle el siguiente jurado de examen para obtener el grado de Doctor en biotecnología.

|            |                                      |
|------------|--------------------------------------|
| Presidente | Dr. Miguel Lara Flores               |
| Secretario | Dr. Mario Soberón Chávez             |
| Vocal      | Dr. José Edgardo Escamilla Marván    |
| Vocal      | Dra. Gloria Soberón Chávez           |
| Vocal      | Dra. Guadalupe Espin Ocampo          |
| Suplente   | Dr. Lorenzo Segovia                  |
| Suplente   | Dra. Ma. del Carmen Quinto Hernández |

Sin mas por el momento me es grato enviarle un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E**

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cuernavaca, Mor. a 12 de noviembre de 1996

  
Dr. Agustín López Munguía Canales  
Coordinador de Biotecnol



TELS (52)(73) 114900, 114690 Y 114700 FAX (52)(73) 172388  
APDO 510-3, CUERNAVACA, MORELOS 62250 MEXICO

## **AGRADECIMIENTOS**

**Este trabajo se realizó en el Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología, UNAM, bajo la dirección del Dr. Mario Soberón Chávez, a quien quiero agradecer por su asesoramiento y discusión a lo largo de todo el Proyecto de Investigación.**

**A los miembros de mi Comité Tutorial por todas esas discusiones acerca del Proyecto, sus sugerencias y adecuadas observaciones que coadyuvaron a su finalización.**

**Quiero agradecer especialmente a Oswaldo López Gutiérrez, Roberto Meza Romero, María Luisa Tabche Barrera, Juan Miranda Ríos y Claudia Morera Román quienes me estimularon y ayudaron a resolver muchos de los problemas presentados durante el desarrollo de este trabajo.**

**A CONACyT así como a PADEP y DGAPA, UNAM que otorgaron las becas correspondientes para la realización de estos estudios.**

**A todas aquellas personas que de una u otra manera estuvieron relacionadas con el presente trabajo.**

**A mis queridos Padres.**  
**A mis hermanos y hermana.**  
**A Anita.**

# INDICE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>RESUMEN</b>  |           |
| <b>INTRODUCCION</b> .....   | <b>1</b>  |
| <b>FIJACION BIOLOGICA DE NITROGENO</b> .....                          | <b>1</b>  |
| Sensibilidad de la Nitrogenasa al Oxígeno.                            |           |
| Estrategias para Limitar el Daño a la Nitrogenasa.                    |           |
| Barreras Físicas: Arquitectura de los Nódulos Fijadores de Nitrógeno. |           |
| Estrategias Fisiológicas y Bioquímicas: Protección Respiratoria.      |           |
| Producción de Energía en Bajas Tensiones de Oxígeno.                  |           |
| <b>SISTEMAS RESPIRATORIOS</b> .....                                   | <b>8</b>  |
| Respiración Bacteriana.   |           |
| Componentes de las Cadenas Respiratorias Bacterianas.                 |           |
| Citocromos.   |           |
| Flavoproteínas.   |           |
| Quinonas.   |           |
| <b>TRANSPORTE DE ELECTRONES EN Rhizobiaceas</b> .....                 | <b>19</b> |
| Vida Libre.   |           |
| Simbiosis.  |           |
| Cadenas Respiratorias de <i>Rhizobium etli</i> .                      |           |
| <b>TRANSPORTADORES ABC</b> .....                                      | <b>26</b> |
| Organización de Dominio.  |           |
| Dominios Transmembranales.  |           |
| Dominios de Unión de ATP.   |           |
| Proteínas de Unión Periplásmica.                                      |           |
| Especificidad por el Substrato.                                       |           |
| Papel del ATP.  |           |
| <b>BIOGENESIS DE CITOCROMOS DE TIPO c</b> .....                       | <b>36</b> |
| Exportación de Apoproteína y del Grupo Hemo en Bacterias.             |           |
| Corte proteolítico del Péptido Señal.                                 |           |
| Plegamiento y Ensamble.   |           |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ANTECEDENTES.....</b>  | <b>47</b> |
| <b>Aislamiento y Caracterización de Mutantes de <i>R. etli</i> con Alteraciones en la Expresión de citocromos y la Fijación de Nitrógeno.</b> |           |
| <b>OBJETIVO.....</b>  | <b>49</b> |
| <b>Objetivo General.</b>  |           |
| <b>Objetivo Específico.</b>   |           |
| <b>RESULTADOS ADICIONALES.....</b>  | <b>51</b> |
| <b>Material y Métodos.</b>  |           |
| <b>Discusión Resultados Adicionales.</b>  |           |
| <b>DISCUSION.....</b>   | <b>61</b> |
| <b>BIBLIOGRAFIA.....</b>  | <b>71</b> |
| <b>ARTICULO ANEXO.</b>  |           |



## RESUMEN

En el presente trabajo se describe el análisis de la secuencia de dos genes de *Rhizobium etli* (*ccmA* y *ccmB*), los cuales, en otras especies bacterianas se cree participan en el transporte del grupo hemo al periplasma. La región de DNA caracterizada fué aislada por experimentos de complementación de una cepa mutante de *R. etli* (CFN4201) inducida por una inserción del transposón Tn5*mob*, la cual se encuentra afectada en la producción de los citocromos de tipo c. Mediante el análisis de la secuencia de esta región se identificaron tres marcos abiertos de lectura (ORFs), dos de éstos fueron identificados como los genes *ccmA* y *ccmB*. La secuencia protéica deducida de *ccmA*, mostró una alta homología con los dominios que son capaces de unir ATP de diferentes sistemas de transporte de tipo ABC, mientras que *ccmB* codifica para una proteína hidrofóbica contituida por múltiples segmentos con estructura de  $\alpha$ -hélice con una longitud lo suficientemente larga como para atravesar la membrana, y que probablemente se asocie con el producto de *ccmA*. La inserción del Tn5*mob* en la cepa CFN4201 fué localizada en el extremo carboxilo terminal de la proteína CcmB. El mapeo de restricción del fragmento *EcoRI* que contiene la inserción del transposón Tn5*mob* mostró que ésta involucra una delección de aproximadamente 1.5 kb. La mutagenesis de la región silvestre con un transposón mini-Mu y el análisis por complementación mostraron que la mutación en el gene *ccmB*, y no la delección, fué la responsable del fenotipo de la cepa CFN4201 y que los genes *ccmA* y *ccmB* son unidades de transcripción independientes. En este trabajo también se encontró que la región que se encuentra corriente abajo del gene *ccmB* está reiterada dos veces; una cerca de locus cromosomal *ccmA-ccmB*, mientras que la otra se encuentra en el plásmido e. Finalmente, el análisis bioquímico de las membranas de la cepa CFN4201 demostró niveles bajos pero detectables del apocitocromo  $c_1$ , el cual no contiene unido el grupo hemo. Este dato sugiere que la unión del grupo hemo a la apoproteína ocurre después de que la forma apo del citocromo  $c_1$  es translocada a través de la membrana hacia el periplasma.

## SUMMARY

In this work we describe the sequence analysis of two *Rhizobium etli* genes (*ccmA* and *ccmB*) which are believed to participate in the transport of the haem moiety to the periplasm in other bacterial species. The characterized DNA region was isolated by complementation of a *R. etli* Tn5*mob* induced mutant (CFN4201) which was affected in the production of c-type cytochromes. Sequence analysis of this region identified three open reading frames, two were identified as the *ccmA* and *ccmB* genes. The predicted protein sequence of *ccmA* showed significant homology with ATP binding proteins of the ABC type transporter systems, while *ccmB* encodes for a hydrophobic protein probably associated with the *ccmA* gene product. The Tn5*mob* insertion in CFN4201 strain was located in the carboxy terminus of CcmB. Restriction mapping of the *EcoRI* fragment containing the Tn5*mob* insertion showed that it involved a deletion of approximately 1.5 kb. Mutagenesis of the wild type region with a miniMu transposon and complementation analysis showed that the mutation in *ccmB*, and not the deletion, was responsible for the phenotype of CFN4201 strain and that *ccmA* and *ccmB* are independent transcription units. We found that a region located downstream of *ccmB* is reiterated twice, one near the chromosomal *ccmA-ccmB* locus while the second in plasmid e. Finally, CFN4201 membranes had detectable levels of c<sub>1</sub> apoprotein which did not contained bound haem. This data could suggest that the haem binding to the apoprotein occurs after the translocation of the apo form of c<sub>1</sub> to the membrane.

Vo.Bo.

  
Dr. Mario Soberón Chávez  
DIRECTOR DE TESIS

## INTRODUCCION

*Rhizobium etli* (anteriormente denominada *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*) es una bacteria gram-negativa que vive normalmente en el suelo y que es capaz de formar una asociación simbiótica con las raíces de la planta del frijol (*Phaseolus vulgaris*). Este tipo de asociación da origen a un órgano conocido como nódulo; en donde se lleva a cabo la fijación de nitrógeno. Durante el establecimiento de la simbiosis, las bacterias atraviesan un proceso de diferenciación a nivel morfológico y metabólico, y es precisamente la forma diferenciada denominada bacteroide, la que fija nitrógeno atmosférico bajo condiciones fisiológicas de microaerofilia. Esta condición es requerida para que el complejo enzimático de la nitrogenasa que es sensible a oxígeno, pueda llevar a cabo la fijación de nitrógeno (Gallon, 1992).

Durante la simbiosis entre *Rhizobium* y la planta, ésta última provee a los bacteroides de sustratos de carbono para garantizar el poder energético y reductor necesario para la fijación de nitrógeno, a la vez de que la planta requiere de carbono y poder energético para poder asimilar el amonio el cual es el producto de la fijación de nitrógeno (Vence y Heichel, 1991).

## FIJACION BIOLOGICA DEL NITROGENO.

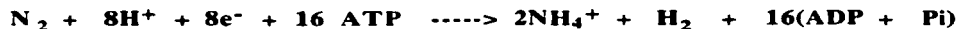
Sólo algunos organismos procariontes son capaces de fijar nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ). Las bacterias fijadoras de nitrógeno (diazótrofas) pueden fijar en simbiosis (usualmente, más no siempre, con plantas superiores) o pueden fijar en vida libre, e incluyen representantes de las arqueobacterias y las eubacterias. Son ubicuas en aguas y tierras y exhiben varios estilos de vida. Así, tenemos diazótrofos anaerobios, microaerobios, anaerobios facultativos y aerobios estrictos; algunos son quimiótrofos mientras otros son heterótrofos.

La conversión biológica de dinitrógeno a amonía está catalizada por el sistema enzimático de la nitrogenasa presente en organismos fijadores de nitrógeno. La nitrogenasa convencional consiste de dos proteínas; la proteína hierro (Fe-proteína) y la proteína hierro-molibdeno (FeMo-proteína), que juntas median la reducción dependiente de ATP del dinitrógeno. La reducción del dinitrógeno por la nitrogenasa se lleva a cabo en tres reacciones: la reducción de la Fe-proteína por acarreadores de electrones como las flavodoxinas; la transferencia dependiente de ATP de

electrones de la Fe-proteína a la FeMo-proteína, con una estequiometría mínima de dos moléculas de ATP-Mg<sup>2-</sup> hidrolizado por electrón transferido y la transferencia de un electrón y un protón al sustrato, el cual muy probablemente está unido al cofactor FeMo de la FeMo-proteína (Rees *et al.*, 1993).

Las dos proteínas de la nitrogenasa están compuestas por un total de tres diferentes tipos de subunidades y contienen tres tipos diferentes de centros metálicos. La Fe-proteína es un dímero de dos subunidades idénticas (codificadas por el gene *nifH*) que coordinan de manera simétrica un cluster 4Fe:4S. Las propiedades de unión de nucleótidos de la Fe-proteína pura indican que está involucrada en el acoplamiento de la hidrólisis de ATP a la transferencia de electrones. La FeMo-proteína es un tetrámero  $\alpha_2\text{-}\beta_2$  (cuyas subunidades están codificadas por los genes *nifD* y *nifK*, respectivamente). Asociados a la FeMo-proteína se encuentran dos tipos de centros metálicos; el cofactor FeMo, el cual se cree es el sitio de reducción del sustrato, y el cluster P que pudiera funcionar en la transferencia de electrones entre la Fe-proteína y el cofactor FeMo (Rees *et al.*, 1993).

Recientemente, se han identificado dos diferentes nitrogenasas independientes de Mo. Estas enzimas se han estudiado en la bacteria aeróbica *Azotobacter*, aunque hay evidencia circunstancial de que están presentes en otros diazótrofos. La primera de ellas, la nitrogenasa de vanadio o V-nitrogenasa, consiste de una proteína vanadio-ferro y una proteína hierro, mientras que la tercera nitrogenasa (a menudo llamada la nitrogenasa alternativa o nitrogenasa 3) contiene sólo cantidades traza de Mo y V. Ambas proteínas de esta nitrogenasa son Fe-proteínas (Gallon, 1992). La siguiente ecuación expresa la estequiometría de la reacción de la fijación de nitrógeno:



La reacción requiere de una fuente de electrones y está acompañada por la hidrólisis de ATP-Mg<sup>2-</sup> a ADP-Mg<sup>2-</sup> y Pi. Las estimaciones actuales indican que se requiere hidrolizar 2 moléculas de ATP por electrón donado al N<sub>2</sub>, es decir, 16 moléculas de ATP por molécula de N<sub>2</sub> fijada (Gallon, 1992). Es por esto que para fijar nitrógeno, los diazótrofos deben poseer una nitrogenasa activa y ser capaces de proporcionar a la enzima con ATP y electrones provenientes del metabolismo celular. Los electrones generalmente son proporcionados por una flavodoxina reducida o una ferredoxina reducida.

## SENSIBILIDAD DE LA NITROGENASA AL OXIGENO.

Una propiedad única de la fijación biológica del nitrógeno es su extrema sensibilidad a la inactivación por oxígeno ( $O_2$ ). La enzima nitrogenasa pura, sin importar su origen, es inactivada rápida y permanentemente al exponerla al  $O_2$ . De aquí que la fijación de  $N_2$  y el  $O_2$  sean incompatibles. Sin embargo, el  $O_2$  está presente en la atmósfera terrestre y, para los diazótrofos que son aerobios estrictos, es esencial para la supervivencia. Además, algunos diazótrofos producen  $O_2$  por medio de la fotosíntesis (Gallon, 1992).

*In vitro*, la nitrogenasa es irreversiblemente inactivada por el  $O_2$ . La inhibición es nocompetitiva con respecto a la reducción de  $N_2$  ( $k_i=0.014$  atm) y la hidrólisis de ATP ( $k_i=0.03$  atm), pero es competitiva con respecto a la donación de electrones de la flavodoxina ( $k_i=0.007$  atm). Ludden y Burris (1979) sugirieron que el  $O_2$  podría inhibir la reducción de la nitrogenasa en el sitio que recibe los electrones de la flavodoxina reducida.

Tanto la Fe-proteína como la FeMo-proteína son inactivadas por  $O_2$  con vidas medias de decaimiento de 45 s y 10 min., respectivamente. En el caso de la FeMo-proteína, el  $O_2$  causa un cambio en los estados de oxidación de los centros Fe dentro de la molécula, el cual, después de una exposición prolongada, resulta en la pérdida de Fe, Mo y S de la proteína. Los componentes de las nitrogenasas independientes de Mo son aún más sensibles a la inactivación por  $O_2$ .

En muchos diazótrofos, el  $O_2$  tiene un efecto benéfico sobre la fijación de  $N_2$  *In vivo*. El  $O_2$  al ser el aceptor terminal de electrones de la respiración aeróbica, estimula la fosforilación oxidativa y por lo tanto el suministro de ATP para la síntesis de la nitrogenasa y su actividad. Sin embargo, esta estimulación está en contra de la sensibilidad al  $O_2$  de la nitrogenasa. Consecuentemente, para la mayoría de los diazótrofos, una gráfica de la fijación de  $N_2$  contra concentración de  $O_2$  muestra una curva en forma de campana. En concentraciones subóptimas de  $O_2$ , la introducción de más  $O_2$  estimula la fijación de  $N_2$  a través de un mayor suministro de ATP. Sin embargo, a concentraciones supraóptimas de  $O_2$ , el  $O_2$  adicional inhibe la fijación de  $N_2$  a través de una inactivación incrementada de la nitrogenasa. *In vivo*, la nitrogenasa no es el único blanco potencial de la inactivación por  $O_2$ . Por ejemplo, los donadores de electrones a la nitrogenasa tales como la flavodoxina, la ferredoxina y la

hidrogenasa (en el caso de las bacterias que cuenten con esta enzima) pueden sufrir daño por el  $O_2$  (Gallon, 1992).

## **ESTRATEGIAS PARA LIMITAR EL DAÑO POR OXIGENO A LA NITROGENASA.**

En la práctica, el  $O_2$  y la fijación de nitrógeno coexisten por lo que los diazótrofos tienen que reconciliar lo incompatible: mantener una nitrogenasa activa en presencia de  $O_2$ . Como consecuencia, durante la evolución se han seleccionado una serie de estrategias que impiden o limitan el contacto entre la nitrogenasa y el  $O_2$  y que aseguran que cualquier contacto que ocurra resulte en una pérdida mínima de la habilidad de fijar  $N_2$ . La mayoría de los diazótrofos fijan  $N_2$  bajo atmósferas que contienen  $O_2$  en concentraciones menores a las presentes en el aire (condiciones microaeróbicas). Aún aquellos que pueden fijar  $N_2$  en condiciones aeróbicas usualmente muestran una actividad óptima bajo condiciones microaeróbicas y son afectados adversamente por la exposición al  $O_2$  en concentraciones supraatmosféricas.

Se han encontrado diferentes métodos que utilizan los diazótrofos para contender con el  $O_2$ . Frecuentemente un sólo diazótrofo emplea más de un método, y algunas estrategias son comunes a varios diazótrofos. Estas diferentes estrategias se han clasificado como barreras físicas y estrategias fisiológicas y bioquímicas (Gallon, 1992).

### **BARRERAS FISICAS**

#### **ARQUITECTURA DE LOS NODULOS FIJADORES DE NITROGENO**

Los rhizobia que fijan  $N_2$  simbióticamente con su leguminosa hospedera están localizados dentro de nódulos que se desarrollan en las raíces de esas plantas. Aunque la morfología de los nódulos puede variar de planta a planta, los bacteroides (la forma diferenciada de los rhizobia que es capaz de fijar  $N_2$ ) ocupan células vegetales infectadas que están rodeadas de tejido cortical no infectado. Dentro de los bacteroides se mantiene una concentración intracelular baja de  $O_2$ , debido a la presencia de una barrera a la difusión de  $O_2$  que reside en la corteza interna del nódulo. La corteza interna está formada por una capa de células con

paredes celulares gruesas y con numerosos espacios gaseosos intercelulares entre ellas. La barrera a la difusión de  $O_2$  en los nódulos no es estática, pues se ha visto que responde a las condiciones ambientales que pudieran directa o indirectamente dañar a la nitrogenasa.

Para sostener una velocidad óptima de fijación de nitrógeno, los bacteroides requieren de  $O_2$  para la producción de ATP vía respiración. Sin embargo, si sólo actuara la difusión simple del  $O_2$ , la capa más externa de bacteroides sería la única que podría respirar. La entrega de  $O_2$  a la masa entera de células infectadas la hace la proteína leghemoglobina (Appleby, 1984). Dentro de la zona infectada, el  $O_2$  libre está presente en una concentración de entre 10 y 40 nM, minimizando la inactivación por  $O_2$  de la nitrogenasa en los bacteroides (Layzell *et al.*, 1993). Sin embargo, a través de la acción de la leghemoglobina, se asegura un abastecimiento continuo de  $O_2$  el cual permite una respiración eficiente aunque limitada por  $O_2$  (Bergersen, 1984).

## **ESTRATEGIAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS.**

### **PROTECCIÓN RESPIRATORIA.**

Cualquier reacción metabólica que reduzca la concentración intracelular de  $O_2$  podría, en teoría, facilitar la fijación de  $N_2$ . Por ejemplo, el consumo de  $O_2$  por medio de respiración que produce ATP vía la fosforilación oxidativa. Muchos diazótrofos responden a las condiciones de limitación de  $N_2$  produciendo oxidasas terminales de alta afinidad (Bergersen, 1984). Sin embargo, sólo en ciertos diazótrofos aerobios existe evidencia de que el consumo respiratorio de  $O_2$  tiene un papel específico de proteger a la nitrogenasa de la inactivación por  $O_2$ , independientemente de cualquier papel en la generación de ATP.

En *Azotobacter vinelandii* se ha estudiado el fenómeno de la protección respiratoria. Esta bacteria (que es un aerobio estricto) tiene una cadena respiratoria ramificada que contiene al menos dos oxidasas terminales llamadas citocromo bd y citocromo  $bo_3$  (Hoffman *et al.*, 1979). El complejo citocromo d tiene una baja afinidad por  $O_2$ , mientras que el citocromo  $bo_3$  es una oxidasa con una alta afinidad y por lo tanto, es la oxidasa usada en microaerobiosis. La reducción del  $O_2$  por el citocromo bd, por otra parte, ocurre a una gran velocidad. Bajo condiciones aeróbicas, esta oxidasa es responsable de reducir rápidamente casi todo el  $O_2$  que difunde por la membrana citoplásmica, manteniendo al citoplasma

anaeróbico. El papel del complejo citocromo d en la protección respiratoria ha sido documentado por métodos genéticos. Kelly *et al.*, (1990) han aislado mutaciones inducidas por el transposón Tn5 en los genes de las subunidades I y II del complejo citocromo d (*cydA* y *cydB*). Al contrario de lo que pasa en la cepa silvestre, las correspondientes mutantes fueron incapaces de crecer diazotróficamente en aire, mientras que no se afectó su crecimiento aeróbico en medio conteniendo amonio como fuente de nitrógeno. Cuando la concentración de O<sub>2</sub> se disminuyó a 1.5%, las mutantes crecieron como la cepa silvestre con N<sub>2</sub> o NH<sub>4</sub><sup>+</sup> como fuente de nitrógeno. Esto muestra claramente que el complejo citocromo d es esencial para la fijación de nitrógeno en concentraciones altas de O<sub>2</sub> tales como las que se encuentran en el aire, mientras que no es esencial para el metabolismo energético que sostiene el crecimiento aeróbico usando una fuente de nitrógeno fijado. La conclusión es que el complejo citocromo d brinda una protección respiratoria a la nitrogenasa por medio de su alta velocidad respiratoria. La oxidasa alternativa (citocromo bo<sub>3</sub>) es la encargada de la conservación de energía respiratoria en la mutantes *cyd*<sup>-</sup>.

En diferentes especies de *Rhizobium* existe evidencia que sugieren la existencia de protección respiratoria. Los bacteroides de *B. japonicum* tienen dos sistemas de oxidasa de diferente afinidad por el O<sub>2</sub>, pero sólo el de alta afinidad parece estar acoplado eficientemente a la síntesis de ATP. Por otra parte, *Rhizobium* spp, el cual es capaz de fijar nitrógeno en vida libre, aumenta su respiración en tensiones altas de oxígeno. Adicionalmente, se ha observado que las raíces de planta de soya disminuyen su actividad de nitrogenasa después de un breve tratamiento de con 1 atm. de O<sub>2</sub>. Sin embargo, esta actividad es parcialmente restaurada en un tiempo muy corto (Bergersen, 1984), por lo que se sugirió la existencia un mecanismo de protección al O<sub>2</sub> en bacteroides. Con base en estos resultados se propuso que los sistemas de baja afinidad pueden funcionar como un sistema de protección similar al reportado para *A. vinelandii*. A altas concentraciones de O<sub>2</sub> (más de 1 µM) la respiración de los bacteroides de *B. japonicum* está desacoplada para la síntesis de ATP. Por lo que se ha propuesto que el transporte de electrones desacoplado funciona como "protección respiratoria", manteniendo baja la concentración intracelular de O<sub>2</sub>, para impedir la inactivación de la nitrogenasa. El control de síntesis de ATP por oxígeno en los organismos fijadores de nitrógeno se ha explicado en términos de la existencia de un sistema respiratorio ramificado, con un ramal que tiene una oxidasa más afín por el O<sub>2</sub> y otra(s) ineficiente(s) o menos afín(es) por el oxígeno (Bergersen, 1984).



## PRODUCCION DE ENERGIA EN BAJAS TENSIONES DE OXIGENO.

El diazótrofo *Klebsiella pneumoniae* es el paradigma que explica el fenómeno de la producción respiratoria de energía a concentraciones bajas de  $O_2$  para sostener la actividad de la nitrogenasa. Esto suena sorprendente, ya que esta enterobacteria es un anaerobio facultativo que se cree que fija  $N_2$  sólo bajo condiciones anaeróbicas estrictas y que genera energía para este proceso vía metabolismo fermentativo. Mientras lo anterior es correcto, Hill *et al.*, (1990) han demostrado que si se alimenta a la bacteria con una fuente de carbono no fermentable también puede reducir acetileno eficientemente en condiciones microaeróbicas, y que la ubiquinol oxidasa llamada complejo citocromo d es esencial para esta actividad. Hill *et al.*, (1990) introdujeron todo el cluster de genes *nif* de *K. pneumoniae* en una cepa silvestre de *Escherichia coli* y una cepa mutante *cyd<sup>-</sup>*, y crecieron estas cepas en medio mínimo con lactato/formato y en concentraciones de  $O_2$  de 0 a 6 kPa. No se detectó actividad de nitrogenasa en la cepa *cyd<sup>-</sup>nif<sup>+</sup>*, mientras que la cepa *cyd<sup>+</sup>nif<sup>+</sup>* mostró un incremento en la actividad de la nitrogenasa en tensiones de  $O_2$  altas, alcanzando un máximo de actividad a los 3 kPa  $pO_2$ . Tensiones mayores de  $O_2$  a 6 kPa fueron incompatibles con la actividad de nitrogenasa. Es importante saber que *E. coli* y *K. pneumoniae* poseen una cadena respiratoria que consta de dos ramas que terminan con ubiquinol oxidasas de los tipos bd y bo (citocromos d y bo<sub>3</sub>, respectivamente; Smith *et al.*, 1990, Puustinen *et al.*, 1991). El complejo citocromo d es una oxidasa de alta afinidad mientras que el citocromo bo<sub>3</sub> es una oxidasa de baja afinidad (al revés de lo que sucede en *A. vinelandii*). El experimento anterior claramente demuestra que el complejo citocromo d sostiene la fijación de nitrógeno por medio de la producción de energía en condiciones microaeróbicas. En tensiones bajas de  $O_2$ , la oxidasa bo (de baja afinidad) si es que se expresa en estas condiciones, es muy ineficiente para compensar la falta del complejo citocromo d y también es incapaz de brindar protección respiratoria a la nitrogenasa por arriba de 6 kPa de  $pO_2$ . En conclusión, esta especie enterobacteriana se puede usar como modelo para simular la situación que prevalece en virtualmente todos los diazótrofos aerobios y microaerobios: la conservación de energía ocurre a concentraciones de oxígeno que son muy bajas para no inactivar la nitrogenasa pero suficientemente altas para permitir que una oxidasa de alta afinidad funcione eficientemente. La respiración en ambientes microaeróbicos también juega un papel importante en la fijación de nitrógeno que ocurre en los bacteroides que habitan las raíces de las leguminosas, como se discutió con anterioridad.

## SISTEMA RESPIRATORIO

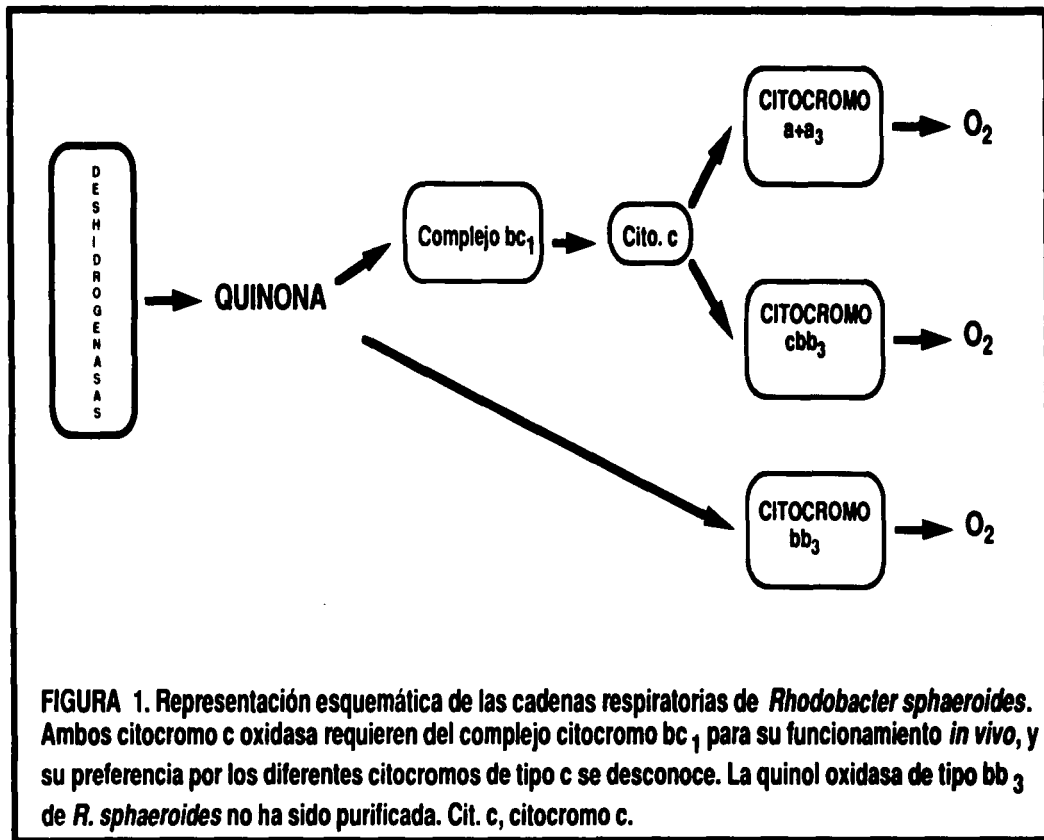
### Respiración bacteriana.

En terminos generales la respiración bacteriana puede definirse como la transferencia termodinamicamente espontánea de equivalentes reductores, a partir de un reductor a un oxidante a través de una serie de componentes redox unidos predominantemente a membrana citoplasmática denominados en conjunto: cadena respiratoria. Este proceso está acompañado de un cambio en energía libre, el cual depende de la diferencia de potencial del par redox. La transferencia de electrones de alta energía por los complejos respiratorios, está acoplada a la translocación vectorial de protones al lado externo de la membrana. Esto permite crear un potencial electroquímico de protones que puede ser utilizado para sintetizar ATP (Jones 1988).

### Componentes de las cadenas respiratorias bacterianas.

La cadena de transporte de electrones bacteriana está constituida por diferentes componentes que asemejan a la cadena respiratoria mitocondrial. Sin embargo, a diferencia de los sistemas eucarióticos que solo poseen una sola citocromo c oxidasa, los sistemas respiratorios bacterianos se encuentran ramificados, en un número distinto de oxidasas terminales. Actualmente ha sido ampliamente reconocido que todas la bacterias aeróbicas poseen una multiplicidad de oxidasas respiratorias (Anraku, 1988). En mucho de los casos han sido analizadas espectroscópicamente, bioquímicamente y genéticamente. Las diferentes oxidasas terminales permiten a la célula optimizar sus sistemas respiratorios para enfrentar las demanda de una variedad de condiciones ambientales. La cantidad de una oxidasa en particular presente en la membrana citoplasmática de la bacteria dependen de las condiciones de crecimiento (García-Horsman *et al.*, 1994a).

El esquema más representativo del flujo de electrones a través de un sistema respiratorio ramificado es el de la bacteria púrpura no sufurosa *Rhodobacter sphaeroides* (Figura 1), la cual puede crecer aeróbicamente, anaeróbicamente o fotosintéticamente y posee tres distintas oxidasas terminales, dos de las cuales utilizan al citocromo c como substrato (García-Horsman *et al.*, 1994b; Hosler *et al.*, 1992) mientras que la restante es una quinol oxidasa (Yun *et al.*, 1994). Los substratos como el NADH o el succinato son oxidados por deshidrogenasas específicas, las



cuales a su vez reducen a la poza de quinona que se encuentra en la membrana citoplásmica. El resultante quinol difunde a través de la bicapa lipídica en donde es luego oxidada por una de las tres oxidasas. La partición del flujo de electrones entre estas tres oxidasas depende de la cantidad de cada una de estas oxidasas presente en la membrana y también de los parámetros cinéticos ( $K_m$  y  $V_{max}$ ) y de las concentraciones del quinol y del oxígeno. Las dos citocromos c oxidasa y (muy probablemente) la quinol oxidasa son miembros de una superfamilia de oxidasas hemo-Cu. El citocromo c oxidasa tipo a+a<sub>3</sub> predomina cuando las células son crecidas aeróbicamente con una alta tensión de oxígeno (Hosler *et al.*, 1992). El citocromo c oxidasa alternativo es la oxidasa de tipo cbb<sub>3</sub>, la cual está presente en codiciones de microaerofilia y cuando las células se encuentran creciendo fotosintéticamente. Presumiblemente el citocromo cbb<sub>3</sub> tiene una alta afinidad por el oxígeno. Sin embargo, aun no ha sido demostrado. La quinol oxidasa es suficiente para soportar el crecimiento aeróbico en cepas mutantes que carecen del complejo bc<sub>1</sub> (Figura 1) (Yun *et al.*, 1990).

El mismo esquema respiratorio básico (Figura 1) parece ser aplicado a *Paracoccus denitrificans* (la quinol oxidasa puede ser un citocromo de tipo ba<sub>3</sub>) (Ludwig 1992) y con algunas variaciones a *Rhodobacter capsulatus* (Gray *et al.*, 1994), *Bradyrhizobium japonicum* (Bott *et al.*, 1990, 1992; Preisig *et al.*, 1993; Surpin *et al.*, 1994) y *Rhizobium etli* (Soberón *et al.*, 1989, 1990, 1993; Barquera *et al.*, 1991a). El esquema respiratorio que ha sido mejor caracterizado genéticamente es el *B. japonicum*. Se han caracterizado los genes correspondientes a las citocromos oxidasa de tipo c: citocromo a+a<sub>3</sub> y cbb<sub>3</sub> (Bott *et al.*, 1990, 1992; Gabel *et al.*, 1990; Preisig *et al.*, 1993). Ha sido demostrado que la oxidasa cbb<sub>3</sub> es inducida en condiciones de crecimiento microaerófilico y que esta oxidasa es requerida para la formación de bacteroides fijadores de nitrógeno (Preisig *et al.*, 1993). Adicionalmente, dos oxidasas de tipo hemo-Cu han sido identificadas mediante la clonación de sus correspondiente genes (Bott *et al.*, 1992; Surpin *et al.*, 1994). Estas dos enzimas corresponden a una tercera citocromo c oxidasa y a una quinol oxidasa. De este modo, el sistema respiratorio de *B. japonicum* aparentemente posee cuatro distintas oxidasas las cuales son miembros de la superfamilia de oxidasas hemo-Cu. En suma, las bacterias poseen múltiples oxidasas respiratorias.

## 1) CITOCROMOS

La multiplicidad de oxidasas en bacterias ha sido por largo tiempo fuente de confusión, tanto en terminos de la naturaleza de la enzima por si misma como en terminos de la relación que existe entre tales complejos enzimáticos. recientemente, ha sido reconocido que la mayoría de las oxidasas bacterianas son miembros de una superfamilia denominada superfamilia de oxidasa hemo-Cu, independientemente de sus diferencias de sustratos (quinol contra citocromo c), afinidad por el oxígeno, el tipo de hemo y la composición de metales. Un gran número de enzimas que hace algunos años fueron consideradas ser totalmente diferentes las unas con las otras actualmente se sabe que se encuentran estrechamente relacionadas.

### La superfamilia de oxidasas hemo-Cu

La membrecía en la superfamilia de oxidasa hemo-Cu está basada en la presencia de una subunidad homologa a la subunidad I (la subunidad más grande) de la citocromo c oxidasa de mamíferos (citocromo  $a+a_3$ ). Actualmente se encuentran listadas en el GeBank 80 secuencias de la subunidad I de varias especies. Es esta subunidad la que contiene el centro bimetálico al cual se une al oxígeno que es reducido a agua. El centro bimetálico es también denominado centro binuclear que consiste de un grupo hemo (ligado por un residuo de histidina) y un átomo de cobre, denominado  $Cu_B$ , localizado dentro de los 5 Å (0.5 nm) del fierro de grupo hemo. La subunidad I contiene un segundo grupo hemo en adición del grupo hemo que forma parte del centro binuclear. Este segundo hemo está ligado a dos residuos de histidinas, y su aparente función primordial es la de facilitar la transferencia de electrones a el centro binuclear. La presencia de dos grupos hemo y del  $Cu_B$  en la subunidad I es comun a todos los miembros de la superfamilia de oxidasas hemo-Cu (Brown *et al.*, 1993; Hosler *et al.*, 1993). Típicamente la oxidasa de mamíferos está formada por 13 subunidades (Saraste 1990), tres de las cuales se encuentran codificadas por el genoma mitocondrial (subunidades I, II y III) y las restantes 10 son codificadas por el genoma nuclear (Capaldi 1990). Casi todas las oxidasas bacterianas poseen subunidades homólogas a las subunidades II y III en adición de la subunidad I. Las excepciones son la quinol oxidasa (*soxABCD*) de *Sulfolobus acidocaldarius* (Lübben *et al.*, 1992) y el citocromo c oxidasa de tipo  $ba_3$  de *Thermus thermophilus* (Zimmermann *et al.*, 1988) las cuales carecen de la subunidad III, y las oxidasas de tipo  $cbb_3$  las cuales carecen de las subunidades II y III

(García-Horsman *et al.*, 1994a; Gray *et al.*, 1994). Homólogos a las 10 subunidades de las oxidasas de mamíferos codificadas por el genoma nuclear no han sido encontradas en bacterias. Sin embargo, algunas de las oxidasas bacterianas poseen una subunidad adicional (subunidad IV) la cual no tiene relación con ningún producto génico de eucariontes (Ishizuka *et al.*, 1990).

En numerosos casos se ha demostrado que estas enzimas actúan como bombas de protones, de tal modo que es posible asumir que la esencia de los mecanismos de catálisis, incluyendo la translocación de protones está contenida dentro de tres especies de subunidades. Por ejemplo, el citocromo c oxidasa de *R. sphaeroides* (Hosler *et al.*, 1993) y *P. denitrificans* (Hendler *et al.*, 1991) son bombas de protones funcionales con solo tres subunidades, las cuales corresponden a las tres subunidades codificadas mitocondrialmente (subunidades I, II y III) de la oxidasa eucariótica. Más aún, la subunidad III puede ser removida de la citocromo c oxidasa purificada de *P. denitrificans* y, la remanente oxidasa de dos subunidades a demostrado ser eficiente en el bombeo de protones (Haltia *et al.*, 1991; Solioz *et al.*, 1982; Hendler *et al.*, 1991). Así, la mínima unidad funcional aparentemente consiste de las subunidades I y II.

Como fué apuntado, la subunidad I tiene los ligandos para dos grupos hemo y el  $\text{Cu}_B$ , el cual forma parte del centro hemo-Cu (Brown *et al.*, 1993; Hosler *et al.*, 1993). El hemo que forma parte del centro binuclear es coordinado con una sola histidina y tiene una posición de coordinación que provee del sitio de unión al  $\text{O}_2$ . Este grupo hemo es denominado como componente de alto-spin de la oxidasa debido a sus propiedades espectrofotométricas. El segundo hemo es coordinado por dos histidinas y es denominado centro hemo de bajo-spin, el cual es responsable de la absorción en la región visible del espectro y, por lo tanto es responsable del color de las diferentes especies de oxidasas.

La subunidad I es el rasgo común de la 5 subclases de oxidasas hemo-Cu, de las cuales tres son citocromo c oxidasa y dos son quinol oxidasas. Muchas de las variantes observadas en las oxidasas hemo-Cu deriva del hecho de que cada oxidasa individualmente posee diferentes combinaciones de grupos hemo A, O y B asociados con la subunidad I. Por ejemplo, la oxidasa mitocondrial posee hemo A en los sitios de alto y bajo-spin de la subunidad I. Por razones históricas, la subindicación 3 es utilizada para denotar la unión con el  $\text{O}_2$  (y con el CO) con el hemo de alto-spin. Así esta enzima es referida como citocromo  $a+a_3$  o como una oxidasa de tipo  $a+a_3$ . Sin embargo, si un grupo hemo B ocupa el sitio de bajo-spin, como es el caso de la c oxidasa de *T. thermophilus* (Zimmermann *et al.*,

1988). La oxidasa resultante es denominada oxidasa de tipo  $ba_3$ . El hemo B, O y A pueden participar en el centro binuclear y el hemo B como A pueden ser encontrados en el sitio de bajo-spin. No hay ejemplos en los cuales el hemo O sea encontrado normalmente en el sitio de bajo-spin. Sin embargo, bajo ciertas condiciones el hemo O puede ocupar al sitio de bajo-spin en la quinol oxidasa de *E. coli*, rindiendo una oxidasa de tipo  $oo_3$  completamente funcional (Puustinen *et al.*, 1992). No hay una correlación entre la especificidad por el substrato u otras características funcionales de estas oxidasa y el tipo de hemo asociado con la subunidad I. Los hemos B y O tienen propiedades de absorción similares, y ambos confieren un color rojo a las oxidasas que los contienen. El hemo A tiene un corrimiento en el espectro de absorción de tal modo que las proteínas que lo contienen presentan un color verde (García-Horsman *et al.*, 1994).

Todos los citocromos c oxidasa con la excepción de las oxidasas de tipo  $ccb_3$ , contienen una variedad de la subunidad II, la cual contiene un segundo centro de reducción conteniendo cobre denominado  $Cu_A$ . En estos citocromos oxidasas, el sitio de unión del citocromo c ha sido localizado en la subunidad II (Capaldi 1990; Saraste 1990) y  $Cu_B$  es el aceptor inicial de electrones donados por la forma reducida de citocromo c (Hill 1993). Los residuos que se encuentran conservados en esta subunidad han sido implicados tanto en la unión del citocromo c así como la del  $Cu_A$  (Saraste 1990). Evidencias recientes indican que el centro  $Cu_A$  está formado por dos átomos de Cu (García-Horsman 1994). Todas la quinol oxidasas también poseen variante de la subunidad II, pero los residuos implicados en tanto en la unión del citocromo c como la del  $Cu_A$  están ausentes, y ha sido demostrado que este tipo de oxidasas carecen del centro  $Cu_A$  (Minghetti *et al.*, 1992). Estudios recientes con análogos fotoreactivos del quinol han sugerido que la subunidad II al menos forma parte del sitio de unión del quinol en la quinol oxidasa de tipo  $bo_3$  de *E. coli* (García-Horsman *et al.*, 1994). De este modo, el papel principal de la subunidad II puede ser la de proveer de sitios para la unión de substratos; tales como el quinol o el citocromo c.

### Citocromo $a+a_3$ .

La superfamilia de oxidasas hemo-Cu incluye a la oxidasa mitocondrial eucariótica  $a+a_3$ . La citocromo c oxidasa mitocondrial (primordialmente la de corazón bovino) ha sido objeto de largo estudio (para revisiones, ver las referencias Babcock y Wikström 1992; Capaldi 1990; Brown *et al.*, 1993; Hosler *et al.*, 1993). Típicamente esta oxidasa está

formada por 13 subunidades (Saraste 1990), tres de estas son codificadas por el genóma mitocondrial (subunidades I, II y III) y las restantes 10 son codificadas por el genóma nuclear (Capaldi 1990).

En bacterias esta oxidasa es muy parecida a la oxidasa mitocondrial. Sin embargo, se distingue porque tiene menos subunidades; normalmente 3 o 4 subunidades en contraste con las 13 subunidades de la oxidasa de mamíferos. Esta oxidasa está asociada a los citocromos  $c$  o  $c_1$  y se encuentra presente en la mayoría de los diferentes grupos bacterianos (Poole, 1983). El citocromo  $a+a_3$  se expresa normalmente en cultivos de células en condiciones de abundante aereación y, normalmente es reemplazado por citocromo  $bo_3$  cuando las bacterias se cultivan en bajas tensiones de oxígeno (Hosler *et al.*, 1992). Como en el caso de la enzima mitocondrial el citocromo  $a+a_3$ , los dos grupos hemos se distinguen el uno del otro por sus propiedades de unir ligandos. El hemo A de alto-spin une, en su forma reducida CO, cianuro y otros ligandos. El hemo A de bajo-spin no une estos ligandos (Brown *et al.*, 1993). La enzima tiene una  $K_m$  por el oxígeno de 4 a 8  $\mu M$  por lo que se distingue como la oxidasa terminal con menor afinidad por el oxígeno (Hosler *et al.*, 1992).

El citocromo  $a+a_3$  bacteriano cataliza la reducción de  $O_2$  y funciona como una bomba de protones tan eficientemente como su contraparte mitocondrial, independientemente de estar constituida por unas cuantas subunidades (Hendler *et al.*, 1991). Esto ha sido demostrado con la enzima purificada y reconstituida en vesículas membranales de dos diferentes especies bacterianas (Solioz *et al.*, 1982; Hosler *et al.*, 1993; Hendler *et al.*, 1991).

### Citocromo $bo_3$

El citocromo  $bo_3$  es la oxidasa terminal perteneciente a la superfamilia de oxidasas hemo-Cu y es la más representada en diferentes especies de bacterias (Anraku 1988). Este citocromo está formado por 2 ó 3 subunidades dependiendo la especie, y se puede encontrar otro grupo hemo B o hemo A asociado al hemo B del citocromo  $bo_3$ . Se ha propuesto que el complejo citocromo o puede participar en dos tipos de oxidasas respiratorias dependiendo si oxidan a citocromo tipo b (citocromo  $bo_3$ ) o citocromos tipo c (citocromo  $cao_3$ ) (García-Horsman *et al.*, 1994).

El citocromo  $bo_3$  tiene una absorción característica de los citocromos de tipo b con picos a 430 y 560 nm, por lo que además de su



identificación espectrofotométrica es necesario identificarlo por su capacidad de reaccionar con CO. Los espectros de preparaciones reducidas más CO, muestran señales típicas con un pico a 417 y valles a 430 y 560 nm (Poole, 1983).

En diferentes especies bacterianas se ha reportado que el citocromo  $bo_3$  tiene una  $K_m$  por  $O_2$  de 1.8 a 6.5  $\mu M$  (Poole, 1983). Sin embargo, se han reportado  $K_m$  menores a 1  $\mu M$  (0.1  $\mu M$ ) en células completas de *E. coli* (Rice y Hempding, 1978).

### Quinol oxidasa de tipo bd

La quinol oxidasa de tipo bd es la única oxidasa bien caracterizada que no es miembro de la superfamilia de las oxidasa hemo-Cu. Aunque si bien, ésta se encuentra en un número bacterias (Anraku 1988; Kranz y Gennis 1985), la ocurrencia de la oxidasa bd no es por lo tanto universal. En contraste, la ocurrencia de las oxidasas hemo-Cu en bacterias aparentemente es universal.

El complejo enzimático que constituye a la oxidasa bd se purificó de *E. coli* (Kranz y Gennis 1982). En esta bacteria se encontró que este complejo está formado por dos subunidades de diferente peso molecular. El hemo D es capaz de unir CO. La oxidasa purificada no contiene cobre. La oxidación de quinol por citocromo bd se inhibe con concentraciones de cianuro y azida mucho mayores que las requeridas para inhibir la oxidación de quinol por citocromo  $bo_3$  (Ingledey y Poole 1984).

El citocromo bd de *E. coli* se ha reconstituido en proteoliposomas y se demostró que es capaz de generar un potencial de membrana hasta de 160 a 180 mV, y se ha sugerido que este potencial se produce de una manera análoga al producido por el citocromo  $bo_3$  (Anraku 1988).

El citocromo bd reacciona con  $O_2$  y CO y presenta una  $K_m$  por el oxígeno que va de 0.02 a 0.39  $\mu M$  (Kelly *et al.*, 1990), lo que distingue a este citocromo como una de las oxidasas bacteriana con mayor afinidad por el oxígeno (Rice y Hempding, 1978). Esto permite una mayor tasa de respiración a bajas concentraciones de  $O_2$ . Sin embargo, el precio a pagar es que la eficiencia de acoplamiento el menor en el citocromo bd que la de la quinol oxidasa de tipo  $bo_3$  (Puustinen *et al.*, 1991). La translocación neta de protones a través de la membrana por el citocromo bd se lleva a cabo en

una relación de  $1\text{H}^+$ / electron ( $e^-$ ), mientras que la translocación neta de protones por la oxidasa de tipo  $\text{bo}_3$  es el doble de eficiencia,  $2\text{H}^+$ /  $e^-$  (Puustinen *et al.*, 1991).

Es importante enfatizar que no es necesariamente el principal interés de un organismo utilizar un sistema respiratorio con la más alta relación  $\text{H}^+/e^-$ . Aunque si bien, la principal función del sistema respiratorio es la de generar una fuerza proton motriz, la cual es utilizada para la síntesis de ATP para ser usado en una variedad de funciones esenciales, el sistema respiratorio también es necesario para la regeneración de NAD a partir de NADH y, para la eliminación de equivalentes reductores. Esta última función es importante, especialmente bajo condiciones de crecimiento en donde las células tiene un adecuado suplemento alternativo de energía. Por ejemplo, de la glucólisis o de la fotosíntesis. En adición, bajo algunas condiciones de crecimiento, el sistema respiratorio puede ser importante para reducir la concentración de  $\text{O}_2$  con el fin de proteger del daño a las enzimas sensibles a este gas. Esto ha sido sugerido, por ejemplo, como una función de la oxidasa de tipo  $\text{bd}$  de las bacterias entéricas (Hill *et al.*, 1990) y bajo condiciones de fijación de Nitrógeno en *A. vinelandii* (Kelly *et al.*, 1990). Bajo tales condiciones, la tasa respiratoria puede ser de gran importancia para la supervivencia que la eficiencia en la translocación protónica. En suma, dependiendo de las condiciones de crecimiento, las células deben de balancear sus necesidades competitivas a manera de optimizar la cadena respiratoria en terminos de: (i) máxima tasa  $\text{H}^+/e^-$ ; (ii) rápido removimiento del exceso de equivalentes reductores; (iii) como consumidor de  $\text{O}_2$ .

### Citocromo $\text{cbb}_3$

Ha sido recientemente aislada de *R. sphaeroides* (García-Horsman *et al.*, 1994) y *R. capsulatus* (Gray *et al.*, 1994) y *B. japonicum* (Preisig *et al.*, 1996), y genéticamente caracterizada en *B. japonicum*, *R. meliloti* (Kahn *et al.*, 1993) y *Azorhizobium caulinodas* (Mandon *et al.*, 1994). Esta inusual citocromo c oxidasa tiene una subunidad homóloga a la subunidad I (*fixN*). Sin embargo, esta subunidad carece de muchos de los residuos normalmente presentes en todas las otras variantes (Saraste y Castresana 1994). Las oxidasa de tipo  $\text{cbb}_3$  carecen de las subunidades II y III equivalentes a las eucarióticas y en su lugar tiene dos citocromos de tipo c. Datos reciente indican que esta oxidasa puede bombear protones (Raitio *et al.*, 1994), sugiriendo que la subunidad I por si sola es suficiente para realizar esta función.

Con la excepción de las oxidasas de tipo  $cbb_3$ , todos los grupos prostéticos metálicos de las oxidasas tipo hemo-Cu se encuentran contenidas en las subunidades I y II.

A este complejo oxidasas terminal se le ha denominado como la oxidasas simbiótica y su reciente caracterización bioquímicas en *R. japonicum* han arrojado datos que apoyan esta idea (Preisig *et al.*, 1996). La oxidasas purificada de membranas de células crecidas anaeróbicamente tiene las propiedades de oxidar tanto al citocromo c como al colorante TMPD (N, N, N', N'-tetrametil-*p*-fenilendiamina). La secuencia de aminoácidos de las subunidades constituyentes de mayor tamaño confirmaron la presencia de los productos de los genes *fixN*, *fixO* y *fixP*. Las proteínas FixO y FixP fueron citocromos de tipo c unidos a la membrana y mostraron actividad de peroxidasa en geles de acrilamida-SDS ( $M_r$ s de 29,000 y 31,000, respectivamente). La proteína FixP fué inmunológicamente detectable en membranas aisladas de bacteroides de nódulos de raíz y, el 85% de la actividad de citocromo c oxidada en estos bacteroides fué atribuida a la oxidasas  $cbb_3$ . Los valores de la  $K_m$  para el  $O_2$  de la enzima purificada de membranas de diferentes cepas mutantes y silvestre de *B. japonicum* fueron determinados por un metodo espectrofotométrico con leghemoglobina de soya oxigenada como sistema de entrega de  $O_2$ . El valor derivado de la  $K_m$  para el  $O_2$  de la oxidasas  $cbb_3$  en membranas fué de 7 nM, el cual es de seis a siete veces más bajo que el determinado para la citocromo oxidasas aeróbica citocromo  $a+a_3$ . Por todos estos datos se puede concluir que oxidasas  $cbb_3$  sostiene la respiración microaeróbica en los bacteroides endosimbióticos. Todas las propiedades de esta oxidasas la diagnostican como un miembro de la subfamilia de oxidasas tipo  $cbb_3$  de las oxidasas hemo-Cu (Preisig *et al.*, 1996).

### Citocromo c (Mesohemo)

Este grupo incluye a los citocromos c,  $c_1$ ,  $c_2$ ,  $c_3$ ,  $c_{550}$ ,  $c_{551}$  y  $c_{558}$  en los cuales el grupo hemo se encuentra unido a la proteína, por lo que, ensamblaje final para la formación de un citocromo c funcional requiere de la ligación del apocitocromo c con el grupo hemo vía uniones tioéster. El ligamiento ocurre a nivel de dos distintos residuos de cisteínas del apocitocromo c (sitio de unión covalente para el grupo hemo; C-X-X-C-H), con los residuos vinilo 2 y 4 del grupo hemo (Taniuchi *et al.*, 1983). La unión covalente del grupo hemo C a la proteína se considera como una modificación evolutiva de la estructura del citocromo c para prevenir la disociación del mesohemo y la apoproteína, lo que le permite a este tipo de

citocromos funcionar en el periplasma o en la superficie periplásmica (Pettigrew y Moore 1987).

### Complejo citocromo $bc_1$

El citocromo  $bc_1$  es un complejo protéico oligomérico membranar el cual transfiere electrones de un quinol con un relativo bajo potencial a un citocromo de tipo c y deposita 4 protones en el lado electropositivo de la membrana por cada par de electrones transferidos a dos moléculas de citocromo de tipo c. La reacción catalizada por el complejo  $bc_1$  está descrita por la ecuación:



En donde en subíndice n y p designan a las superficies negativa y positiva de la membrana, y  $c_{ox}$  y  $c_{red}$  se refieren a la forma reducida u oxidada del citocromo c, respectivamente.

La actividad proton motriz del complejo  $bc_1$  convierte la energía libre disponible de la reacción de la transferencia de electrones en un gradiente proton motriz a través de la membrana, en la cual el complejo  $bc_1$  se encuentra asimétricamente localizado. En bacterias el complejo  $bc_1$  se encuentra localizado en la membrana citoplasmática, y la translocación vectorial de protones es tal que el lado periplásmico de la membrana es electropositivo. En mitocondrias este complejo se encuentra localizado en la membrana interna mitocondrial, y el alto potencial protónico se forma en el lado citosólico de esta membrana. El complejo  $bc_1$  es el más común de los complejos capaces de traducir la energía de la transferencia de electrones para la translocación de protones (Trumpower 1990).

El complejo  $bc_1$  ha sido aislado de membranas plasmáticas tanto de bacterias gram-negativas como gram-positivas, las cuales usan el oxígeno, nitrógeno y compuestos sulfurados como aceptores de electrones así como de bacterias fotosintéticas al igual que de mitocondrias de eucariotes superiores e inferiores. En algas y cloroplastos de plantas superiores el complejo citocromo  $bc_1$  es muy similar. El complejo  $bc_1$  es común, pero no universal en procariotes (Trumpower 1990).

La indicación más directa de un complejo  $bc_1$  es la presencia de la proteína hierro-azufre tipo Rieske. Hay un gran número de citocromos c y b que no están relacionados con el complejo  $bc_1$ , especialmente en

bacteria. Las quinol oxidasas no utilizan al complejo  $bc_1$  como donador de electrones (Trumpower 1990).

## 2) FLAVOPROTEINAS

Las más comunes son las que oxidan L-malato, D- y L-lactato, L-glicerol-3-fosfato y L-dihidro-orotato. Todas contiene FMN (flavín-adenín-mononucleótido) excepto la L-lactato deshidrogenasa que contiene FAD (flavín-adenín-dinucleótido). Estas proteínas tienen al menos una subunidad que está localizada del lado citoplásmico de la membrana, a la cual están acoplados fosfolípidos específicos por medio de interacciones hidrofóbicas (Jones1988).

### **NADH deshidrogenasa.**

Este sistema enzimático (también llamado Complejo I), cataliza la transferencia de equivalentes reductores desde el NADH (nicotin-adenín-dinucleótido en su forma reducida) hasta la ubiquinona o la menaquinona, siendo la vía de entrada de electrones más importante para casi cualquier sistema respiratorio. La enzima contiene flavina unida no covalentemente (FMN o FAD) y más de cuatro centros Fe-S (Jones1988).

### **Succinato deshidrogenasa.**

Esta enzima cataliza la reacción de oxidación del succinato a fumarato y transfiere equivalentes reductores preferentemente a la ubiquinona. El alto potencial redox del par fumarato-succinato ( $E_m +30$  mV) hace insignificante la contribución de esta enzima en la conservación de energía, lo que impide el bombeo de protones (Jones1988).

## 3) QUINONAS

Las quinonas más comunes en los sistemas transportadores de electrones bacterianos son la ubiquinona (UQ) y la menaquinona (MQ), las cuales están formados por núcleos de 1,4-benzoquinonas o naftoquinonas unidos a largas cadenas de poliisoprenos. La forma reducida de las quinonas acepta 2H para formar los quinoles respectivos, los cuales se forman vía los intermediarios semiquinona, y esto a su vez pueden

ionizarse para formar el anión  $QH^-$  (Jones1988). La ubiquinona es componente redox de las bacterias gram-negativas mientras que la menaquinona parece ser casi exclusiva de las gram-positivas; sin embargo, las bacterias facultivas como las Enterobacteriaceae (por ejemplo *E. coli*) contienen ambas quinonas. La UQ es la quinona principal durante la respiración aeróbica o con nitrato como aceptor de electrones, mientras la MQ, de potencial redox más negativo, está involucrada en la respiración del fumarato (Jones1988).

## TRANSPORTE DE ELECTRONES EN Rhizobiaceas

### Diferencias entre el crecimiento en vida libre y el bacteroide.

Existen diferencias significativas en la composición y organización del sistema respiratorio de los bacteroides y el de las células en vida libre. El tipo de citocromos y de deshidrogenasas son básicamente diferentes en el bacteroide. Sin embargo, las diferencias parecen radicar principalmente en el tipo de oxidasa que se encuentra en cada forma diferenciada de la bacteria. *Rhizobium* en vida libre, puede crecer en varias condiciones: aeróbicamente, microaerofílicamente, y quimiolitotróficamente en presencia de  $H_2$  y  $CO_2$  como fuente de energía y de carbono respectivamente. En cada condición mencionada existe expresión diferencial del sistema respiratorio ( O'Brian y Maier 1987, 1989; Uchakrabarti *et al.*,1987). La expresión de oxidasa múltiples con diferentes afinidades por el  $O_2$  es común en las bacterias, lo que permite a estos organismos sobrevivir en un amplio rango de concentraciones de oxígeno.

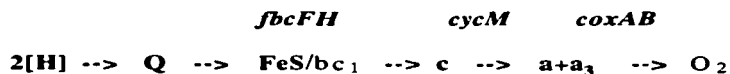
### VIDA LIBRE.

El estudio de la composición de la cadena de transporte de electrones se ha llevado a cabo en diferentes especies de Rhizobiaceas, como *R. etli*, *Rhizobium leguminosarum*, *B. japonicum*, por citar a algunos, sin embargo, en donde mejor ha sido caracterizada es en *B. japonicum*, en donde y como se mencionó también se han caracterizado los genes que codifican para los distintos componentes de este sistema.

Las células de *B. japonicum* en vida libre contienen citocromos intermedios de tipo b y c, así como los citocromos  $a+a_3$  y  $bo_3$ , cuya función

como oxidasa en condiciones aeróbicas se demostró por espectros de acción fotoquímica (Appleby, 1969). Los citocromo  $a+a_3$  y  $bc_1$  forman un complejo con monóxido de carbono en una atmósfera de  $CO-O_2$  (95:5, v/v).

La presencia de una oxidasa tipo  $a+a_3$  en células de *B. japonicum* crecidas aeróbicamente sugirió la existencia de una cadena respiratoria de transporte de electrones similar a la que se encuentra en mitocondria y en muchas bacterias aeróbicas:



Lo cual vino a ser confirmado por el aislamiento mutagénesis de genes que codifican para los componentes de esta vía.

El operón *fbcFH* contiene los genes de la proteína hierro-azufre Rieske y de los citocromos  $b$  y  $c_1$  de la ubiquinol citocromo  $c$  oxidorreductasa, también denominado complejo  $bc_1$  (Thöny-Meyer *et al.*, 1989, 1991).

En cultivos aeróbicos de células de *B. japonicum* se ha observado que el complejo  $a+a_3$  recibe electrones del ubiquinol, vía complejo  $bc_1$  y de un citocromo de tipo  $c$  (*cycM*) (Bott *et al.*, 1990) además se mostró que este complejo  $bc_1$  se requiere para el establecimiento de una simbiosis efectiva. (Thöny-Meyer *et al.*, 1989 ; Bott *et al.*, 1991). El gene *cycM* codifica para un citocromo tipo  $c$  el cual, al contrario de la mayoría de los citocromos de tipo  $c$  bacterianos que son solubles, este se encuentra anclado a la membrana (Bott *et al.*, 1991). Este citocromo es homólogo a citocromo  $c$  soluble mitocondrial el cual presumiblemente esta involucrado en la transferencia de electrones del complejo  $bc_1$  a la oxidasa terminal  $a+a_3$  (Bott *et al.*, 1991).

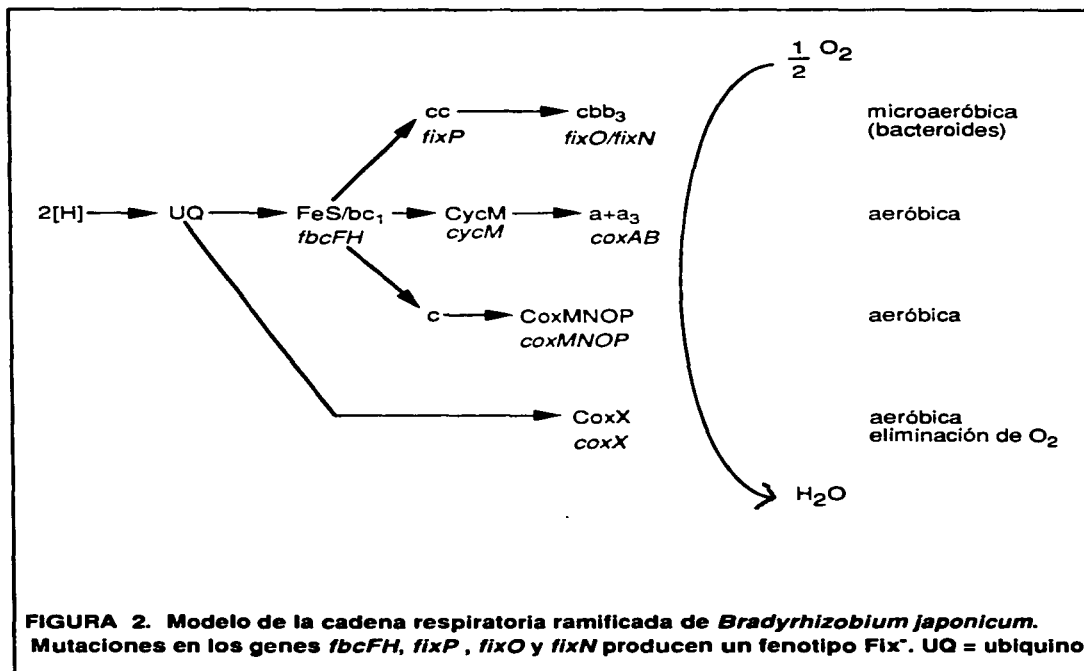
La oxidasa citocromo  $a+a_3$  está codificada por los genes *coxAB* (Bott *et al.*, 1990; Gabel y Maier 1990). Mutaciones en el gene *cycM* o en el gene estructural *coxA* del citocromo  $a+a_3$  tienen un fenotipo simbiótico  $Fix^+$  (no están afectados en la fijación simbiótica de nitrógeno) lo cual muestra que la rama respiratoria de los citocromos  $c-a+a_3$  no es esencial para la simbiosis (O'Brian y Maier, 1987; Nautiyal *et al.*, 1989; Bott *et al.*, 1990, 1991). Esto es consistente con el fuerte descenso o la ausencia completa de citocromo  $a+a_3$  detectable espectroscópicamente en bacteroides o en células

crecidas microaeróbicamente de la mayoría de cepas de *B. japonicum* (Appleby 1984; Keister y Marsh, 1990; Preisig *et al.*, 1993; Gabel *et al.*, 1994).

Por otro lado, al estudiar al gene *coxA*, se descubrió otra región génica que aparentemente codificaba para una segunda oxidasa terminal que aunque era diferente del citocromo  $a+a_3$ , pertenecía a la superfamilia de oxidasas hemo-Cu (Bott *et al.*, 1992). Por análisis de la secuencia nucleotídica de esta región se descubrió al operón *coxMNOP*. El producto del gene *coxM* comparte una similitud significativa con la subunidad II de las citocromo *c* oxidasas de otros organismos: en particular, todos los ligandos de  $Cu_A$  propuestos están conservados, así como los residuos de aminoácidos ácidos que pudieran estar involucrados en la unión del citocromo *c*. El gene *coxN* codifica para un polipéptido con una identidad del 40% a los representantes de la subunidad I, incluida la proteína CoxA: las seis histidinas que se supone unen a los grupos prostéticos (dos grupos hemo y un  $Cu_B$ ) están totalmente conservadas. Los productos génicos de los genes *coxO* y *coxP* son homólogos a las proteínas de la subunidad III. Una mutante *coxN*<sup>-</sup> de *B. japonicum* no exhibió defectos obvios en crecimientos en vida libre, aeróbicos o durante la simbiosis con la planta de soya. Esto muestra que los genes *coxMNOP* no son esenciales para la respiración del bacteroide que se encuentra fijando  $N_2$ . No se sabe a ciencia cierta bajo que condiciones de crecimiento funciona esta oxidasa alternativa. Se ha especulado (Bott *et al.*, 1992) que pudiera ser equivalente al citocromo  $bo_3$ , el cual se ha reportado que se expresa en células aeróbicas junto con el citocromo  $a+a_3$  (Appleby, 1984), pero no existe una confirmación bioquímica al respecto.

Por otro lado, recientemente se clonó y secuenció el gene *coxX*, el cual codifica para una gran subunidad catalítica de lo que se ha propuesto como la cuarta oxidasa de *B. japonicum*. El gene *coxX* codifica para una proteína de 666 aminoácidos (M(r) 74,527) que exhibe un alto grado de homología con oxidasas terminales de un gran número de especies procariotes (Surpin *et al.*, 1994). Esta oxidasa muy probablemente es una quinol oxidasa de tipo  $bo_3$  dado que bacterias con una mutación en los genes *fbCFH* exhiben sólo una velocidad de crecimiento reducida en cultivos crecidos aeróbicamente (Thöny-Meyer *et al.*, 1989). El esquema propuesto en la Figura 2 implica que se originan tres ramificaciones respiratorias del complejo citocromo  $bc_1$  y una ubiquinol oxidasa.





En cuanto a la capacidad de la cadena respiratoria en *Rhizobium* en vida libre para oxidar diferentes sustratos, en términos generales, se ha observado que el NADH es el sustrato que se oxida preferencialmente, mientras que el succinato se oxida a menor velocidad (Soberón *et al.*, 1989, 1990). Datos provenientes de la utilización de distintos inhibidores de la respiración y de una cepa mutante de *B. japonicum* deficiente en citocromo  $a+a_3$  demostraron que el NADH y el colorante TMPD son oxidados por oxidasas distintas a las que oxidan el succinato (O'Brian y Maier 1987). La alta velocidad de oxidación del NADH y del colorante TMPD de los extractos libres de células comparada con la velocidad de oxidación del succinato, puede deberse a la especificidad que las oxidasas tienen por los sustratos. Se ha sugerido que el citocromo  $a+a_3$  tiene una alta velocidad de recambio, y puede soportar un flujo más alto de electrones de lo que puede soportar el citocromo  $b_0$ . Sin embargo, el citocromo  $b_0$ , parece ser más adecuado para funcionar en condiciones de bajo  $O_2$  que el citocromo  $a+a_3$ . Las células crecidas bajo condiciones restringidas de aereación tienen disminuido, o no tienen citocromo  $a+a_3$ , lo cual es consistente con la idea de que este último no es funcional bajo condiciones limitantes de oxígeno (Avissar y Nadler 1978).

Generalmente, la expresión de citocromo  $a+a_3$  y citocromo  $b_0$  en *B. japonicum* es reprimida en los nódulos de la raíz, en su lugar otras oxidasas son expresadas para mantener la simbiosis (Preisig *et al.*, 1996; Kitts y Ludwig 1994). No obstante, el citocromo  $a+a_3$  es retenido en bacteroides de cepas de *Bradyrhizobium* sp. (Lupinus), *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *B. parasponia*, *R. etli* (Soberón *et al.*, 1989) y *B. japonicum* (Nautiyan *et al.*, 1989; O'Brian y Maier 1983; Ronson y Astwood 1985). Mutantes de *R. etli* que expresan citocromo  $a+a_3$  en condiciones microaerófilas son más eficientes en fijar nitrógeno durante la simbiosis (Soberón *et al.*, 1989, 1990, 1991). Sin embargo, una cepa mutante deficiente en citocromo  $a+a_3$  de *B. elkanii* que expresa normalmente esta oxidasa durante la simbiosis, es capaz de producir nódulos efectivos (Navarro *et al.*, 1995; Nautiyan *et al.*, 1989). Por estas observaciones, es difícil correlacionar la presencia de citocromo  $a+a_3$  con la fijación de nitrógeno.

Adicionalmente, se demostró que una cepa mutante en la enzima delta-aminolevulinato sintetasa (*hemA*<sup>-</sup>) de *B. japonicum* (Guerinot y Chelm 1986) es capaz de crecer aeróbicamente en medio adionado de un poco de extracto de levadura y sin la adición de delta-aminolevulinato y que estas células no tienen citocromos detectables (Frustaci *et al.*, 1991).

Esta conclusión implica que *B. japonicum* es capaz de crecer aeróbicamente usando una oxidasa que no contiene grupos hemo. De hecho, una flavoproteína pudiera servir para esta función; tal proteína se ha pensado que está involucrada en proporcionar protección respiratoria a los bacteroides fijadores de  $N_2$  (Appleby 1984) y ha sido purificada (Maier *et al.*, 1990). Aunque esta flavoproteína puede oxidar *in vitro* al citocromo c reducido (Maier *et al.*, 1990), un citocromo c no necesariamente sería el donador fisiológico de electrones *in vivo*.

De manera análoga, se ha reportado una ramificación alternativa sin citocromos presente en el sistema respiratorio de *R. etli* por Barquera *et al.* (1991b). Esta rama alternativa se ha sugerido como una flavoproteína capaz de oxidar NADH y, se distingue de la rama citocromo c oxidasa por su baja afinidad por el  $O_2$ , alta afinidad por en NADH y su resistencia al ser inhibida por quinacrina y la luz ultravioleta. La actividad de esta flavoproteína es inducida por NADH, o por la mezcla de ascorbato+TMPD y se encontró presente en células crecidas aeróbica y microaerofilicamente y estuvo ausente en células crecidas en anaerobiosis y en bacteroides (Barquera *et al.* 1991b).

Finalmente, es relevante notar que no se había detectado una oxidasa conteniendo hemo tipo D en células de *Bradyrhizobium sp* en vida libre o en bacteroides. Sin embargo, recientemente se demostró ésta oxidasa está presente en *B. elkanii* (Navarro *et al.*, 1995). Tanto *Azorhizobium caulinodans*, *R. leguminosarum* como *R. etli* expresan el citocromo bd bajo condiciones de aereación restringida, aunque su función como oxidasa no ha sido demostrada en *Rhizobium* (Barquera *et al.*, 1991a; Kitts y Ludwig, 1993) ni los genes estructurales de este citocromo han sido clonados.

## SIMBIOSIS.

El primer descubrimiento importante sobre una cadena respiratoria específica de la simbiosis proviene del hecho de que mutaciones por inserción en los genes del citocromo  $bc_1$  (*fbCFH*) produjeron un fenotipo  $Fix^-$  (Thöny-Meyer *et al.*, 1989). Este resultado indicaba la existencia de una rama de la cadena respiratoria que se expresaba durante la simbiosis y que se ramificaba a nivel del complejo  $bc_1$ . Por analogía con todas las cadenas respiratorias conocidas que se ramifican a partir de  $bc_1$ , esta rama debería de consistir de un citocromo c y una citocromo c oxidasa. La hipótesis de la existencia de un citocromo c en este ramal, fue

corroborado por el fenotipo Fix<sup>-</sup> de una mutante por Tn5 de *B. japonicum* que aparentemente tiene un defecto en la biosíntesis de todos los citocromos tipo c, con excepción del citocromo c<sub>1</sub> (Ritz *et al.*, 1993).

Recientemente se identificó, clonó y secuenció un locus genético que contiene a los genes *fixNOQP* de *B. japonicum*, el cual se sugirió como un candidato idóneo para codificar a los componentes del complejo citocromo oxidasa específica de simbiosis (Preisig *et al.*, 1993). Genes similares a estos fueron descubiertos primero en *Rhizobium meliloti* (Boistard *et al.*, 1991; Kahn *et al.*, 1993) pero se desconocían su función y su secuencia. En *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* y *Azorhizobium caulinodans* se han identificado genes homólogos (Schlüter *et al.*, 1993; Mandon *et al.*, 1994).

Las secuencias de aminoácidos derivadas de la secuencia de DNA de los productos génicos de los genes *fixNOQP* de *B. japonicum* les permitieron concluir que:

(i) FixN es una subunidad I característica de una citocromo oxidasa que tiene al menos 12 hélices transmembranales, 4 histidinas conservadas como ligandos para el centro hemo-Cu<sub>B</sub>, y otras histidinas que pudieran unir al menos otro hemo adicional, posiblemente un hemo B. Sin embargo, carece de muchos de los residuos presentes en todas las otras oxidasas pertenecientes a esta superfamilia. (ii) FixO es un nuevo tipo de citocromo c monohemo anclado a membrana. (iii) FixQ es una proteína de 54 aminoácidos anclada a membrana que no presenta otros motivos aparentes. (iv) FixP es un citocromo tipo c dihemo y anclado a membrana con una duplicación interna de secuencia y alguna similitud a la clase c<sub>6</sub> de citocromos tipo c.

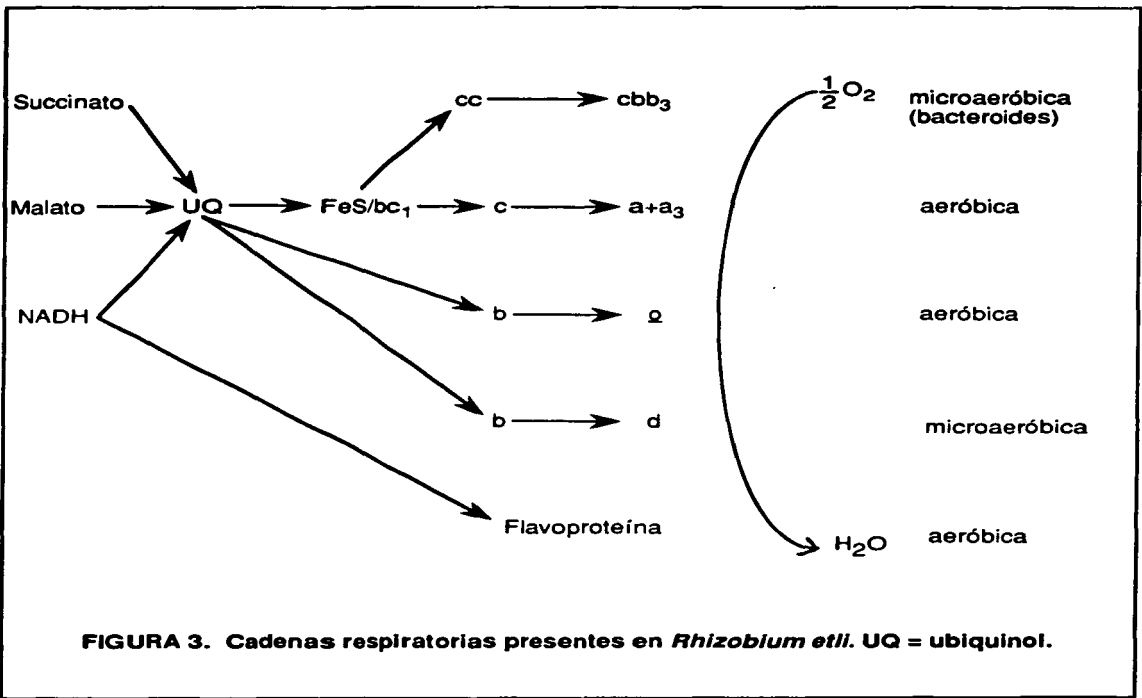
Estos datos sugieren que los genes *fixNOQP* codifican para un complejo citocromo oxidasa nuevo, el complejo cbb<sub>3</sub> que se induce en condiciones microaeróbicas y que es esencial en la simbiosis y que contiene hemoproteínas tipos b y c (Preisig *et al.*, 1993). Este nuevo complejo oxidasa terminal tiene todas las propiedades requeridas para encajar como una rama respiratoria dependiente del complejo bc<sub>1</sub> que opera en microaerobiosis y en los bacteroides que habitan los nódulos radiculares. La reciente caracterización bioquímica de esta complejo oxidasa terminal de *R. japonicum* han arrojado datos que apoyan esta idea (Preisig *et al.*, 1996). La oxidasa purificada de membranas de células crecidas anaeróbicamente tiene las propiedades de oxidar tanto al citocromo c como al colorante TMPD. La secuencia de aminoácidos de las subunidades

constituyentes de mayor tamaño confirmaron la presencia de los productos de los genes *fixN*, *fixO* y *fixP*. Las proteínas FixO y FixP fueron citocromos de tipo c unidos a la membrana y mostraron actividad de peroxidasa en geles de acrilamida-SDS. La proteína FixP fué inmunológicamente detectable en membranas aisladas de bacteroides de nódulos de raíz y, el 85% de la actividad de citocromo c oxidasa en estos bacteroides fué contribuida por la oxidasa *cbb<sub>3</sub>*. Los valores de la  $K_m$  para el  $O_2$  de la enzima purificada de membranas de diferentes cepas mutantes y silvestre de *B. japonicum* fueron determinados por un metodo espectrofotométrico con leghemoglobina de soya oxigenada como sistema de entrega de  $O_2$ . El valor derivado de la  $K_m$  para el  $O_2$  de la oxidasa *cbb<sub>3</sub>* en membranas fué de 7 nM, el cual es de seis a siete veces más bajo que el determinado para la citocromo oxidasa aeróbica citocromo *a+a<sub>3</sub>*. Por todos estos datos se puede concluir que oxidasa *cbb<sub>3</sub>* sostiene la respiración microaeróbica en los bacteroides endosimbióticos (Preisig *et al.*, 1996).

Los bacteroides de *B. japonicum* también contienen componentes sin grupo hemo, los cuales tienen una alta actividad de citocromo c oxidasa. Esta actividad es sensible a la atebriana, al cianuro y a otros agentes metaloquelantes, pero no lo es al monóxido de carbono. Esta actividad puede ser parcialmente restaurada por FAD o FMN, lo cual sugiere que la oxidasa puede ser una flavoproteína (O'Brian y Maier, 1989).

## CADENAS RESPIRATORIAS DE *Rhizobium etli*.

Las células de *R. etli* crecidas aeróbicamente en medio rico expresan citocromos tipos b y c, y dos citocromo oxidasas terminales; el citocromo *bo<sub>3</sub>* y el citocromo *a+a<sub>3</sub>*. El citocromo *a+a<sub>3</sub>* se expresa parcialmente cuando las células se cultivan en medio mínimo y durante la simbiosis (Figura 3) (Soberón *et al.*, 1989). Ambas citocromo oxidasas fueron identificadas por espectros de fotodisociación y por ensayos de unión de oxígeno. En *R. etli* y *R. leguminosarum* se ha observado la expresión de una tercera citocromo oxidasa terminal, el complejo citocromo d (Barquera *et al.*, 1991a). Además, se ha documentado la existencia de una vía respiratoria que no contiene citocromos, la cual tentativamente se ha propuesto que contiene una flavoproteína oxidasa dependiente de NADH (Barquera *et al.*, 1991b). Esta vía presenta una muy baja afinidad hacia el oxígeno ( $K_{m_{app}} = 80 \mu M$ , Barquera *et al.*, 1991b). La composición del sistema respiratorio de *R. etli* es muy parecida a la cadena respiratoria reportada en *B. japonicum* (Preisig *et al.*, 1996) (Figura 2).



La expresión de las diferentes oxidasas terminales de *R. etli* en vida libre está regulada por oxígeno como ha sido reportado en otras especies bacterianas (Spiro y Guest 1991). El citocromo  $a+a_3$  se expresa en cultivos aeróbicos en crecimiento exponencial, pero se reprime en condiciones microaeróbicas y crecimiento estacionario, condiciones en las que se induce el complejo citocromo d (Soberón *et al.*, 1989; Barquera *et al.*, 1991). El citocromo  $b_0_3$ , a su vez, se expresa tanto en condiciones aeróbicas como microaeróbicas (Soberón, *at al.*, 1990). La flavoproteína oxidasa dependiente de NADH se expresa en cultivos aeróbicos y semi-anaeróbicos, pero no se detecta en cultivos anaeróbicos o en bacteroides (Barquera *et al.*, 1991b). El papel de cada una de estas oxidasas terminales en el establecimiento de una simbiosis efectiva ha empezado a ser estudiado por medio del aislamiento de mutantes.

## TRANSPORTADORES ABC

Los compartimentos celulares y subcelulares están separados del medio externo por medio de membranas lipídicas. La supervivencia celular requiere del transporte regulado y selectivo de moléculas específicas a través de estas membranas; no solo para adquirir nutrientes o excretar productos de desecho, sino además, para llevar a cabo funciones relacionadas con la regulación celular. La importancia del transporte membranar de la célula está ejemplificado por el hecho de que casi el 20% de los genes identificados hasta el momento en *E. coli* están asociados con funciones de transporte (Fath y Kolter 1993).

El transporte transmembranar está mediado por sistemas protéicos asociadas específicamente con la membrana. Estos sistemas de transporte pueden agruparse dentro de un limitado número de familias. Los miembros de estas familias se encuentran relacionados tanto en su secuencia como en sus mecanismos moleculares. Esto sugiere que muy probablemente tengan un origen evolutivo común. La caracterización de éstas proteínas y su función en la fisiología celular ha sido una de las principales áreas de estudio en el tema durante los últimos años.

Las proteínas al igual que otras muchas moléculas que son sintetizadas en el citoplasma bacteriano, deben pasar frecuentemente una o más membranas para alcanzar su destino final. Un gran número de proteínas son transportadas por la maquinaria *sec* (Pugsley 1993). La secreción dependiente de este sistema requiere de algunas características estructurales que son inherentemente compatibles con el uso de esta vía. Uno de ellos es que el producto secretado sea una proteína con una

secuencia señal en el extremo amino terminal. Este requisito limita en cierto modo el tipo de moléculas que pueden ser transportados por este sistema (Pugsley 1993).

Los productos de secreción no protéicos, las proteínas extracelulares de las bacterias gram-negativas, que deben atravesar tanto la membrana interna como la externa, no utilizan la maquinaria Sec. Lo anterior indica que muchas moléculas deben encontrar vías alternas para abandonar el citoplasma. Este problema se resuelve por la existencia de otros sistemas de transporte que facilitan la translocación membranal de diversos productos con un alto grado de especificidad por el sustrato (Higgins, 1992; Lory 1992, Pugsley *et al.*, 1990; Wandersman 1992).

Uno de los sistemas que han sido identificados recientemente en distintos sistemas biológicos, es el sistema de transportadores ABC. Esta superfamilia es muy grande y diversa, y recientemente ha recibido considerable atención debido a que está asociada con una gran diversidad de procesos biológicos, tanto en procariones como en eucariotes (Higgins, 1992; Lory 1992). Actualmente se conocen más de 60 transportadores ABC. La mayoría de ellos han sido reportados en especies procariones.

Cada transportador ABC es altamente específico para un sustrato dado. No obstante, la variedad de sustratos que son manejados por diferentes transportadores es enorme (Higgins, 1992). Estos sustratos no solo son químicamente diferentes sino que también varían ampliamente en tamaño. Se han caracterizado transportadores específicos para aminoácidos, azúcares, iones inorgánicos, polisacáridos, polipéptidos e incluso proteínas (Higgins, 1992). Los mecanismos por los cuales se presenta tal diversidad, representa un intrigante problema. Mientras que algunos de estos transportadores actúan como sistemas de importación, otros lo hacen como sistemas de exportación, lo cual hace más interesantes el estudio de estos sistemas.

Típicamente, los transportadores ABC utilizan la energía de la hidrólisis del ATP para bombear sustratos a través de la membrana, normalmente en contra un gradiente de concentración (Higgins, 1992). Los sistemas que utilizan ATP requieren de un componente que sea capaz de unirlos. Los dominios estructurales que pueden eficientemente unir ATP y facilitar su hidrólisis se han conservado a lo largo de la escala evolutiva. Por lo tanto, no es sorprendente que estos sistemas de transporte muestren un motivo de unión a ATP conservado. Este motivo consiste en los sitios A y B que forman la unión para el ATP (ver figura 7). Esta región altamente conservada ha sido denominada "cassette de unión de ATP" (ATP binding

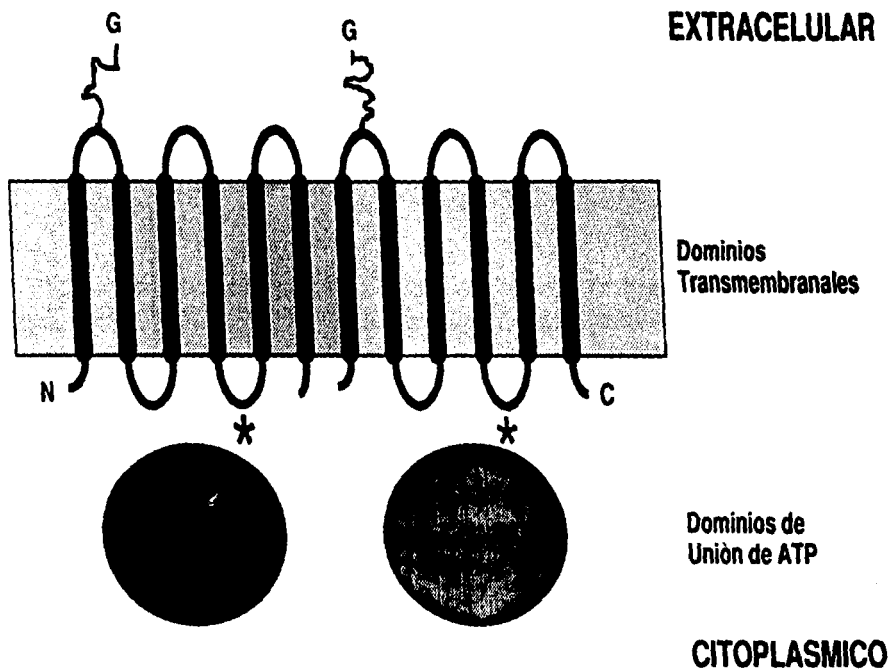


cassette o ABC por sus siglas en inglés). Las proteínas que contienen esta región son identificadas como transportadores ABC o, alternativamente ATPasas de tráfico (Mimura *et al.*, 1990).

## ORGANIZACION DE DOMINIOS

Los transportadores ABC requieren de la participación de múltiples dominios protéicos organizados de una forma característica. La estructura típica de estos tipos de transportadores consiste de cuatro dominios asociados con la membrana (Figura 4). Dos de estos dominios son altamente hidrofóbicos y cada uno consiste, normalmente, de seis segmentos transmembranales. Estos dos dominios forman la ruta a través de la cual los sustratos cruzan la membrana y, una gran porción de éstos se cree que determina la especificidad por el sustrato del transportador. Los otros dos dominios están periféricamente localizados en la cara citoplásmica de la membrana. Estos dominios son los que unen ATP y acoplan la hidrólisis de este al proceso del transporte. La secuencia de estos dos últimos dominios ha sido conservados a través de la escala evolutiva.

Los dominios individuales de un transportador ABC frecuentemente se expresan como polipéptidos separados; particularmente en especies procariotas (por ejemplo, el oligopéptido permeasa de *Salmonella typhimurium*; Figura 5A) (Hiles *et al.*, 1987). Sin embargo, hay varios ejemplos en los cuales los dominios se encuentran fundidos en uno mayor, un polipéptido multifuncional. Casi cualquier tipo concebible de fusión han sido señalado en la literatura. Por ejemplo, los dos dominios de unión al ATP del transportador de ribosa de *E. coli* se han fundido en una proteína de doble tamaño (RbsA; Figura 5B) (Bell *et al.*, 1983). Los dos dominios transmembranales del transportador del hidroxamato férrico de *E. coli* (FhuB) están fundidos en un solo polipéptido (Figura 5C) (Coulton *et al.*, 1987). El presunto transportador del complejo mayor de histocompatibilidad en humano (MHC), consiste de dos polipéptidos, RING 4 y RING 11, cada uno de los cuales comprende un dominio hidrofóbico en el extremo amino terminal y un dominio de unión al ATP en el carboxilo terminal (Figura 5D) (Trowsdale *et al.*, 1990; Powis *et al.*, 1992; Spies *et al.*, 1990). Finalmente, una gran variedad de transportadores en eucariotes, tales como el de la P-glucoproteína responsable de la resistencia al tratamiento multidrogas en humanos (MDR)(Figura 5E) y el producto del gene de la fibrosis cística (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, CFTR)(Figura 5F), tienen los cuatro dominios fundidos en un gran polipéptido (van der Bliek *et al.*, 1987; Riordan *et al.*, 1989).



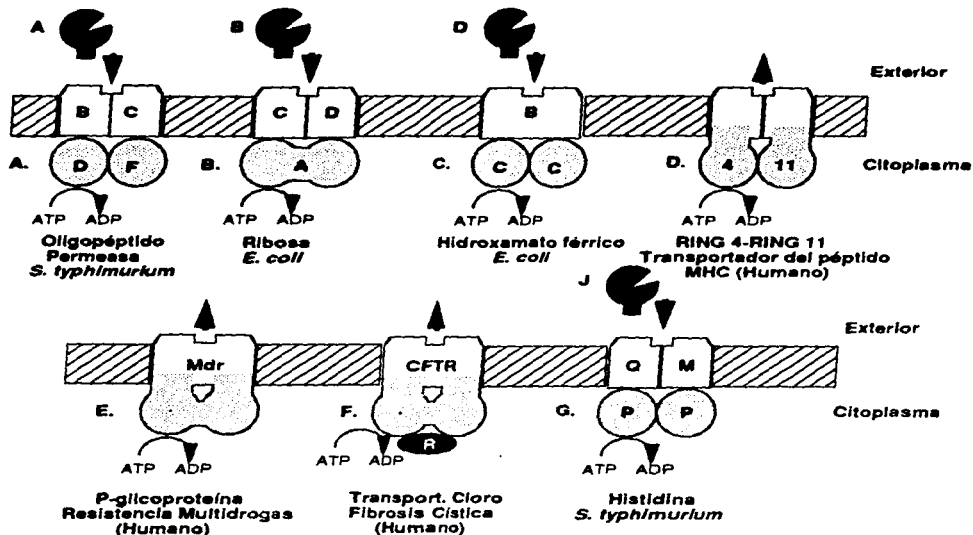
**FIGURA 4.** Típica organización estructural de un transportador ABC. El núcleo de un típico transportador ABC se encuentra esquematizado como péptidos separados (aunque ellos algunas veces se encuentran fundidos en uno solo; ver texto). Los dos dominios transmembranales atraviesan seis veces la membrana: un total de doce segmentos transmembranales por transportador. Los cortos motivos secuenciales conservados (Dassa & Hofnung 1985) entre estos transportadores se indican por (\*) en una de las asas citoplásmicas, entre los segmentos transmembranales 4 y 5 de cada dominio. Estos puede estar involucrados en la interacción con el dominio de unión de ATP. Sitios potenciales de glicosilación de transportadores ABC de eucariontes ( G ) se encuentran en la cara extracelular de la membrana.




El núcleo conformado por los cuatro dominios aparentemente provee de la maquinaria suficiente para mediar la translocación transmembranal del soluto. Sin embargo, algunos transportadores ABC tienen un dominio adicional. Por ejemplo, el transportador ABC asociado con la fibrosis cística (CTFR), tiene un quinto dominio, el dominio R (Figura 5F), el cual no tiene equivalente en ningún otro transportador ABC y, tiene una función regulatoria (Cheng *et al.*, 1991).

Muchos transportadores bacterianos tienen componentes protéicos adicionales además de la proteína(s) que conforma(n) el núcleo del transportador. Estas proteínas se expresan junto con dominios que constituyen el núcleo translocador. Estos factores adicionales han sido identificados en varias bacterias gram-negativas y se ha demostrado que son necesario cuando el producto de secreción está destinado a ser inmediatamente liberado en el medio extracelular. Estas proteínas son normalmente referidas como "factores accesorios".

En muchos de los sistemas de exportación, los factores accesorios fraccionan principalmente en la membrana interna, con un fraccionamiento menor en la membrana externa (Delepelaire y Wandersman 1991). Esto es consistente con la hipótesis de que el factor accesorio está anclado en la membrana interna y atraviesa el periplasma. El factor accesorio actúa conectando la membrana interna con la externa y su función es facilitar la exportación de los productos a través de las membranas en las células gram-negativas. El gene que codifica para el factor accesorio siempre se encuentra unido al gene que codifica para las proteínas ABC. Por ejemplo, La proteína HlyB, la cual exporta la hemolisina a través de la membrana citoplasmática, es coexpresada con la proteína HlyD, la cual participa en el transporte de la hemolisina a través de la membrana externa (Felmlee *et al.*, 1985). De manera análoga, el gene *labB* que se cotranscribe con los componentes del transportador de la maltosa en *E. coli*, no es requerido para el transporte activo a través de la membrana citoplásmica. Sin embargo, su producto facilita la entrada de la maltosa a través de la membrana externa (Hengge y Boss 1983).

Muchos de los exportadores ABC de las bacterias gram-negativas no tienen factores accesorios en particular aquellos involucrados en el transporte de sustratos no protéicos. En estos sistemas, el destino final de los productos de exportación es el periplasma o la membrana externa, solo en pocos casos se requiere de la participación de proteínas adicionales para complementar la translocación del producto en la membrana externa (Higgins, 1992).



**FIGURA 5. Organización de dominios de distintos transportadores ABC. Un típico transportador ABC consiste de cuatro dominios. Dos dominios transmembranales altamente hidrofóbicos , los cuales forman la ruta de translocación, y dos dominios citoplásmicos , los cuales acoplan la hidrólisis del ATP al proceso de transporte. Ciertos transportadores tienen dominios adicionales que no forman parte del mecanismo de translocación transmembranal . Los dominios son frecuentemente codificados como polipéptidos separados; sin embargo, ellos también pueden fusionarse en una o varias combinaciones alternativas. Ver texto para mayor detalle.**

Notablemente, todos los transportadores ABC bacterianos que median el ingreso de solutos requieren de una proteína de unión al sustrato, localizada fuera de la membrana citoplásmica, en el periplasma (Figuras 5A, B, C, G). Estos componentes periplásmicos son esenciales para el funcionamiento de transportadores a los cuales se asocian, aunque estos no se encuentran integrados a el proceso de translocación transmembranal del producto en sí (Higgins, 1992).

Actualmente no se ha comprobado que los transportadores ABC funcionen con menos de cuatro dominios. En la ausencia de evidencias que prueben lo contrario, es razonable asumir que el núcleo de cuatro dominios forma la unidad básica que es necesaria para mediar la translocación del soluto. Algunos transportadores sencillos, tales como el exportador de la hemolisina (HlyB), el cual solo tiene un dominio hidrofóbico y un dominio para la unión de ATP (Felmlee *et al.*, 1985), parecen funcionar como homodímeros, aunque esto no ha sido probado experimentalmente.

## DOMINIOS TRANSMEMBRANALES

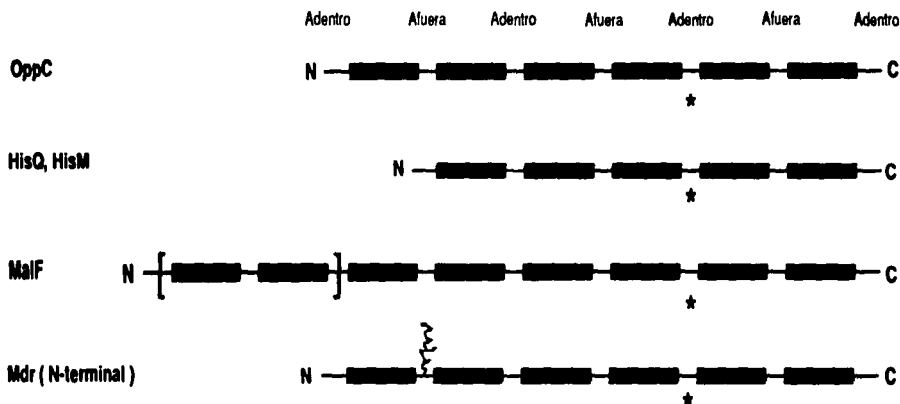
Los dos dominios transmembranales de los transportadores ABC son altamente hidrofóbicos. La secuencia de aminoácidos predicha a partir de la secuencia nucleotídica muestra que estas proteínas están constituidas por múltiples segmentos de  $\alpha$ -hélices que son capaces de atravesar la membrana. La mayoría de los transportadores predichos tienen seis de estos segmentos por dominio, un total de doce por transportador. El extremo amino terminal de estos transportadores, al igual que el extremo carboxilo terminal, se encuentra en el lado citoplásmico de la membrana. En este mismo lado se encuentran dos lazos; otros tres se encuentran en el lado extracelular (Figuras 4 y 6). La disponibilidad de datos experimentales se limita a unos cuantos transportadores. Sin embargo, seis segmentos transmembranales se han identificado en la permeasa del oligopéptido de *S. typhimurium* (Pearce *et al.*, 1992). Adicionalmente, se ha probado que los dominios hidrofóbicos de los translocadores HlyB y PriD también atraviesan la membrana citoplásmica seis veces (Wang *et al.*, 1991; Delepelaire y Wandersman 1991). Estos polipéptidos probablemente funcionen como homodímeros, de tal modo que cada complejo de transporte tiene doce segmentos que atraviesan la membrana como regla. Estudios con anticuerpos epítipo-específicos contra la P-glicoproteína que confiere la resistencia a multidroga de mamíferos apoya esta afirmación (Zhang y Ling 1991). La topología predicha también

coloca a los sitios de glicosilación de la P-glicoproteína y CFTF en la cara extracelular de la membrana y al dominio de unión de ATP en la cara citoplásmica (Figura 6). El único dato inconsistente con este modelo general propone que dos de los segmentos transmembranales predichos de uno de los dominios hidrofóbicos en la P-glicoproteína (pero no el equivalente al otro dominio), no transpasa la membrana (Zhang y Ling 1991). Sin embargo, la similitud entre las dos mitades de la P-glicoproteína y la analogía con otros transportadores ABC, sugiere que es poco probable que ambos segmentos verdaderamente se orienten de manera diferente en la membrana.

Algunos de los transportadores ABC, aparentemente no conforman el paradigma de las dos veces seis helices transmembranales. Por ejemplo, la proteína MalF del transportador de la maltosa de *E. coli* tiene ocho segmentos transmembranales (Ehrmann *et al.*, 1990). El alineamiento con componentes equivalentes de otros transportadores indican que MalF consiste de seis segmentos transmembranales estándar, además de una extensión en el extremo amino terminal con dos segmentos transmembranales adicionales (Figura 6). Estos dos segmentos transmembranales pueden ser deletados sin la más mínima pérdida de la función de MalF (Ehrmann *et al.*, 1990). Otra excepción es el transportador de la histidina de *S. typhimurium*, el cual presenta dos dominios hidrofóbicos (HisQ y HisM) que tienen cinco segmentos transmembranales (Higgins *et al.*, 1982). El alineamiento con otros tipos de transportadores (Figura 6) indicó que el segmento transmembranal amino terminal de cada dominio estaba ausente, lo que ocasiona que el extremo amino terminal se localice en el exterior de la célula. Esta orientación no ha sido demostrada experimentalmente, aunque esto pudiera indicar que diez segmentos transmembranales conforman la mínima unidad requerida para formar la ruta de translocación por sí misma. Los segmentos transmembranales adicionales situados en la porción amino terminal de la mayoría de los transportadores, probablemente facilita el correcto plegamiento, empaquetamiento y orientación dentro de la membrana.

## DOMINIOS DE UNION DE ATP

El rasgo más característico de los transportadores ABC es su dominio de unión de ATP. Cada dominio es de una longitud de aproximadamente 200 aminoácidos y comparte considerable identidad en su secuencia con los dominios de diferentes transportadores; variando entre el 30 y el 50% dependiendo del transportador con que se compare (Hyde *et al.*, 1990). La identidad en la secuencia de aminoácidos es



**FIGURA 6.** Segmentos transmembranales de un transportador ABC. La mayoría de los transportadores ABC consisten de dos dominios relacionados, cada uno con seis segmentos transmembranales predichos (p. ej. *OppC*, uno de los dos dominios del transportador de oligopéptidos de *S. typhimurium*). Un corto motivo conservado está localizado en el lazo citoplásmico entre los segmentos transmembranales 4 y 5 se encuentra indicado por (\*). Los extremos amino y carboxilo se encuentran ubicados en el citoplasma. Los sitios de glicosilación de los transportadores de mamíferos se encuentran en lazos extracelulares (indicados por un garabato). Ciertos transportadores no parecen adaptarse a este patrón. Así, los componentes *HisQ* y *HisM* del transportador de histidina poseen solamente cinco segmentos transmembranales. Ellos se pueden alinear con otros transportadores y carecen del segmento 1. Otras proteínas, tales como *MalF* del transportador de maltosa de *E. coli*, tiene ocho segmentos transmembranales. Los seis segmentos transmembranales que se encuentran hacia el extremo carboxilo terminal pueden ser alineados con los segmentos transmembranales de otros transportadores. Los dos segmentos transmembranales ubicados en el extremo amino terminal pueden ser deletados de la proteína sin alterar su función. Ver texto para mayor detalle.

generalmente mayor entre dos dominios de unión de ATP de un solo transportador que entre los dos dominios de diferentes transportadores.

Los dominios estructurales que pueden unir ATP eficientemente y facilitar su hidrólisis han sido conservados a través de la evolución y, por lo tanto, no es sorprendente que las proteínas que conforman a estos sistemas de transporte muestren un motivo de unión de ATP conservado. Esta región altamente conservada a sido denominada cassette de unión de ATP (ABC) (Mimura *et al.*, 1990). La conservación en la secuencia de aminoácidos de los dominios de unión de ATP, incluye dos motivos cortos (A y B) que se asocian en diferentes proteínas con la unión de nucleótidos (Fath y Kolter 1993) (Figura 7). Este motivo es conocido por varios nombres, siendo el "motivo de Walker" (Walker *et al.*, 1982) más usado. El sitio de unión de ATP se encuentra al final de una  $\alpha$ -hélice; los residuos GXGKST forman un giro que lleva al residuo de lisina a una cercana proximidad con el  $Mg^{2+}$ -ATP. El residuo de ácido aspártico en el sitio B está en cercana proximidad en el espacio con el sitio A, y su carga negativa puede interaccionar con la molécula de  $Mg^{2+}$ -ATP (Walker *et al.*, 1982) (Figura 7). Es importante enfatizar que la identidad en la secuencia nucleotídica se extiende sobre todo el dominio y va mucho más allá del dominio Walker. Esto claramente distingue los dominios ABC de otras proteínas unidoras de nucleótidos. No todas las proteínas con un motivo Walker son proteínas ABC (Higgins, 1992).

El uso de anticuerpos epítoto-específicos contra el transportador ABC asociado con la resistencia al tratamiento multidrogas en mamíferos (Mdr), demostró que estos dominios son solamente accesibles del lado citoplásmico de la membrana (Georges *et al.*, 1990; ). Del mismo modo, los componentes de unión de ATP en los transportadores ABC bacterianos de oligopéptidos e histidina, OppF y HisP respectivamente, son menos accesibles desde el exterior de la célula que del citoplasma (Kerppola *et al.*, 1991). Esta localización es enteramente consistente con el papel de acoplamiento entre la hidrólisis del ATP y el transporte.

En los transportadores donde el dominio de unión de ATP es parte de un polipéptido multidominio (P. ej. P-glicoproteína) (Figura 5E), los dominios transmembranales sirven como un anclaje en la membrana. Aún y cuando se expresen como polipéptidos separados (P. ej. en muchos sistemas bacterianos. Ver Figura 5), el dominio de unión de ATP se asocia con los componentes transmembranales (Kerppola *et al.*, 1991). Esta interacciones deben de ser específicas de tal modo que un dominio de unión de ATP de un transportador no puede normalmente reemplazar a



RHIET M---H-LTAE NLAARRGEDI IFINISFYLA AGEALVLTGR MGSQKSTLLR VVAGLIRPEK GTVIFGQKES PEGQHP-GEV SHYLGHRRMAM KNELTVAENL DFVHHFLRST CSSADLSVEDLI  
 BRAJA M---Q-LSQR RVICVRRGEE VFAGLDFEAV SCEAVAVVGR MGSQKSTLLR LIAGLLIPAG GTIAGDGGD- AELTIP--EQ CHYLGHRRDL KPALSVAENL SFVADFL--- -GGERLDAHEBO  
 RHOCA M---TLLAND QLTYSRGGIA VLEGVSFSLA AGHALVLRGP NGIGKTTLLR TLAGLQPLA GRVSM-----PP--EG IAVYAHADGL KATLSVRENL QFVRAAT---- -NATD-TVETBO  
 HAEIN MFEQHKLSLQ NLSGQRGERV LFRALTCDFN SQDFVLEGH NGIGKSTLLR ILAGLVKPLA GEVMDSEAI SKQREQYHKM LTYLGHLSGV KPELTSVENL QFYQRISQA-- -EQNTMLNWDI  
 ECOLI M-----LEAR ELLCEERDRT LFSGLSFTLN AGEVQITGS NGAQKTTLLR LLTGLSRPDA GEVMDQCPV MQRVDSYHKM LKWTGHQPGI KTRLTALENL HFYHRDGD-- --TAQ--CLEBO

Consensus M---L... .L.C.RGER. .F.GLSF.L. AGEAV...G. NG.GKTTLLR .LAGL..P.. G.V..... ..P-.E. .YLGH..G. K..LTV.ENL .FW..... PZ  
 0

Sito A

RHIET ATEAVLSGI SHLPFGYLSA GQQRFAFAK ELVAHRPWI LDEPTALDA SADRLFAGLI EAHLAGGGIV LAATHQPLGL KMAQELKHTG F-----AGV DRGVG----- 21  
 BRAJA SLATVGLDHA THLPRAFLSA GQRRRLSLAR LLTVRPIWI LDEPTALDA AGQDMFGGLM RDHLARGGLI IAATHMGLI -DSRELRIGG VA----- 20  
 RHOCA ALARMMMLAL EHRAAASLSA GQRRRLGLAR LLTVGRPWI LDEPTVSLDA ASVALFAEAV RAHLAAGGAA EMATHIDLGL SEARVLDLAP FKARPEAGG HRGAFDHGFD GAFI 21  
 HAEIN LLENVGLLGR EDLPAQLSA GQKRATLGR LRLSQAPLWI LDEPFTALDA KQVILLTALF DEHAQGGIV LLTSHQVPS SHLQKLNLSA Y-----KAE----- 21  
 ECOLI ALAQAGLAGF EDIPMQLSA GQRRVYALAR LMLTRATLWI LDEPFTALDA MGVDRLTQRM AQHEQGGIV ILTTHQPLNV AESKIRRSLS IQ-----TRAA----- 20

Consensus ALA:VGL.G. EHLPAALSA GQRR.ALAR LL...RP.WI LDEPTALD. .GV..F..L. .HLA.GGIV L.ATHQ.LG. ....L..... .R..... 23  
 4

Sito B

**FIGURA 7. Alineamiento de secuencia de aminoácidos y secuencia consenso de los productos proteicos predichos de los genes *ccmA* de distintas especies bacteriana. RHIET, *Rhizobium etli*; BRAJA, *Bradyrhizobium japonicum*; RHOCA, *Rhodobacter capsulatus*; HAEIN, *Haemophilus influenzae*; ECOLI, *Escherichia coli*. El cassette de unión de ATP se encuentra subrayado en los sitios A y B.**

otro. Cada transportador ABC tiene dos dominios de unión de ATP y ambos requieren ser funcionales. Así, la eliminación de uno de estos dos dominios del transportador de oligopéptidos Opp, en *Bacillus subtilis* impide su función (Hiles *et al.*, 1987). La introducción de una mutación en cualquiera de los dos dominios de unión de ATP de la P-glicoproteína o del sistema de exportación del factor- $\alpha$  de levaduras (STE6) (Azzaria *et al.*, 1989; Berkower y Michaelis 1991), reduce dramáticamente la actividad del transporte. Sin embargo, no es claro si los dos dominios de ATP son funcionalmente equivalentes. En transportadores tales como la permeasa de histidina de *S. typhimurium*, los dos dominios de unión de ATP son idénticos (Kerppola *et al.*, 1991), lo cual sugiere equivalencia funcional.

## PROTEINAS DE UNION PERIPLASMICA

Los primeros transportadores ABC caracterizados fueron los transportadores dependientes de proteínas de unión de substrato en bacterias gram-negativas. Uno de los rasgos que distinguen a este tipo de transportadores de otros sistemas de transporte activo es su sensibilidad al shock osmótico en frío (Berger y Heppel 1974), que resulta en la pérdida de proteínas específicas del periplasma. Estudios genéticos subsecuentes, demostraron que estas proteínas periplásmicas se encuentran asociadas con los sistemas de transporte y son un requerimiento indispensable para su función. Hay muy poca conservación en la secuencia entre proteínas de unión de diferentes substratos. La sola excepción son el par de proteínas periplásmicas que interactúan con el mismo complejo transmembranal (P. ej. las proteínas de unión de la histidina y lisina-ornitina-arginina, las cuales entregan substratos al complejo HisMQP en la membrana) (Higgins y Ames 1981). Estas proteínas son relativamente fáciles de purificar y han sido estudiadas en detalle. Varían en un rango de tamaño de entre 25 kDa (proteína de unión de la histidina; Higgins y Ames 1981) a 59 kDa (proteína de unión de oligopéptido; Hiles y Higgins 1986). Una gran variedad de este tipo de proteínas han sido cristalizadas y su estructura tridimensional ha sido determinada (Vyas y Quioco 1991). Todas ellas tienen una estructura similar con dos dominios globulares y una hendidura entre éstos para formar el sitio de unión del substrato. Cualquiera que sea la naturaleza del substrato parece estar unido vía puentes de hidrógeno (Vyas y Quioco 1991).

Si bien los componentes periplásmicos son requeridos para el funcionamiento de los transportadores con los que se asocian, estos no integran por sí mismos el mecanismo de translocación transmembranal.

Muchos transportadores ABC, incluyendo a todos los sistemas eucarióticos conocidos, no requieren de componentes equivalentes (Figura 5). La interacción del complejo proteína de unión-substrato con los dominios asociados con la membrana es requerida para la hidrólisis de ATP, esto implica un cambio conformacional inducido en los dominios asociados con la membrana que rodea al transportador (Petronilli y Ames 1991).

## ESPECIFICIDAD POR SUBSTRATO

En los sistemas de importación bacterianos, las proteínas de unión periplásmicas juegan un papel importante en la determinación de la especificidad por el sustrato. Sin embargo, los sistemas que no presentan proteína de unión, los dominios asociados con la membrana deben de estar involucrados con esta función. El peso de las evidencias apuntan a los dominios transmembranales, más que a los dominios de unión de ATP, como los determinantes primarios de la especificidad. Dado que las mutaciones que cambian la selectividad de un transportador invariablemente alteran los dominios transmembranales. Es así, como la delección de cuatro aminoácidos en uno de los segmentos membranales del dominio transmembranal del transportador de histidina de *S. typhimurium* (HisM) alteran la selectividad de este por L-histidol (Payne *et al.*, 1985). Similarmente, las mutaciones que permiten que el transportador de maltosa de *E. coli* pueda transportar un análogo p-nitrofenil- $\alpha$ -maltosido (normalmente no es sustrato) altera los dominios transmembranales.

Asumir que los residuos aminoácidos que contribuyen en el reconocimiento por el sustrato residen en diferentes segmentos transmembranales y lazos extramembranales es factible. Sin embargo, no es posible determinar la especificidad por el sustrato de un transportador ABC, o aun más, la clase química del sustrato a partir de la secuencia primaria. Los residuos involucrados en determinar tal especificidad serán claramente definidos cuando la organización tridimensional de los dominios transmembranales sea elucidada.

## EL PAPEL DEL ATP: Acoplamiento de energía para el transporte

Los mecanismos del acoplamiento de energía para el transporte han sido extensamente estudiado en los transportadores ABC provenientes varios sistemas biológicos (Higgins, 1992). Los requerimientos de energía

de los transportadores ABC fueron distinguidos de otros sistemas de transportadores basados en la diferente sensibilidad a los inhibidores metabólicos (Berger y Heppel 1974). Estos primeros estudios permitieron sugerir que la hidrólisis de ATP provee de la fuerza motriz para la acumulación del sustrato, en contraste con otro tipo de transportadores que aparentemente responden a un gradiente electroquímico transmembranal (Higgins, 1992; Ames y Joshi 1991). Actualmente no existe la menor duda de que la hidrólisis del ATP por los transportadores ABC provee de la fuerza motriz para la acumulación de sustrato. La estimación estequiométrica de dos moléculas de ATP hidrolizadas por molécula de sustrato transportada (Mimmack *et al.*, 1989) es también consistente con dos dominios equivalentes, cada uno hidroliza una molécula de ATP por ciclo de transporte.

La primera evidencia indirecta del papel del ATP, fue el reconocimiento de un motivo consenso de unión de ATP (motivo Walker) en las subunidad de varios transportadores (Walker *et al.*, 1982; Figura 7) Este motivo conservado ha sido encontrado en todas las proteínas ABC que han sido subsecuentemente caracterizadas. Las proteínas ABC no tan solo unen ATP, sino que la unión de este es esencial para su función. Mutaciones provocadas en el sitio de unión de varios transportadores inhibe su actividad (Azzaria *et al.*, 1989; Berkower y Michaelis 1992). En sistemas vesiculares derivados de la membrana celular, los transportadores de maltosa e histidina de *E. coli* y el transportador de P-glicoproteína en humano mostraron un requerimiento absoluto de ATP (Horio *et al.*, 1988).

El requerimiento de ATP no necesariamente implica que su hidrólisis energice el transporte. La unión del ATP puede, potencialmente, jugar un papel estructural o regulatorio. Sin embargo, ningún análogo no-hidrolizable del ATP es capaz de soportar el transporte activo (Horio *et al.*, 1988; Ames *et al.*, 1989). Estudios más recientes han demostrado que la hidrólisis de ATP ocurre concomitantemente con el transporte. (Bishop *et al.*, 1989).

Debido a la ausencia de datos estructurales, no se sabe cómo los transportadores ABC acoplan la energía de hidrólisis del ATP. Sin embargo, no hay evidencia que involucre una proteína fosforilada como intermediario (aunque varios transportadores ABC de eucariontes se encuentran fosforilados como un evento regulatorio, que no tiene nada que ver con los mecanismos de acoplamiento de energía). Estos mecanismos difieren de la ATPasa-fosfato, la cual involucra a un intermediario fosforilado (Pedersen y Carafoli 1987). Las características diferencias en secuencia entre los

transportadores ABC y la ATPasa-fosfato también sugiere que son mecanísticamente diferentes. La ausencia de un intermediario fosforilado sugiere que la unión e hidrólisis del ATP induce un cambio conformacional en el dominio de unión de ATP, el cual es transmitido vía interacción dominio-dominio, a las subunidades hidrofóbicas que median la translocación a través de la membrana (Higgins 1992).

## BIOGENESIS DE CITOCROMOS DE TIPO C

Los citocromos de tipo c son transportadores de electrones ampliamente distribuidos entre los organismos procariotes. En contraste con otro tipo de citocromos, los citocromos de tipo c tienen el grupo prostético hemo (Protohemo IX) unido covalentemente a la apoproteína. En las bacterias gram-negativas, la holoproteína madura se encuentra localizada en el lado periplásmico de la membrana citoplásmica y, se puede encontrar tanto en forma soluble como asociada con la membrana. En la mayoría de los casos, asociada en un supercomplejo con otros pares redox que conforman la cadena de transporte de electrones o cadena respiratoria (Pettigrew y Moore 1987).

La estructura primaria del precursor polipeptídico de los citocromos de tipo c exhibe dos características principales: posee una secuencia señal en el extremo amino terminal con las características típicas de una secuencia de exportación y, un motivo C-X-X-C-H, representando el sitio de unión covalente del grupo hemo. Así, la maduración de los citocromos de tipo c involucra la translocación del precursor protéico a través de la membrana y la unión covalente del grupo hemo.

En la mayoría de los casos la secuencia señal es removida durante el proceso de maduración y el citocromo c es liberado en el periplasma, o como en el caso del citocromo c<sub>1</sub> de *B. japonicum*, , permanece anclado en la membrana citoplásmica mediante su porción carboxilo terminal hidrofóbica (Thöny-Meyer *et al.*, 1991). En otros casos, después de la translocación, algunos citocromos de tipo c quedan unidos a la membrana mediante la secuencia señal no procesada (P. ej. CycM, FixX y FixP en *Bradyrhizobium japonicum*, y c<sub>550</sub> en *Bacillus subtilis*) (Bott *et al* 1991; Preisig *et al* 1993; Jenney y Daldal 1993; Wachenfeldt y Hederstedt 1990a).

Del proceso de maduración de los citocromos de tipo c surgen varias preguntas: (I) ¿ Cuáles son los pasos requeridos para la biosíntesis de un citocromo c funcional ? Basados en los elementos conservados en la

estructura del precursor protéico, al menos dos pasos parecen ser esenciales: la exportación de la apoproteína al lado periplásmico de la membrana y la unión del grupo hemo a la apoproteína.

(II) ¿ En donde ocurren los diferentes pasos individuales?

Esta pregunta es de particular interés en relación al pegado del grupo hemo. En teoría tres posibilidades pueden ocurrir: la unión de grupo hemo puede ocurrir en el citoplasma, en la membrana, o en el periplasma.

(III) ¿Cuál es el orden temporal en el cual ocurren los diferentes eventos en el proceso de maduración y, cómo son ellos coordinados? Por ejemplo: el grupo hemo es unido antes, durante o después de la translocación de la apoproteína.

(IV) Finalmente, ¿cuáles son los mecanismos en cada paso y cuáles son las enzimas involucradas ?

Recientes hallazgos experimentales han permitido la identificación de cuando menos nueve genes directamente relacionados con la biogénesis de los citocromos de tipo c en bacterias (Thöny-Meyer *et al.*, 1994)

Paralelamente, el análisis bioquímico realizado sobre el proceso de maduración de los citocromos de tipo c en mitocondrias y cloroplastos, han contribuido significativamente en el conocimiento actual en la biogénesis de este tipo de citocromos (Glick *et al.*, 1992; Stuart y Neupert 1990; Hartl y Neupert 1990; Jensen *et al.*, 1992; Dumont *et al.*, 1987; Howe y Merchant 1992; 1993).

## **Exportación de la apoproteína y del grupo hemo en Bacterias**

En bacterias, la presencia en los pre-apocitocromos c de una secuencia señal cargada positivamente, con un segmento de cuando menos diez residuos hidrofóbicos seguidos normalmente de un sitio de corte para la peptidasa líder, sugiere que estas proteínas son secretadas a través de la maquinaria común de secreción (*sec*) de la célula bacteriana (Pugsley 1993). El péptido señal de varios citocromos c ha demostrado ser funcional en dirigir la fusión de una proteína pasajera (fosfatasa alcalina; PhoA) a través de la membrana (Brandner *et al.*, 1991; von Wachenfeldt y Hederstedt 1990b). Estas características señalan que el sitio funcional de

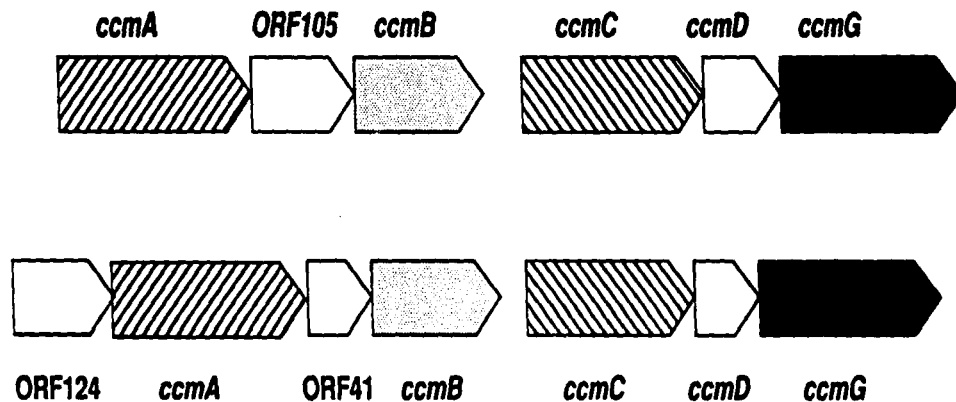
los citocromos de tipo c se encuentra del lado periplásmico de la membrana plasmática (Pettigrew y Moore 1987).

Un cuestionamiento interesante con respecto a la translocación de citocromo c es si el grupo hemo se une a la apoproteína antes, durante o después de ser exportada. Probablemente la mejor evidencia que se tiene con relación a la formación del pre-apocitocromo c y su subsecuente translocación dentro del periplasma sin la unión del el grupo hemo, provienen de estudios con citocromo c<sub>550</sub> y cd<sub>1</sub> de *P. denitrificans* (Page y Ferguson 1989; 1990). Los correspondientes citocromos fueron detectados inmunológicamente en el periplasma de las cepas mutantes que fueron incapaces de producir holocitocromos. Esto sugiere, que la unión del grupo hemo ocurre después de que el precursor es translocado. Esto parece ser razonable, dado que la unión del grupo hemo a la apoproteína antes de la translocación puede generar varias restricciones sobre la estructura tridimensional del precursor, el cual, independientemente de la secuencia señal, puede no llenar lo requisitos de las proteínas de exportación dependiente del sistema *sec*.

Varias mutantes deficientes en citocromos de tipo c de *B. japonicum* y *R. capsulatus* mostraron ser defectivas en genes que codifican para un supuesto translocador que es absolutamente necesario para la biogénesis de citocromos de tipo c. Los genes *ccmA* y *ccmB* de *B. japonicum* (denominados anteriormente *cycV* y *cycW*, respectivamente) fueron altamente homólogos a los genes *ccmA* y *ccmB* de *R. capsulatus* (denominados primeramente *helA* y *helB*, respectivamente; Ramseier *et al.*, 1991; Beckman *et al.*, 1992) (Figura 8). El gene *ccmA* en ambas especies bacterianas codifica para una proteína homóloga a la subunidad unidora de ATP de un translocador de tipo ABC (Hyde *et al.*, 1990), Mientras que el gene *ccmB* codifica para una proteína hidrofóbica, integrada a la membrana con seis hélices transmembranales (una típica característica de subunidades formadoras de canales de translocadores de tipo ABC). Así, CcmA y CcmB son proteínas candidatas para formar parte de transportador ABC requerido para la translocación de una molécula específica para la síntesis del citocromo c maduro. Tal clase de sustrato parecería ser apocitocromo c, el hemo, o ambos juntos.

Con el fin de probar si *ccmA* y *ccmB* están involucrados en la exportación del apocitocromo c, se construyó una fusión con el péptido señal de la porción amino terminal del citocromo c y la fosfatasa alcalina. Esta fusión fue introducida en mutantes con un fondo *ccmAB*<sup>-</sup> (en *R. capsulatus*) y *ccmB*<sup>-</sup> (en *B. japonicum*) y la expresión de la fosfatasa

## *B. japonicum*



## *R. capsulatus*

0.5 kb

Figura 8. Organización comparativa del conjunto de genes *ccmABCDG* en *B. japonicum* y *R. capsulatus*. Genes homólogos son representados en un mismo patrón. Genes sin homología están representados de color blanco. Aunque el producto de los genes *ccmD* son similares el uno con el otro con respecto a su pequeño tamaño, extremo amino terminal hidrofóbico y su extremo carboxilo terminal hidrofílico, ellos no exhiben homología en su secuencia de aminoácidos. Los marcos abiertos de lectura ORF105 y ORF41 son claramente diferentes el uno del otro.



alcalina; una enzima cuya actividad depende de su correcta localización en el periplasma, fue medida. La actividad obtenida fue igual que en la cepa silvestre (Beckman *et al.*, 1992; Thöny-Meyer *et al.*, 1994), lo cuál arguye en contra el posible papel que tienen el producto de estos genes en el transporte de la apoproteína. Estos ensayos son indirectos, y aunque si bien se carece de evidencias directas sobre el transporte del apocitocromo c en mutantes *ccm*<sup>-</sup>: ninguno de los citocromos c<sub>1</sub>, CycM, c<sub>550</sub> de *B. japonicum*, o citocromo c<sub>2</sub> de *R. capsulatus* fueron reveladas por inmunodetección. Probablemente debido a la alta inestabilidad del correspondiente intermediario.

Es importante hacer notar que en *R. capsulatus*, *ccmA* y *ccmB* se encuentran localizados corriente abajo de los genes *secD* y *secF* (Beckman y Kranz 1993), los cuales están involucrados en el último paso de la exportación de las proteínas (Gardel *et al.*, 1993; Matsuyama *et al.*, 1993). En bacterias los genes involucrados en funciones relacionadas, normalmente se encuentran organizados en grupos. Esto sugiere una función secretora de los genes *ccmAB* en *R. capsulatus*.

Mutantes *ccmAB*<sup>-</sup> en *B. japonicum* y *R. capsulatus* llevan a cabo una biosíntesis normal del grupo hemo, dado que son capaces de producir citocromos de tipo b. El último paso en la biosíntesis del hemo es la incorporación del hierro dentro del anillo de porfirina. Este paso es catalizado por la ferroquelatasa; una enzima de la membrana citoplásmica. En mitocondria, se ha propuesto que el sitio de actividad de esta enzima, es el lado interno de la membrana interna de este organelo (Dailey 1990). Así, la biosíntesis del grupo hemo es completada en el lado de la matriz, y por lo que el grupo hemo debe pasar de algún modo a través de la membrana. Ha sido establecido que la biogénesis de los citocromos de tipo c involucra un paso para la unión de el grupo hemo en el espacio intermembranal (Nicholson *et al.*, 1989; Nicholson y Neupert 1989), pero se desconoce de que manera el grupo hemo alcanza este compartimiento.

Recientemente se purificó una ferroquelatasa bacterial de membranas de *B. japonicum* (Frustaci y O'Brian 1992) y, su correspondiente gene (*hemH*) fué clonado y secuenciado tanto en *B. japonicum* como en *E. coli* y *B. subtilis* (Frustaci y O'Brian 1992; Miyamoto *et al.*, 1991; Hansson y Hederstedt 1992). De su homología con la ferroquelatasa mitocondrial se pudo inferir una localización y orientación similar de esta enzima en la membrana citoplásmica y, consecuentemente un mecanismo de exportación del grupo hemo entre bacterias y mitocondrias comparable. Por lo tanto, un posible candidato

para la exportación del grupo hemo en bacterias puede ser el transportador ABC conformado por los productos CcmAB.

El grupo hemo es una pequeña molécula lipofílica, que bien puede alcanzar el periplasma penetrando la membrana citoplásmica. Sin embargo, el grupo hemo se une fuertemente a las proteínas y, en células eucariontes siempre se encuentra unido a ellas. Por lo tanto, y aunque si bien, no puede ser excluida una libre difusión del grupo hemo a través de la membrana, es muy probable que en la exportación de este grupo hacia el periplasma se encuentre involucrado un translocador proteico. Adicionalmente, es sabido que ocurre transporte activo del grupo hemo a través de las membranas en bacterias que utilizan el grupo hemo como fuente de hierro (Henderson y Payne, 1993; Stojiljcovic y Hantke, 1992). Aunque si bien, en éste caso, el correspondiente translocador media la importación más bien que la exportación, se pone de manifiesto la presencia de un mediador proteico en el ingreso del grupo hemo en bacterias.

Los productos de *ccmAB* no comparten homología significativa con otras proteínas con función conocida. CcmB tampoco poseen un motivo detectable de unión no covalente con el grupo hemo. Aunque es probable que este motivo se encuentre distribuido a lo largo de sus hélices transmembranales, lo cual hace difícil distinguirlo.

El supuesto transportador CcmAB puede contener subunidades adicionales. En *R. capsulatus* y *B. japonicum* el gene corriente abajo de *ccmB*, denominado *ccmC* (antes denominados *helC* y ORF263, respectivamente), es requerido para la biogénesis de los citocromos de tipo c. El papel del gene *ccmC* en *B. japonicum*, es aún incierto. El producto del gene *ccmC* en ambas especies bacterianas contienen seis hélices transmembranales y, pueden representar una subunidad adicional del aparato de translocación CcmAB. Un motivo de unión no covalente con el grupo hemo con una limitada homología puede ser detectado en estas proteínas (Thöny-Meyer *et al.*, 1994) (Figura 9). En *B. japonicum* y *R. capsulatus* corriente abajo del gene *ccmC* se encuentra el gene *ccmD* (anteriormente denominados *cycX* y *held*, respectivamente). Este gene codifica para un pequeño polipéptido con una secuencia señal (Ramseier *et al.*, 1991; Beckman *et al.*, 1992) que es esencial para la biogénesis de los

|                       |     | <b>A</b>        |
|-----------------------|-----|-----------------|
| Rc Ccl1               | 235 | W G G F W F W D |
| Bj CycK               | 234 | W G G F W F W D |
| Ec 0552               | 218 | W G G F W F W D |
| Rc CcmC               | 117 | W G T W W E W D |
| Bj CcmC               | 120 | W G T W W E W D |
|                       |     | <b>B</b>        |
| Rc Ccl2               | 41  | R C P V C Q     |
| Bj CycL               | 41  | R C M V C Q     |
| Sc CCHL               | 25  | G C P V M H     |
| Sc CC <sub>1</sub> HL | 9   | K C P V D E     |
| Nc CCHL               | 66  | R C P V D H     |
| Sc HAP1               | *   | R C P V D H     |

**Figura 9. Presumibles motivos de unión del grupo hemo. Los números a la derecha de los motivos marcan la posición en sus correspondientes proteínas. A. Rc: *R. capsulatus*; Bj: *B. japonicum*; Ec: *E. coli*; 0552, ORF\_0552. B. Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Nc: *Neurospora crassa*; CC<sub>1</sub>HL, citocromo c<sub>1</sub> hemo liasa; \*, el motivo es repetido 7 veces en HAP1.**

citocromos de tipo c. Sin embargo, no hay evidencia de su función precisa, además de que ellos no comparten homología el uno con el otro (Figura 8).

Se ha sugerido que el presunto transportador CcmAB acopla la translocación del grupo hemo con la del apocitocromo con el fin de facilitar su subsecuente unión. Esta especulación es atractiva en vista de la cercana vecindad de los genes *ccmAB* con los genes *secDF* en *R. capsulatus* (Beckman y Kranz 1993), los cuáles están involucrados en uno de los últimos pasos de la exportación de proteínas (Gardel *et al.*, 1990; Matsuyama *et al.*, 1993).

El ensamblaje final para la formación de un citocromo c funcional requiere de la ligación del apocitocromo c con el grupo hemo vía uniones tioéster. El ligamiento ocurre a nivel de dos residuos distintos de cisteínas del apocitocromo c (sitio de unión covalente para el grupo hemo; C-X-X-C-H), con los residuos vinilo 2 y 4 del grupo hemo (Taniuchi *et al.*, 1983). Estudios llevados a cabo con citocromo c mitocondrial, han demostrado que las uniones tioéster no ocurren espontáneamente bajo condiciones fisiológicas. Estas son catalizadas enzimáticamente por la citocromo c hemoliasa, también denominada citocromo c sintetasa (CCHL y CC<sub>1</sub>HL, para citocromos c y c<sub>1</sub>, respectivamente), las cuales hasta el momento solo han sido identificadas en mitocondrias (Dumont *et al.*, 1987; Nicholson *et al.*, 1989).

Por otro lado, los sitios de unión del grupo hemo en la apoproteína deben de estar en su estado reducido antes de que la ligación se lleve a cabo. Estudios realizados en mitocondria de *Neurospora crassa*, demostraron que la reducción del grupo hemo por el NADH y flavín nucleótidos es un prerrequisito indispensable para que esta reacción se lleve a cabo (Nicholson y Neupert 1989). Por lo tanto, parece factible predecir la presencia en bacterias de los pasos enzimáticos semejantes para la preparación del grupo hemo y la del apocitocromo para la reacción de ligación, así como la existencia de la enzima hemoliasa *per se* (CCHL). Candidatas para tales enzimas auxiliares y para la hemoliasa; las cuáles no han sido identificadas hasta la fecha en ningún sistema bacteriano, han sido propuestas.

El gene *ccmG* de *R. capsulatus* (anteriormente denominado *helX*) que se encuentra localizado corriente abajo del grupo de genes *ccmABCD* (Figura 8). Este gene es esencial en la biogénesis de los citocromos de tipo c. Deleciones en él, producen mutantes que son incapaces de crecer fotosintéticamente (Beckman y Kranz 1993). *ccmG* codifica para una proteína periplásmica que no se requiere para la síntesis o secreción del apocitocromo  $c_2$  al periplasma (Beckman y Kranz 1993). Este gene es significativamente homólogo a varias tiorredoxinas de plantas, algas y bacterias, tales como: DsbA de *E. coli* (Bardwell,etal 1991) y TspG de *Vibrio cholerae* (Peek *et al.*, 1992). Estas dos últimas tiorredoxinas son miembros de una clase de proteínas periplásmicas requeridas para la formación de enlaces disulfuro durante la maduración de algunas proteínas que son secretadas (Beckman y Kranz 1993). Por lo que la función de CcmG podría ser la reducción de los tioles de los residuos de cisteína de las apoproteínas que se pegan al grupo hemo. En *B. japonicum* se reportó una proteína semejante que es codificada por el gene *ccmG* (anteriormente denominando *cycY*), ubicado corriente abajo del gene *ccmD*. La localización de la proteína CcmG en *R. capsulatus*, es muy probablemente en el lado periplásmico de la membrana, debido al hecho de que su secuencia señal es capaz de exportar a la fosfatasa alcalina (Beckman y Kranz 1993), por lo que su correspondiente contraparte en *B. Japonicum* (CcmG), muy probablemente también lo haga, en virtud de poseer una extensión semejante a una secuencia señal que se translapa con el codón de paro del gene *ccmD* (Thöny-Meyer *et al.*, 1994). Es importante mencionar que en *B. japonicum*, se ha demostrado la existencia de otra proteína ubicada en el espacio periplásmico con características de una tiorredoxina, que esta involucrada en la biogénesis del citocromo  $a+a_3$ , pero no del citocromo c (Loferer *et al.*, 1993).

En *R. capsulatus* se ha analizado un segundo locus de genes involucrados en la biogénesis de los citocromos de tipo c, los genes *ccl1* y *ccl2* (Beckman *et al.*, 1992; Biel y Biel 1990) (Figura 10). El producto del gene *ccl1* es una proteína integrada a la membrana que comparte homología con varios ORF's mitocondriales y cloroplásticos (Beckman *et al.*, 1992). Por otro lado, *ccl2* codifica para una proteína predominantemente hidrofílica, con una secuencia señal consenso en el extremo amino terminal (Beckman *et al.*, 1992), El análisis genético de una cepa mutante *ccl1*<sup>-</sup> de *R. capsulatus*, con una proteína híbrida citocromo  $c_2$ /fosfatasa alcalina, demostraron que esta proteína híbrida es capaz de ser translocada al

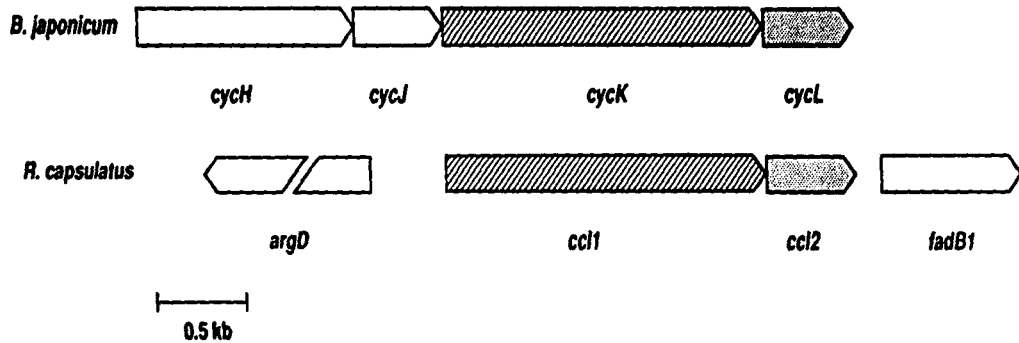


Figura 10. Organización comparativa del conjunto de genes *cycH/JKL* de *B. japonicum* y *ccl1/2* de *R. capsulatus*. Genes homólogos son representados en un mismo patrón. Genes sin homología están representados de color blanco.

espacio periplásmico. Evidentemente, la función de la proteína codificada por el gene *ccl1* no es la de exportar a los citocromos tipo c, por lo tanto, bien puede funcionar como una citocromo c hemoliasa, o como una chaperonina periplásmica, o estar involucrado en modificaciones necesarias del apocitocromo c o el hemo para que pueda llevarse a cabo su unión (Beckman *et al.*, 1992).

Recientemente se secuenció una región de DNA de *B. japonicum* conteniendo los genes *cycHJKL*. (Figura 10). El producto de los genes *cycKL* mostraron similitudes de un 77-73% con los productos de los genes *ccl1/2* de *R. capsulatus* (Ritz *et al.*, 1993, 1995). También recientemente en el Laboratorio del Dr. Mario Soberón se clonó una región de DNA de *R. etli* conteniendo al gene *cycH*. El análisis de la secuencia nucleotídica de esta región reveló la presencia del gene *cycJ* y un ORF incompleto con homología con el gene *cycK*. Ambos genes se encontraron en el extremo 3' de *cycH* (Tabcher, 1995). *E. coli* aparentemente también posee genes homólogos a *ccl1/2* y *cycKL* denominados ORF\_0552 y ORF\_0127 en el minuto 92.4 del cromosoma (Blattner *et al.*, 1993). Estos genes forman parte del grupo de genes *nrf*, los cuales codifican para la tetrahemo nitrato reductasa de la vía de reducción del nitrato dependiente de formiato (Darwin *et al.*, 1993).

Actualmente, no se ha encontrado una homología significativa entre el producto de los genes *ccl1/2* y *cycKL* con proteínas con función conocida. No obstante, se ha propuesto la presencia en estas proteínas de motivos de unión de grupo hemo (Beckman *et al.*, 1992) (Figura 9).

(i) El motivo w-G-X-X-W-X-W-D no tan solo fué encontrado en CycL, sino también en CcmC. Esto bien puede ser una indicación de que no solo la función de CycL sino también la de CcmC está relacionada con la unión del grupo hemo; una propiedad asociada con la hemoliasa CCHL, así como también con transportadores/translocadores del grupo hemo. Este motivo aparentemente se encuentra ampliamente distribuido y ha sido detectado en varios ORFs de mitocondria y cloroplasto, por ejemplo: el ORF509 mitocondrial de *Marchantia polymorpha* y el ORF320 de cloroplasto (Shuster *et al.*, 1993; Ohyama *et al.*, 1988).

(ii) El motivo R-C-P-V-C-Q en el producto del gene *ccl2* en *R. capsulatus* al igual que R-C-M-V-C-Q en CycL en *R. japonicum* son similares a el sitio R-C-P-V-D-H de la proteína regulatoria hemo activador (HAP1) de levadura (Creusot *et al.*, 1988) y a un motivo encontrado en CCHL

mitocondrial (Dumont *et al.*, 1987) (Figura 9) Aunque la unión del hemo en cualquiera de estas proteínas que contienen tal motivo parece plausible, éste no ha sido demostrado experimentalmente en ninguna de ellas. Diferentes funciones pueden ser pronosticadas para estas proteínas periplásmicas capaces de unir hemo en la biogénesis de citocromo c: en el pegado del hemo a la apoproteína (CCHL); reducción de hemo a la forma  $Fe^{2+}$ ; prevención de la liberación del hemo en libre solución o dentro del ambiente hidrofóbico de la membrana.

En contraste a *R. capsulatus*, donde el operón *ccl* se encuentra localizado corriente arriba de, y en dirección opuesta a *argD* (un gene involucrado en la biosíntesis de la arginina), los genes homólogos en *B. japonicum* están agrupados corriente abajo de dos genes asociados con la biogénesis de citocromo c, *cycH* y *cycJ* (Figura 10) (Ritz *et al.*, 1993, 1995). Mutantes en el gene *cycH* carecen de todo tipo de holocitocromo c con excepción de citocromo  $c_1$  y son incapaces de fijar nitrógeno. Esta proteína no muestra ninguna homología con otras proteína con función conocida. La proteína *CycH* se encuentra anclada a la membrana en su extremo amino terminal por la mayor parte del polipeptido. El producto predicho del gene *cycJ* comparte homología con la proteína de unión a clorofila CP47 de la cianobacteria *Synechocystis sp.* (Haag *et al.*, 1993). Es posible que el producto de los genes *cycHJKL* formen parte de un complejo enzimático unido a la membrana. Aunque si bien, no fué encontrada una fuerte homología con las hemoliasa mitocondriales, se ha sugerido que en bacterias estos genes codifican para un gran complejo hemoliasa diferentes de las conocidas en eucariontes (Thöny-Meyer *et al.*, 1994).

En levadura hay dos clases de hemoliasas (CCHL y  $CC_1HL$ ), cada una es específica para la formación de citocromo c como citocromo  $c_1$ , respectivamente. El fenotipo de una mutación en *cycH*<sup>-</sup> en *B. japonicum* sugiere que esta bacteria también requiere de dos actividades enzimáticas para unión del grupo hemo: uno para el citocromo  $c_1$  y otro para la unión de citocromos de tipo c. El citocromo  $c_1$  puede contener un sitio de empaquetamiento suficientemente diferente para aquellos citocromos de tipo c, por lo cuál requiere de una actividad  $CC_1HL$  separada. Sin embargo, en otras bacterias no ha sido identificada una sola mutación que cause la deficiencia de todo los citocromos de tipo c con excepción de citocromo  $c_1$ . Probablemente, la hemoliasa de los citocromos c (CCHL) de ciertas bacterias tiene una amplia especificidad por el substrato y posee la capacidad de unir tanto citocromo c como  $c_1$ , mientras en otras bacterias, como en el caso de *R. japonicum* se requiere de dos enzimas para llevar a cabo esta reacción.



## CORTE PROTEOLITICO DEL PEPTIDO SEÑAL

Una vez que los citocromos de tipo c solubles son translocados al periplasma su secuencia lider es removida por una peptidasa señal. Esta peptidasa reconoce un típico sitio de corte, el cual consistente en un pequeño e incambiable número de residuos en la posición -1 y -3; frecuentemente, alanina o glicina. La única peptidasa señal caracterizada en sistemas bacterianos en los cuales la biogénesis de los citocromos de tipo c está implicada es la de *R. capsulatus* (Wieseler *et al.*, 1992). Esta enzima es capaz de procesar proteolíticamente al apocitocromo c2 *in vitro*.

En mitocondrias de *N. crassa* se ha demostrado que el grupo hemo es ligado a apocitocromo c<sub>1</sub> antes de que éste sea procesado por la peptidasa señal (Nicholson *et al.*, 1989). Similarmente, en *B. japonicum* el grupo hemo es ligado al precursor del citocromo bc<sub>1</sub> independientemente de que el procesamiento de la secuencia señal se encuentra inhibido por mutación (Thöny-Meyer *et al* 1991). Esto sugiere que la unión del hemo no es requerida para que el procesamiento se lleve a cabo o bien que los dos pasos son independientes el uno del otro. Desafortunadamente, una mutante deficiente en el sitio de unión del grupo hemo del precursor de los citocromos bc<sub>1</sub> no fué detectado inmunológicamente, probablemente por su inherente inestabilidad. Por lo tanto, es imposible determinar en este caso si el procesamiento de la secuencia señal ocurre o no.

La conclusión de que el procesamiento ocurre después, o independiente de la unión del hemo es apoyada por el hecho de que varios citocromos de tipo c poseen un extremo amino terminal muy semejante a una secuencia lider, por ejemplo: CycM de *B. japonicum*, la proteína cy de *R. capsulatus* y citocromo c550 de *B. subtilis* (Bott *et al* 1991; Preisig *et al* 1993; Jenney y Daldal 1993; Wachenfeldt y Hederstedt 1990a). Estos citocromos difieren de los citocromos de tipo c solubles, en que poseen una porción hidrofóbica en el extremo amino terminal con la que quedan anclados a la membrana durante el proceso de maduración. Por lo tanto, la maduración puede progresar para dar un citocromo c funcional, sin que el procesamiento proteolítico de la secuencia señal sea un requisito para la unión covalente del grupo hemo a la apoproteína.

## PLEGAMIENTO Y ENSAMBLE

El plegamiento del holocitocromo *c* representa el último de los pasos en la vía de maduración y es seguido por el ensamblaje con otros citocromos para formar un complejo respiratorio.

Con el fin de determinar cual parte de citocromo *c*<sub>2</sub> de *R. sphaeroides* (el producto del gene *cyca*) es necesaria para su exportación, unión covalente con el grupo hemo, reactividad redox no específica (actividad de peroxidasa dependiente del grupo hemo) y actividad fisiológica relevante (crecimiento fotosintético), fué creado un juego de proteínas híbridas de citocromo *c*<sub>2</sub> con fosfatasa alcalina con idéntico extremo amino terminal, pero diferentes porciones de citocromo *c*<sub>2</sub> y luego fueron probados para las actividades arriba mencionadas (Brandner *et al.*, 1991). Los resultados de estos experimentos demostraron que la secuencia señal fué suficiente para dirigir todas las proteínas híbridas al periplasma. El crecimiento fotosintético de una mutante *cyca*<sup>-</sup> fué restaurado por una proteína híbrida que carecía de los últimos cinco aminoácidos del extremo carboxilo terminal de *CycA*. El sitio de unión covalente del grupo hemo C-X-X-C-H fué suficiente para la unión del hemo, independientemente de la ausencia de la mayor parte del extremo carboxilo terminal incluyendo el supuesto sexto ligando (metionina) del grupo hemo. Tres de cuatro proteínas híbridas manifestaron actividad de peroxidasa, mientras que una de longitud intermedia no lo hizo. Esto puede ser explicado en base al hecho de que el sitio de la fusión determina la estructura tridimensional hasta cierto punto, y en algunos casos el apropiado plegamiento no es posible. Un razonamiento similar puede explicar porqué el contenido de hemo de las proteínas híbridas no siempre fué suficiente para restaurar el crecimiento fotosintético.

Una mutante en el complejo citocromo *bc*<sub>1</sub> de *B. japonicum* carente del sitio de corte de la peptidasa señal aparentemente se pliega correctamente. La actividad de peroxidasa del producto no procesado al igual que la actividad de TMPD oxidasa fueron similares a la de la cepa silvestre, de igual manera, la habilidad de fijar nitrógeno durante la simbiosis no fué alterada, lo cuales solo es factible en presencia de un complejo *bc*<sub>1</sub> funcional (Thöny-Meyer *et al.*, 1991). Estos resultados, aparentemente son debidos a que el citocromo *c*<sub>1</sub> es anclado a la membrana mediante su porción hidrofóbica amino terminal. Así su correcta localización en el complejo *bc*<sub>1</sub> no es significativamente alterada por la secuencia señal no procesada, la cual, al menos en el caso de *B. japonicum*, produce una fusión bifuncional del péptido *bc*<sub>1</sub> (Thöny-Meyer

*et al.*, 1989). Curiosamente, una mutación Tn5 en el extremo carboxilo terminal, produce una terminación prematura del citocromo  $c_1$ , justo después del sitio de unión covalente del grupo hemo que impide el correcto ensamblaje del complejo citocromo  $bc_1$ . En esta mutante no hubo detección inmunológica de ninguno de los péptidos que conforman al complejo  $bc_1$  (citocromos b,  $c_1$  y la proteína de Rieske fierro azúfre) al igual que la proteína CycM (Thöny-Meyer *et al.*, 1989). Estas mismas características fueron encontradas en una mutante de *B. japonicum* deficiente en el sitio de unión covalente del grupo hemo en el citocromo  $c_1$  (Thöny-Meyer *et al.*, 1991). Un resultados similares fueron obtenidos en *R. capsulatus* y *R. sphaeroides*, en donde una deleción en el citocromo  $c_1$  en el sitio de anclaje membranar, en el extremo carboxilo terminal da como resultado la inestabilidad y degradación del complejo  $bc_1$  (Davidson *et al.*, 1992; Konishi *et al.*, 1991). En contraste, el reemplazamiento de la metionina responsable del sexto ligando con el grupo hemo de citocromo  $c_1$  de *R. sphaeroides* por leucina retiene a todos los polipéptidos del complejo  $bc_1$  (Konishi *et al.*, 1991). Estos resultados sugieren que citocromo  $c_1$  tiene al menos dos dominios funcionales. El sitio de unión covalente del grupo hemo y la porción hidrofóbica del extremo amino terminal del citocromo  $c_1$ , son importantes para el correcto plegamiento de la proteína madura y el ensamble de otros citocromos en el complejo respiratorio  $bc_1$ .

## ANTECEDENTES.

### Aislamiento y Caracterización de Mutantes de *R. etli* con Alteraciones en la Expresión de citocromos y la Fijación de Nitrógeno.

En varios trabajos previos (Soberón *et al.*, 1989, 1990, 1993; Miranda *et al.*, 1996), se reportó el aislamiento y la caracterización de cepas mutantes de *R. etli* con alteraciones en la cadena respiratoria. Estas mutantes se identificaron por su capacidad para oxidar el colorante TMPD. Este colorante es oxidado por la cadena respiratoria a nivel de citocromos c y a+a<sub>3</sub>, ya que una mutante que carece de ambos citocromos, o solo del citocromo a+a<sub>3</sub> no puede oxidar TMPD (O'Brian y Maier, 1987).

Las cepas mutantes fueron aisladas después de tratamientos mutagénicos con el transposon Tn5 o con el fago mini-Mu, seleccionando solamente aquellas células alteradas en su capacidad de oxidar el colorante TMPD; incapaces de oxidarlo (TMPD<sup>-</sup>).

La cepa CFN4201 es una mutante TMPD<sup>-</sup> inducida por una sola inserción de Tn5, expresa niveles bajos de citocromos b y c, tiene aumentada la expresión de los citocromos oxidasas terminales, además de tener niveles reducidos de las actividades de NADH, succinato y TMPD oxidasa. Los nódulos formados por esta cepa no fijan nitrógeno (Fix<sup>-</sup>). Las plantas inoculadas con esta cepa solo contiene el 10% de nitrógeno total encontrado en la cepa silvestre (Soberón *et al.*, 1989). Esta cepa posee un fenotipo muy similar a aquellas cepas aisladas en *B. japonicum* que están afectadas en la biogénesis de los citocromos de tipo c (O'Brian y Maier 1987).

Las cepas CFN4202 e IFC01 fueron aisladas después de mutagenizar a la cepa silvestre con el fago mini-Mu y el transposón Tn5, respectivamente. Estas cepas presentan niveles disminuidos de citocromos tipo c, forman nódulos pero no infectan (CFN4202) o infectan muy poco (IFC01), y ninguna de ellas es capaz de fijar nitrógeno (Soberón *et al.*, 1993; García, 1992 y Tabche 1995). Se ha reportado que ambas mutantes están afectadas en el gene *cycH* (Tabche 1995), el cual se piensa que codifica, junto con los genes *cycJK* y *L* para una enzima que tiene como función la de unir covalentemente el grupo hemo a los citocromos tipo c (Thöny-Meyer, 1994). La mutante CFN4201 también presenta niveles muy reducidos de citocromos tipo c y tiene un fenotipo Fix<sup>-</sup> (ver arriba). Esta mutante está afectada en la biogénesis de los citocromos tipo c. El fenotipo

Fix<sup>-</sup> de las cepas CFN4201, CFN4202 y IFC01 afectadas en la biogénesis de los citocromos tipo c sugiere que existe una vía respiratoria que utiliza preferentemente a los citocromos de tipo c y que ésta es esencial en los primeros estadios de la interacción simbiótica y para sustentar la actividad de la nitrogenasa.

El fenotipo de todas estas mutantes indudablemente indica que en *R. etli* existe una correlación entre la respiración bacteriana y la fijación simbiótica de nitrógeno. El análisis de las secuencias nucleotídicas de las inserciones de los Tn5 y del mini-Mu en las cepas mutantes IFC01 y CFN4202, demostraron que estas cepas se encuentran afectadas en la biogénesis de los citocromos de tipo c a nivel de la probable hemoliasa.

La obtención y caracterización a nivel molecular de mutantes, con lesiones bien definidas, en cada uno de los pasos del proceso de la biogénesis de los citocromos de tipo c, ha sido de gran utilidad para determinar la participación de este tipo de citocromos en las diferentes cadena de transporte de electrones. Además de brindar información que permitirá identificar los pasos que se requieren para la maduración de estos citocromos y de esta manera poder proponer un esquema de la vía de síntesis de los citocromos de tipo c en *R. etli*.

## **O B J E T I V O**

### **CARACTERIZACION DE MUTACIONES QUE AFECTAN LA EXPRESION DE CITOCROMOS Y LA FIJACION DE NITROGENO EN *Rhizobium etli*.**

En nuestro laboratorio el aislamiento y caracterización de mutantes respiratorias de *R. etli* nos ha permitido determinar el papel de algunos componente de la cadena respiratoria en los procesos de infección de la planta de frijol y la fijación de nitrógeno. Como se mencionó previamente, *R. etli* es interesante desde el punto de vista bioenergético. Este género expresa un sistema respiratorio ramificado y complejo que está fuertemente influenciado por la fase de diferenciación en que se encuentre. De tal forma que resulta importante conocer la expresión y regulación del sistema respiratorio para posteriormente explorar el proceso durante la simbiosis. El conocimiento obtenido de la expresión de los citocromos nos permitirá plantear estrategias para el diseño de cepas con una capacidad de fijar nitrógeno incrementada.

## **O B J E T I V O   G E N E R A L .**

Este trabajo es parte de un proyecto más amplio del grupo del Dr. Mario Soberón que pretende estudiar los mecanismos moleculares que regulan la expresión genética y la biogénesis de los diferentes componentes de las cadenas del transporte de electrones que opera en *R. etli* en vida libre y durante la simbiosis. Este objetivo se pretende llevar a cabo a través de identificar, aislar y caracterizar los genes estructurales y reguladores relacionados con la biogénesis de las enzimas que participan en las cadenas del transporte de electrones. La estrategia con la que se ha venido logrado estos objetivos ha sido principalmente mediante el aislamiento y caracterización de mutantes que tienen afectada la respiración. Por lo que en el laboratorio se cuenta con diferentes cepas de *R. etli* que tiene afectada la expresión de los citocromos de la cadena respiratoria y que inciden directamente en la simbiosis con la planta del frijol. Algunas de estas mutantes son aquellas que tienen la capacidad disminuida de oxidar el colorante TMPD, (TMPD<sup>-</sup>).

Como se mencionó, Soberón y colaboradores (1989), reportó el aislamiento y caracterización de una mutante con capacidad respiratoria alterada (TMPD<sup>-</sup>) inducida por una solo inserción de Tn5. Esta cepa

(CFN4201) tiene bajas concentraciones de citocromos; dos veces menos citocromo de tipo b y tres veces menos concentración de citocromo de tipo c. Además, las actividades respiratoria de esta mutante fueron 13, 4, 5.6 veces más bajas para NADH, succinato y de TMPD oxidasa respectivamente cuando se compararon con la cepa silvestre.

Por otro lado cuando se determinó su fenotipo simbiótico se observó que esta cepa es capaz de inducir la formación de nódulos (Nod<sup>+</sup>) con pocos bacteroides (Inf<sup>+</sup>) pero es incapaz de fijar nitrógeno (Fix<sup>-</sup>).

## OBJETIVO ESPECIFICO

El hecho de que la mutante CFN4201 inducida por una sola inserción de Tn5, no se encuentre afectada en su capacidad de nodular, pero que, sin embargo, manifieste un efecto pleiotrópico tanto en la fijación de nitrógeno (Fix<sup>-</sup>), como una baja concentración de los componentes de la cadena respiratoria (tres veces menos citocromos de tipo c), y en su capacidad para oxidar el colorante TMPD (debido a la baja concentración de citocromo c), nos pareció interesante. Por lo que decidimos utilizar esta cepa caracterizada fenotípicamente, como herramienta en el aislamiento y caracterización de los genes que participan en la biogénesis de los citocromos de tipo c en *R. etli*.

Por lo que el objetivo específico de este proyecto, es la caracterización a nivel molecular de la mutación descrita en la cepa CFN4201, así como la caracterización de las secuencia nucleotídicas adyacente.

## **RESULTADOS ADICIONALES**

### **MATERIAL Y METODOS**

#### **ENSAYOS ENZIMATICOS :**

Después de ser crecidas aerobicamente, las células fueron cosechadas y lavadas con 50 mM de Tri-HCl (pH 7.4), 5 mM de  $\text{CaCl}_2$  y 5 mM de  $\text{MgCl}_2$  (buffer TCM) y suspendidas en el mismo buffer a una concentración del 30% (v/w). La suspensión celular fué sonicada usando un sonicador MSE 6 veces durante 30 segundos con intervalos de 30 segundos de enfriamiento. La actividad de la oxidasa del NADH se determinó polarográficamente utilizando un electrodo de oxígeno acoplado a un graficador (Yellow Springs Instruments, modelo 5300). Los ensayos enzimáticos se realizaron de acuerdo a lo descrito por Soberón *et al.*, 1989. En una cámara temperada a 30 °C por un baño circulante y con agitación continua por barra magnética. La cámara contenía en todos los casos la siguiente mezcla de ensayo: 0.75 ml de buffer de fosfato de potasio 0.1 M pH 7.4; 0.5 a 1 mg de proteína y agua destilada hasta un volumen de 3 ml. La mezcla de ensayo se preincubó durante 2 min. para establecer la basal antes del inicio de la reacción por la adición del sustrato. La adición del NADH fué en solución acuosa a concentración final de 0.5 mM.

Las actividades de oxidasa se expresan como nanoátomos de oxígeno consumidos por minuto por mg de proteína.

#### **INHIBIDORES DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES :**

El efecto del inhibidor del transporte de electrones antimicina sobre la oxidasa del NADH fué examinado según Trumpower, 1990.

#### **CEPAS Y PLASMIDOS :**

En la TABLA 1, se encuentran descritas las cepas y plásmidos que se utilizaron en este trabajo.



**TABLA # 1 Cepas bacterianas y plásmidos**

| Plásmidos y cósmidos               | características relevantes  | Fuente                             |
|------------------------------------|---|------------------------------------|
| pSUP205                            | mob cos Tc <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> ColE1   | (Simon <i>et al.</i> , 1983)       |
| pNC206                             | IncP1 Cbr Kmr.  | (Simon <i>et al.</i> , 1983)       |
| pSUP5011                           | pBR325 Tn5-mob  | (Simon <i>et al.</i> , 1983)       |
| pSK                                | Ap <sup>r</sup> , vector de clonación.  | (Stratagene)                       |
| pBR329                             | Cm <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> Apr   | (Covarrubias <i>et al.</i> , 1982) |
| pC59 y pC81                        | Cósmidos que complementan el fenotipo TMPD + de la cepaCFN4201.                           | Este trabajo                       |
| pGMR1                              | Fragmento de 8.7 Kb clonado en pBR329.  | Este trabajo                       |
| pGMR2                              | Fragmento de 3 Kb clonado en pSUP205.   | Este trabajo                       |
| pGMR3                              | Fragmento de 4 Kb clonado en pSUP202.   | Este trabajo                       |
| <b>Cepas <i>Rhizobium etli</i></b> |   |                                    |
| CFN42 (CE3)                        | Cepa silvestre.   | (Quinto <i>et al.</i> , 1984.)     |
| CE2                                | Rifr derivada de la cepa CFN42 Nod+ Fix+ en frijol.                                       | (Noel <i>et al.</i> , 1984)        |
| CFN4201                            | CE2::Tn5  | (Soberón <i>et al.</i> , 1989)     |
| <b><i>Escherichia coli</i></b>     |   |                                    |
| DH5 $\alpha$                       | Ap <sup>r</sup> , $\alpha$ -complementación de lacZ, F <sup>-</sup> , deoR, recA1, endA1. | (Stratagene)                       |

## CONDICIONES DE CULTIVO :

Para el crecimiento de todas las cepas de *R. etli* se utilizó medio rico PY (peptona de caseína al 0.5%, extracto de levadura al 0.3% y CaCl<sub>2</sub> 7mM) (Noel *et al.*, 1984). Para el crecimiento de *E. coli* se usó medio LB (peptona de caseína al 1.0%, extracto de levadura al 0.5% y NaCl al 1.0%). Para los medios sólidos se empleó agar al 1.5%. Las concentraciones de los antibióticos en PY fueron las siguientes: ácido Nalidíxico, Nal 20 mg/ml; kanamicina, Kan 30 mg/ml. Las concentraciones de los antibióticos en LB fué de: Tetraciclina, Tc 10 mg/ml; Ampicilina, Ap 50 mg/ml. La temperatura de crecimiento para *R. etli* fue de 30 °C y de 37 °C para *E. coli*. Los cultivos en medio líquido fueron agitados a 250 rpm durante 16 a 24 hrs y los cultivos en medio sólido fueron incubados hasta observar colonias aisladas (aproximadamente 3 días para *R. etli* y de 18 a 24 hrs para *E. coli*).

Las conjugaciones se hicieron sobre PY sólido mezclando en una relación de receptoras/donadoras de 5-10/1. La mezcla se recuperó en MgSO<sub>4</sub> 10 mM después de un mínimo de 16 hrs de incubación para posteriormente platear las diluciones adecuadas en los medios selectivos.

## CLONACION DE FRAGMENTOS DE DNA EN UN VEHICULO MOLECULAR:

Para ello se clonó el fragmento de DNA de 3 kb utilizado vehículo pKS+ digerido con la enzima de restricción *EcoRI*. A este plásmido se le llamó pGS3. El ligamiento de los fragmentos al vehículo se realizó utilizando una relación de 1:5 de vehículo a pasajero, en una mezcla de reacción de 25 ml conteniendo 2.5 ml de ATP 10 mM, 2.5 ml de buffer de ligasa (Tris-HCl pH 7.4 0.5 M, MgCl<sub>2</sub> 0.1 M, dithiothreitol 0.1 M), 20 unidades de ligasa de T4. La reacción se incubó toda la noche a 14°C.

## TRANSFORMACION CON PLASMIDOS RECOMBINANTES:

Para las transformaciones con plásmidos recombinantes obtenidos de la clonación fragmentos *EcoRI*, fué utilizada la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* como receptora. Esta cepa fué crecida en 50 ml de LB hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 DO a 650 nm. Las células fueron recolectadas por centrifugación a 8,000 rpm a 4°C, lavadas con NaCl 10 mM y resuspendidas en 50 ml de buffer de transformación (75 mM CaCl<sub>2</sub>, Tris-HCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM pH 7.4), se incubaron por 20 min en hielo y fueron

resuspendidas en 2 ml de buffer de transformación. Las bacterias así tratadas se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización. Para la transformación se agregó 0.5 mg del DNA en 100 ml de buffer de transformación a 200 ml de células competentes y se dejaron por 1 hora en hielo. Después de este tiempo, se les dió un choque de calor a  $42^{\circ}\text{C}$  por 1 min, se pasaron a un tubo con 3 ml de LB y se dejaron expresando por 3 hrs para posteriormente platear 0.1 ml en medio selectivo (Maniatis *et al.*, 1982).

## **PURIFICACION Y ANALISIS DE PLASMIDOS RECOMBINANTES:**

Los plásmidos recombinantes fueron purificados por el método de "lisis alcalina" (Maniatis *et al.*, 1982). Para su análisis fueron digeridos con la enzima requerida y los fragmentos de restricción fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1.0% en buffer Tris-Acetatos a 100 Volts por 1.5 horas.

## **HIBRIDACION DE SECUENCIAS DE DNA CON DETECTORES ESPECIFICOS:**

Para llevar a cabo los experimentos de hibridación de ácidos nucleicos, los fragmentos de DNA de los plásmidos, así como de las digestiones de DNA total, se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.0% en Buffer Tris acetatos y transferido a membranas de nitrocelulosa de acuerdo a lo reportado por Southern (Southern, 1975). Los plásmidos y fragmentos de DNA utilizados como detectores de hibridación fueron marcador radiactivamente con  $(^{32}\text{P})\text{CTP}$  siguiendo el método de "Random Priming" conforme las instrucciones del fabricante (Amersham Ltd), agregándolos a la mezcla de hibridación de  $10 \times 10^{-6}$  cpm por gel. La hibridación se llevó a cabo de 12 a 24 hrs a condiciones estrictas a  $65^{\circ}\text{C}$  y los filtros fueron lavados de la siguiente manera: 2X SSC y 0.1% de SDS a  $55^{\circ}\text{C}$ , y en otros casos a 4X SSC y 0.1% de SDS dependiendo de la severidad requerida en los lavados según lo reportado por Quinto *et al.*, 1982. Las autorradiografías fueron expuestas a  $-70^{\circ}\text{C}$  con placas intensificadoras el tiempo necesario para detectar la hibridación.

## ENZIMAS E ISOTOPOS :

Las endonucleasas de restricción, ligasa de T4, fueron obtenidas de Boehringer y los isótopos se obtuvieron de Amersham, Co. utilizados conforme indicaciones del fabricante (Maniatis *et al.*, 1982).

## DETERMINACION DE PROTEINA :

Se utilizó el método modificado por Markwell, 1981, en presencia de SDS para eliminar el efecto de los fosfolípidos. Para la curva patrón se utilizó albúmina bovina.

## DETERMINACION DE SECUENCIA NUCLEOTIDICA:

El fragmento *EcoRI* conteniendo la inserción *Tn5-mob* se clonó del ADN total de la cepa CFN4201, previamente digerido con *EcoRI* y ligado al vector pBR329 (Promega). Se seleccionaron las colonias Ap<sup>r</sup> y Km<sup>r</sup>. Los plásmidos recombinantes se caracterizaron por mapeo de restricción. A esta clona se le llamó pGMR1. A partir de la clona pGMR1 se subclonaron los fragmentos *XhoI-EcoRI* que nos permitieron obtener la secuencia nucleotídica usando un "primer" específico de los extremos del *Tn5* (Thöny *et al.*, 1985). El inserto del plásmido pGMR1 se usó como sonda para buscar en aquellos cósmidos que complementaran el fenotipo TMPD el fragmento silvestre *EcoRI* de 3 kb. Se encontraron 2 cósmidos llamados pC59 y pC81. A partir del cósmido pC59 se subclonó los fragmentos silvestres *EcoRI* de 3 y 4 kb al vector pSUP202. A estos plásmidos se les llamó pGMR2 y pGMR3, respectivamente. El fragmento de 3 posteriormente se subclonó en el vehículo PSK y, se le llamó pGS3. La secuencia nucleotídica se continuó en el plásmido pGS3 usando "primers" sintéticos diseñados en base a la secuencia nucleotídica ya obtenida. Se secuenciaron las dos hebras del ADN. La secuencia nucleotídica se obtuvo manualmente por el método de Sanger *et al.* (1977) usando reactivos y Sequenase version 2.0 de un kit de USB (Amersham Ltd.). Para detectar las cadenas nacientes se usó [<sup>35</sup>S]-dATP\_S (New England Nuclear). Los análisis de secuencias nucleotídicas y de aminoácidos fueron realizados con los programas GeneWorks (Intelligenetics Inc.), y del Genetics Computer Group (Wisconsin). Las búsquedas en bancos de genes se realizaron usando el programa BLAST del server del National Center of Biotechnology Information (USA). El análisis hidrofílicos fueron llevados a cabo como se describió anteriormente (kyte y Doolittle 1982) utilizando los parámetros recomendados en la figura 11. El

programa Wisconsin fué utilizado para implementar este algoritmo (kyte y Doolittle 1982).

### **MANIPULACION DE DNA:**

Las técnicas y los reactivos para el aislamiento y electroforesis del DNA, las hibridaciones en colonia y las transformaciones se hicieron como se describió en Maniatis *et al.* (1982). Los plásmidos fueron marcados con  $^{32}\text{P}$  por "random priming" siguiendo las instrucciones del fabricante (Amersham Ltd.).

## DISCUSION RESULTADOS ADICIONALES

### 1.-Análisis del perfil hidropático de la proteína CcmB

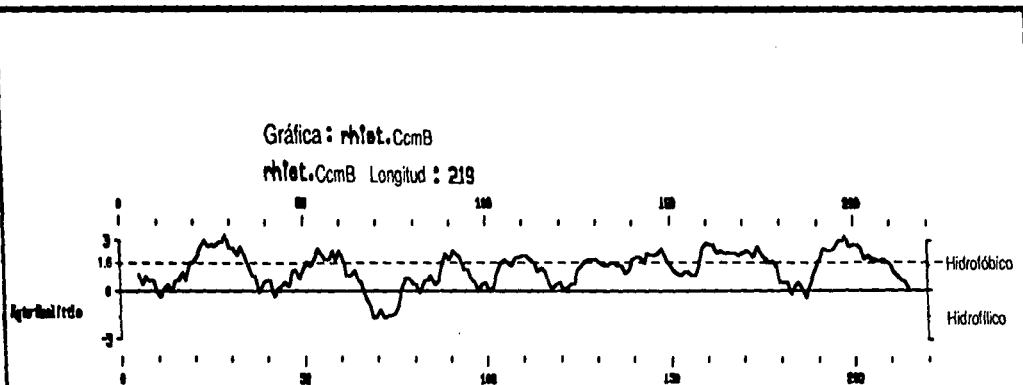
En el artículo anexo se presenta la caracterización molecular de la mutación en la cepa CFN4201. La clonación, el análisis de los datos de secuencia nucleotídica y el mapeo con enzimas de restricción de esta mutación, permitieron identificar una segunda región génica involucrada en la biogénesis de los citocromos de tipo c en *R. etli*. En este trabajo nosotros describimos por análisis de secuencia dos genes los cuales mostraron ser altamente homólogos a los genes *ccmA* y *ccmB* descritos en *B. japonicum* y *R. capsulatus* (Ramseier *et al.*, 1991; Beckman *et al.*, 1992) (ver Figura 1, Artículo). El gene *ccmA* codifica para una proteína homóloga a la subunidad unidora de ATP de un translocador de tipo ABC (Hyde *et al.*, 1990), Mientras que *ccmB* codifican para una proteína hidrofóbica, integrada a membrana con seis hélices transmembranales.

Con el objeto de caracterizar bioquímicamente en más detalle a la proteína CcmB de *R. etli*, se realizó el análisis de las características de hidrofílicas de esta subunidad. El análisis del perfil hidropático se llevó a cabo mediante el programa Wisconsin GCG, con una amplitud de ventana de 19 residuos (Kyte y Doolittle 1982). Las regiones abajo de cero son hidrofílicas; las regiones arriba de cero son hidrofóbicas; aquellas regiones con valores mayores de 1.6 son supuestas regiones transmembranales (Kyte y Doolittle 1982).

Los resultados obtenidos de este tipo de análisis, muestran claramente que la proteína CcmB presenta seis segmentos transmembranales, la cual es una característica típica de subunidades formadoras de canales de translocadores. (Figura 11). Estos resultados apoyan la idea de que esta proteína forma parte de un translocador de tipo ABC.

### 2.- Reiteración del gene *ccmC* en *R. etli*

Por otro lado, las hibridaciones tipo Southern en un perfil de plásmidos utilizando como detector al plásmido pSUP5011, demostraron que la inserción Tn5 en la cepa CFN4201 se encuentra localizada en el cromosoma bacteriano (Figura 3B, artículo). Sin embargo, cuando se utilizó el plásmido pGMR1 como detector se observó una fuerte señal de



**Figura 11. Análisis hidrofílico de CcmB de R. etli. El análisis del perfil hidropático se llevó a cabo mediante el programa Wisconsin GCG, con una amplitud de ventana de 19 residuos (Kyte y Doolittle 1982). Las regiones abajo de cero son hidrofílicas; las regiones arriba de cero son hidrofóbicas; aquellas regiones con valores mayores de 1.6 son supuestas regiones transmembranales (Kyte y Doolittle 1982).**

hibridación entre el gene mutado (fragmento de 8.7 kb) en el cromosoma bacteriano, además de dar una señal en una secuencia localizada en el plásmido *e*. Esto sugirió que el fragmento mutado de 8.7 kb se encuentra en el cromosoma mientras que el fragmento de 4 kb se encuentra ubicado en el plásmido *e*. Sin embargo, la hibridación del plásmido pGMR1 contra los cósmidos pC59 y pC81 que complementaron a la cepa mutante CFN4201, demostraron la presencia de una señal de hibridación en un fragmento *EcoRI* de 3 kb en el plásmido pC81, y dos señales de hibridación en los fragmentos *EcoRI* de 3 y 4 kb en el plásmido pC59 (Figura 3, Líneas 6 y 7A).

Los experimentos citados anteriormente, demuestran por lo menos la presencia de tres secuencias homólogas en el genoma de la cepa CE2: una de estas secuencias se encuentra en un fragmento *EcoRI* de 3 kb y las otras dos restantes en dos fragmentos de 4 kb. La existencia de dos fragmentos *EcoRI* de 4 kb explica la señal de hibridación más intensa a ese nivel cuando se hibrida el DNA total de la cepa CE2 contra el pGMR1, en comparación con la señal de 3 kb (Figura 3B, ArtÍCulo). Experimentos de complementación demostraron que este fragmento no es capaz de complementar el fenotipo  $\text{TMPD}^-$  de la cepa CFN4201. Este resultado demostró que el fragmento de 4 kb no incluye a un gene *ccmB* funcional.

Con el fin de confirmar que la reiteración de DNA en el fragmento *EcoRI* de 4 kb no incluye a un gene *ccmB* adicional decidimos llevar a cabo experimentos tipo Southern complementarios. Cuando los DNAs totales de las cepas CFN42 y CFN4201 fueron hibridados contra un detector intragénico obtenido por PCR del gene *ccmB* (Figura 12A) se encontraron dos señales de hibridación: una señal de 3 kb en el DNA de la cepa silvestre y una señal de 8.7 kb en el DNA de la cepa mutante (Figura 12A, líneas 1 y 2). Los resultados de estos experimentos muestran claramente que el gene *ccmB* no se encuentra reiterado en el genoma de *R. etli*.

Con el fin de averiguar si la reiteración en el fragmento *EcoRI* de 4 kb se debía a una segunda copia del gene *ccmA* se llevaron a cabo experimentos de hibridación adicionales.

La Figura 12B, muestra los resultados de estos ensayos. Cuando los plásmidos pGMR1, pGMR2 y pGMR3 (este último contiene clonado el fragmento *EcoRI* de 4 kb), fueron hibridados contra un fragmento *EcoRI*-*BamHI* conteniendo al gene *ccmA* y la parte 5' del gene *ccmB*, se encontró que solo los fragmentos *EcoRI* de 3 y 8.7 kb y no el de 4 kb, daban señal de hibridación (Figura 12B, líneas 1 y 3). Por otro lado, cuando estos tres



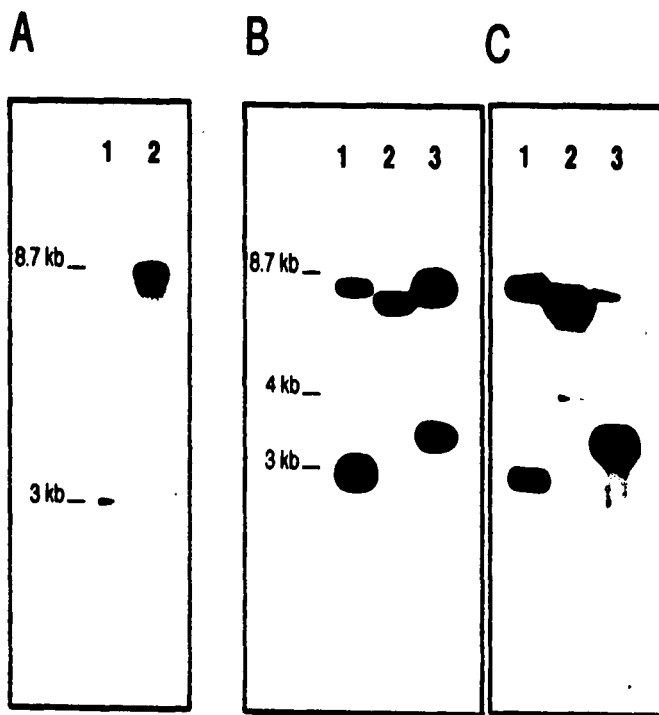


Figura 12. A: Hibridaciones tipo Southern de los DNAs totales de las cepas CFN42 y CFN4201 (Líneas 1 y 2, respectivamente) hibridados contra un detector intragénico *ccmB*. B: Plásmidos pGMR2, pGMR3 y pGMR1 (Líneas 1, 2 y 3, respectivamente) fueron hibridados contra un fragmento *EcoRI-BamHI* conteniendo al gene *ccmA* y la parte 5' del gene *ccmB*. C: Los mismos plásmidos hibridados contra un fragmento *EcoRI-BamHI* conteniendo la parte 3' del gene *ccmB* y la secuencia de DNA corriente abajo de este gene.

plásmidos fueron hibridados contra un fragmento *EcoRI-BamHI* conteniendo la parte 3' del gene *ccmB* y la secuencia de DNA corriente abajo de este gene, todos los fragmentos *EcoRI* (de 3, 4 y 8.7 kb) dieron señal de hibridación. Todos estos datos demuestran que la porción del fragmento *EcoRI* de 3 kb que se repite en los fragmentos *EcoRI* de 4 kb corresponde a la secuencia que se encuentra corriente abajo del gene *ccmB* (Figura 12C, líneas 1-3).

Con el fin de identificar el gene que se encuentra corriente abajo del gene *ccmB* decidimos realizar experimentos de secuenciación nucleotídica de la porción 3' del fragmento *EcoRI* de 3 kb. El resultado de dichos experimentos se muestran en la Figura 13.

La identidad entre el gene *ccmC* de *B. japonicum* (Bj) y la secuencia nucleotídica encontrada hacia el extremo 3' del fragmento de DNA de *EcoRI* de 3 kb de *R. etli* (Re) es de hasta un 76%. El resultado de estos ensayos nos permiten proponer que el gene que se encuentra reiterado en el fragmento de *EcoRI* de 4 kb cromosomal y muy probablemente en el fragmento *EcoRI* de 4 kb del plásmido *e* es el gene *ccmC*. Estos datos también nos permiten proponer un nuevo esquema. Éste representa la posición que tiene el gene *ccmC* en el fragmento *EcoRI* de 3 kb cromosomal (Figura 14).

### 3.- Evidencia Bioquímica de una quinol oxisasa en *R. etli*

Como se describe en el artículo anexo, el hecho de que la cepa mutante CFN4201 se encuentre afectada en uno de los genes que codifican para un componente de la vía de la biogénesis de los citocromos de tipo c se refleja en las características fenotípicas de esta cepa. Esta cepa exhibe baja actividad de NADH, succinato y ascorbato+TMPD oxidasa en condiciones aeróbicas de crecimiento (Soberón *et al.*, 1989), debido a encontrarse afectada en la expresión de las cadenas respiratorias aeróbicas que tienen como constituyentes a los citocromos de tipo c. Estos datos sugirieron que esta cepa mutante es capaz de crecer en condiciones aeróbicas a expensas de una cadena de transporte de electrones independiente de citocromo c.

Con el fin de caracterizar bioquímicamente a la cadena de transporte de electrones que es utilizada por la cepa CFN4201 para

Identities = 88/115 (76%), Hebras = Menos / Positiva

```
Re: 118 GTGTCATCCTCGTCGGCTTCGTCAACATCCGATAATCAAGTTCTCGGTCGAATGGTGG 59
      ||||| | || ||||| | |||| | || || ||||| ||||| ||||| |||||
Bj: 2531 GTGCTGACGCTGGTCGGCGGATCAACCTGCCCATCATCAAGTTCTCGGTCGACTGGTGG 2590

Re: 60 GGACACGCTGCACCAGTCGGCCAGCGTGCTCAGGATAGGCGGTCCGGCGATCGAC 6
      | ||||| ||||| | ||| ||| | | ||||| || || |||||
Bj: 2590 GAACACGCTGCACCAGCCAGCCTCGGTGATGCGCATGGGCGGTTCTGCTCGCTCGAC 2644
```

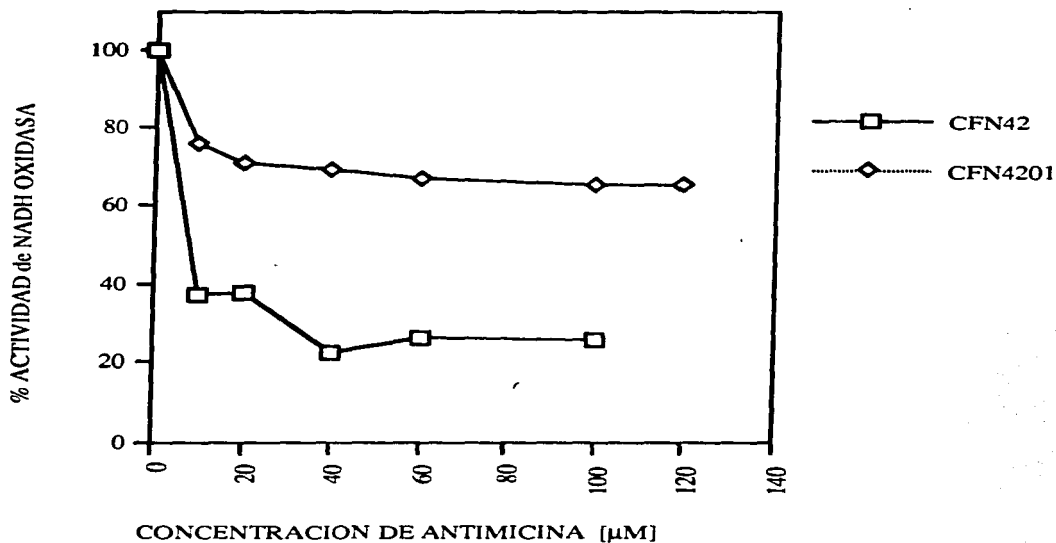
**FIGURA 13.** Identidad entre el gene *ccmC* de *Bradyrhizobium japonicum* (Bj) y la secuencia nucleotídica encontrada hacia el extremo 3' del fragmento de DNA de *EcoRI* de 3 kb de *Rhizobium etli* (Re). Los números a la derecha e izquierda se refiere a posiciones de bases nucleotídicas a partir de extremo 5' de cada hebra de DNA. El caracter (|) se encuentra entre bases que son idénticas.

soportar en crecimiento en condiciones aeróbicas se llevaron experimentos con inhibidores específicos de la cadena de transporte de electrones.

Nosotros decidimos utilizar a la antimicina como inhibidor de sitio III de la cadena respiratoria. La Figura 15 muestra el efecto de la concentración de este inhibidor respiratorio sobre las actividades de la NADH oxidasa de membranas de las cepas CFN4201 y CFN42, crecidas en condiciones aeróbicas. La actividad de la NADH oxidasa de la cepa CFN4201 es inhibida en un 30% a una concentración de 120  $\mu\text{M}$  de antimicina, mientras que esta misma actividad se muestra más sensible en la cepa silvestre CFN42; esta es rápidamente inhibida en un 75% a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ .

Los resultados obtenidos de experimentos con inhibidores como la antimicina, permiten sugerir la presencia de una ramificación del sistema respiratorio en la cepa CFN4201. Considerando que la antimicina bloquea el paso de electrones de citocromo b al citocromo  $c_1$  (Trumpower 1990) y que este inhibidor tiene muy poco efecto en la actividad de la NADH oxidasa de la cepa CFN4201 puede suponerse que la vía alterna para la oxidación del NADH podría empezar después de la ubiquinona sin pasar por el complejo citocromo  $bc_1$  del sistema respiratorio de esta bacteria. Esta vía alterna bien puede ser el citocromo  $bo_3$ . Esta rama de la cadena de transporte de electrones podría soportar la oxidación del NADH en condiciones aeróbicas en la cepa CFN4201. Esta sugerencia se basa en el hecho de que recientemente se clonó y secuenció el gene *coxX*, el cual codifica para una gran subunidad catalítica de lo que se ha propuesto como la cuarta oxidasa de *B. japonicum*. El gene *coxX* codifica para una proteína que exhibe un alto grado de homología con oxidasas terminales de un gran número de especies procariotes (Surpin *et al.*, 1994). Esta nueva oxidasa exhibe la más grande homología con la subunidad I de citocromo  $bo_3$  de *E. coli* que cualquier otra oxidasa terminal de *B. japonicum* anteriormente reportada. Esta evidencia apunta a que la proteína CoxX efectivamente forma parte de lo que podría ser la oxidasa terminal citocromo  $bo_3$ . Esta oxidasa muy probablemente es una quinol oxidasa al igual que la de *E. coli*, dado que cepas de *B. japonicum* con una mutación en los genes *fbCFH* (complejo  $bc_1$ ) exhiben sólo una reducción en la velocidad de crecimiento en cultivos crecidos aeróbicamente (Thöny-Meyer *et al.*, 1989). Nosotros no poseemos evidencias de un crecimiento reducido en condiciones aeróbicas de la cepa CFN4201. Sin embargo, sabemos que las actividades respiratorias, en esta mutante bajo estas condiciones se encuentran afectadas. Esta cepa tiene la actividad de la NADH oxidasa 13 veces más baja en comparación con la cepa silvestre (Soberón *et al.*, 1989). Esto

### INHIBICION POR ANTIMICINA DE LA NADH OXIDASA



**FIGURA 15.** Muestra el efecto de la concentración del inhibidor respiratorio del sitio II antimicina sobre la actividades de la NADH oxidasa de membranas de las cepas CFN4201 y CFN42, crecidas en condiciones aeróbicas.

sugiere que muy probablemente, que la cepa CFN4201 también se encuentra afectada en su velocidad de crecimiento. Empero, esta cepa es capaz de crecer en condiciones aeróbicas probablemente a expensas de la ramificación vía citocromo  $bo_3$ . Independientemente de que esta mutante se encuentra afectada en la biosíntesis del complejo citocromo  $bc_1$  de la cadena de transporte de electrones.

La presencia de citocromo  $bo_3$  en *R. etli* fué demostrada mediante espectros diferenciales con CO y su papel como oxidasa terminal fué comprobado mediante espectros de fotodisociación y unión al oxígeno (Soberón *et al.*, 1989). De manera análoga, se ha reportado una ramificación alternativa sin citocromos presente en el sistema respiratorio de *R. etli* (Barquera *et al.*, 1991b). Esta rama alternativa se ha sugerido como una flavoproteína capaz de oxidar NADH y se distingue de la rama citocromo c oxidasa por su baja afinidad por el  $O_2$ , alta afinidad por en NADH y su resistencia a ser inhibida por quinacrina y la luz ultravioleta. La actividad de esta flavoproteína es inducida por NADH, o por la mezcla de ascorbato+TMPD y se encontró presente en células crecidas aeróbica y microaerofilicamente y estuvo ausente en células crecidas en anaerobiosis y en bacteroides (Barquera *et al.*, 1991b).

Estos resultados apuntan a que estas dos ramificaciones independientes del complejo respiratorio III probablemente intervienen en la oxidación del NADH durante el crecimiento aeróbico en la cepa mutante CFN4201. Adicionalmente, *R. etli* también expresan otra quinol oxidasa; el citocromo d. Sin embargo, esta solo se expresa bajo condiciones de aereación restringida (Barquera *et al.*, 1991a).

## DISCUSION

Como se mencionó anteriormente, el presente trabajo es parte de un proyecto más amplio del grupo del Dr. Mario Soberón, en donde se ha venido trabajando en la identificación y caracterización de los genes involucrados en la expresión genética de citocromos que conforman las diferentes cadenas respiratorias en *R. etli* en vida libre y durante la simbiosis. Una parte de esta línea de investigación ha tratado de identificar a los genes relacionados con la biogénesis de los citocromos de tipo c. De este modo, uno de estos proyectos se ha centrado específicamente en la caracterización molecular de dos mutantes afectadas en la expresión de los citocromos de tipo c. Esta caracterización logró la identificación de los genes *cycHJKL*, los cuales se encuentran involucrados en el proceso de maduración de este tipo de citocromos.

En *B. japonicum*, *R. leguminosarum* y *R. meliloti* los genes *cycHJKL* se encuentran bastante conservados y forman parte de un operón. En nuestro laboratorio se clonó una región de DNA de *R. etli* conteniendo al gene *cycH*. El análisis de la secuencia nucleotídica de esta región reveló la presencia del gene *cycJ* y un ORF incompleto con homología con el gene *cycK*. Ambos genes se encontraron en el extremo 3' de *cycH*. Estos resultados permitieron sugerir que muy probablemente los genes *cycHJ* y *K* en *R. etli* al igual en la especie bacteriana antes mencionadas forman parte de un operón (Tabche 1995).

De manera análoga, el presente proyecto de investigación se ha centrado específicamente en la caracterización molecular de la cepa mutante CFN4201, previamente aislada y caracterizada en nuestro laboratorio como una cepa afectada en la expresión de los citocromos de tipo c y que es incapaz de llevar a cabo la fijación del nitrógeno durante la simbiosis (Soberón *et al.*, 1989).

En este sentido, uno de los primeros puntos fué el aislar y caracterizar el locus genético responsable del fenotipo de la cepa CFN4201. Esta parte del proyecto la realizamos (y como se mencionó en el artículo anexo) mediante la clonación del fragmento *EcoRI* de 8.7 kb que contiene la inserción *Tn5* para de esta manera utilizarlo como detector en experimentos de hibridación, mapeo de restricción y adicionalmente caracterizarlo por secuenciación nucleotídica.

Mediante el análisis con enzimas de restricción del fragmento mutado, nosotros encontramos que el borde derecho del transposón Tn5 se encontraba deletado con aproximadamente 1200 pb. El gene silvestre fue clonado a partir de cósmidos de un banco genético que complementaron el fenotipo TMPD<sup>-</sup> de la cepa mutante. De uno de estos cósmidos nosotros subclonamos un fragmento *EcoRI* de 3 kb (pGMR2) el cual es capaz de complementar los fenotipos TMPD y simbiótico de la cepa mutante. El tamaño del fragmento que contiene al gene silvestre sugirió que la delección en el borde del Tn5 era de aproximadamente de 1.5 kb dado que el Tn5 *mob* es de 7.2 kb y un fragmento de 3 kb dan como resultado un fragmento de 10.2 y no de 8.7 kb.

Con el fin de identificar el gene mutado en la cepa CFN4201, nosotros secuenciamos uno de los bordes del Tn5 del fragmento mutado y continuamos esta secuencia en el fragmento silvestre. Nosotros identificamos tres marcos abiertos de lectura (ORFs) de 215, 80 y 219 aminoácidos en una secuencia de 1834 pb, respectivamente. Después de una búsqueda en el Genbank se identificó al primero y tercero ORFs como homólogos a los genes *ccmA* y *ccmB*, previamente descritos en *B. japonicum* y *R. capsulatus* (Ramseier *et al.*, 1991; Beckman *et al.*, 1992). La inserción del Tn5 en la cepa CFN4201 se encontró localizado dentro del producto CcmB en el aminoácido 199 en el extremo carboxilo terminal (ver Figura 1B, Artículo).

El segundo ORF no mostró homología con ninguna secuencia protéica descrita hasta la fecha. En *B. japonicum* y *R. capsulatus* han sido descritos ORFs entre los genes *ccmA* y *ccmB*; en ambos casos no fueron relacionados con la biogenesis de los citocromos de tipo c (Ramseier *et al.*, 1991; Beckman *et al.*, 1992). Es claro la necesidad de trabajo experimentales que revelen si el ORF80 en *R. etli* está relacionado o no con la biogénesis de este tipo de citocromos.

La Figura 2A del artículo anexo muestra el alineamiento de las proteínas predichas de los genes *ccmA* de *R. etli* con las proteínas predichas del gene *ccmA* de otras especies bacterianas. El producto del gene *ccmA* comparte identidades de entre 34-43% con el producto de los genes mencionados. El gene *ccmA* codifica para una proteína homóloga a la subunidad unidora de ATP de un translocador de tipo ABC (Hyde *et al.*, 1990). El rasgo más característico de los transportadores ABC es su dominio de unión de ATP (Figura 2A, Artículo). Cada dominio es de una longitud de aproximadamente 200 aminoácidos y comparte identidad considerable en su secuencia con los dominios de diferentes transportadores; variando entre el 30 y el 50% dependiendo del transportador con que se compare



(Hyde *et al.*, 1990). La identidad en la secuencia de aminoácidos es generalmente mayor entre los dos dominios de unión de ATP de un solo transportador que entre los dos dominios de diferentes transportadores.

Por otro lado, el gene *ccmB* codifica para una proteína hidrofóbica, semejante a los dominios transmembranales de los transportadores ABC. Los dos dominios transmembranales de los transportadores ABC son altamente hidrofóbicos. La secuencia de aminoácidos predicha a partir de la secuencia nucleotídica muestra que estas proteínas están constituidas por múltiples segmentos de  $\alpha$ -hélices que son capaces de atravesar la membrana. La mayoría de los transportadores predichos tienen seis de estos segmentos por dominio, un total de doce por transportador. La disponibilidad de datos experimentales se limita a unos cuantos transportadores. Sin embargo, seis segmentos transmembranales se han identificado en la permeasa del oligopéptido de *S. typhimurium* (Pearce *et al.*, 1992). Adicionalmente, se ha probado que los dominios hidrofóbicos de los translocadores HlyB y PrtD también atraviesan la membrana citoplásmica seis veces (Wang *et al.*, 1991; Delepelaire y Wandersman 1991).

Con el objeto de caracterizar bioquímicamente más en detalle a la proteína CcmB de *R. etli*, nosotros realizamos el análisis de las características de hidrofílicas de este dominio (Figura 11, Resultados Adicionales).

Los resultados obtenidos de este tipo de análisis, muestran claramente que la proteína CcmB presenta seis segmentos transmembranales, la cual es una típica característica de subunidades formadoras de canales de translocadores. (Figura 4). Estos resultados apoyan la idea de que esta proteína forma parte de un translocador de tipo ABC.

Experimentos con fusiones con el péptido señal de la porción amino terminal tanto del citocromo c como de proteína CycL (subunidad de la supuesta hemoliasa, CCHL) con la fosfatasa alcalina introducidas en mutantes con un fondo *ccmAB*<sup>-</sup> (en *R. capsulatus*) y *ccmB*<sup>-</sup> (en *B. japonicum*), demostraron que el posible papel que tienen el producto de los genes *ccmAB* no es del transporte del apocitocromo c o de la hemoliasa. Así, proteínas CcmA y CcmB fueron propuestas como candidatas para formar parte de transportador ABC requerido para la translocación del grupo hemo C hacia el periplasma en estas especies bacterianas (Beckman *et al.*, 1992; Thöny-Meyer *et al.*, 1994).

De esta manera, el análisis de nuestros datos de secuencia nos han permitieron identificar una segunda región génica involucrada en la biogénesis de los citocromos de tipo c en *R. etli*.

Como se mencionó anteriormente, la inserción del Tn5 en el gene *ccmB* incluye una delección que puede incluir entre 50-300 pb del extremo 3' de este gene, y que por lo tanto era posible que el fenotipo mostrado por la cepa mutante se debiera a la delección del gene *ccmC* más que a la inserción del Tn5. Con el fin de averiguar cual es el gene responsable del fenotipo TMPD<sup>-</sup> de la cepa CFN4201 se mutagenizó el fragmento silvestre *EcoRI* de 3 kb con el fago mini-Mu. Después de la transferencia de los plásmidos mutados a la cepa CFN4201, se seleccionaron tres inserciones mini-Mu independiente que no fueron capaces de complementar el fenotipo TMPD<sup>-</sup> de esta cepa. El análisis de secuencia de estas inserciones, demostró que todas ellas mapeaban dentro del gene *ccmB* (Figura 1B, Artículo). Dos inserciones extras que fueron capaces de complementar el fenotipo TMPD<sup>-</sup> de esta cepa mapearon en el gene *ccmA* (Figura 1B, Artículo), demostrando que ambos genes se transcriben como unidades independientes y que la mutación en el gene *ccmB* es solo la responsable del fenotipo de la cepa CFN42.

Tanto en *B. japonicum* como en *R. capsulatus* los genes *ccmA* y *ccmB* se encuentran formando un grupo junto con tres genes más que se ubican corriente abajo de ellos; lo genes *ccmCDG*. En *R. capsulatus* mutaciones en cualquiera de estos cinco genes (*ccmABCDG*) da como resultado la carencia total de cualquier tipo de citocromo de tipo c en la célula bacteriana. Sin embargo, mutaciones en *ccmC* de *B. japonicum* no tienen fenotipo distinguible. En *R. etli* solo hemos identificado dos de los cinco genes que forman el conjunto *ccmABCD*, es decir, los genes *ccmA* y *ccmB*. Sin embargo, el análisis de secuencia y mapeo con enzimas de restricción del fragmento de DNA *EcoRI* de 3 kb sugirió la presencia del gene *ccmC* corriente abajo de los genes *ccmAB* (Figuras 14 y 15, Resultados Adicionales). Nosotros no tenemos evidencias experimentales que nos permitan afirmar la presencia de los genes *ccmDG* corriente abajo de los genes *ccmABC*. Sin embargo, es muy probable que como en el caso antes mencionado de operón formado por los genes *cycHJKL*, el cual se demostró se encuentra conservado en *R. etli* al igual que en varias especies bacterianas, como los son: *B. japonicum*, *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, de manera análoga, también pudiera suponerse que el orden del conjunto de genes *ccmABCDG* se encuentre conservado en *R. etli* de igual forma en que han sido reportados en las especies bacterianas arriba mencionadas. No

obstante, es claro la necesidad de evidencias experimentales que apoyen esta suposición.

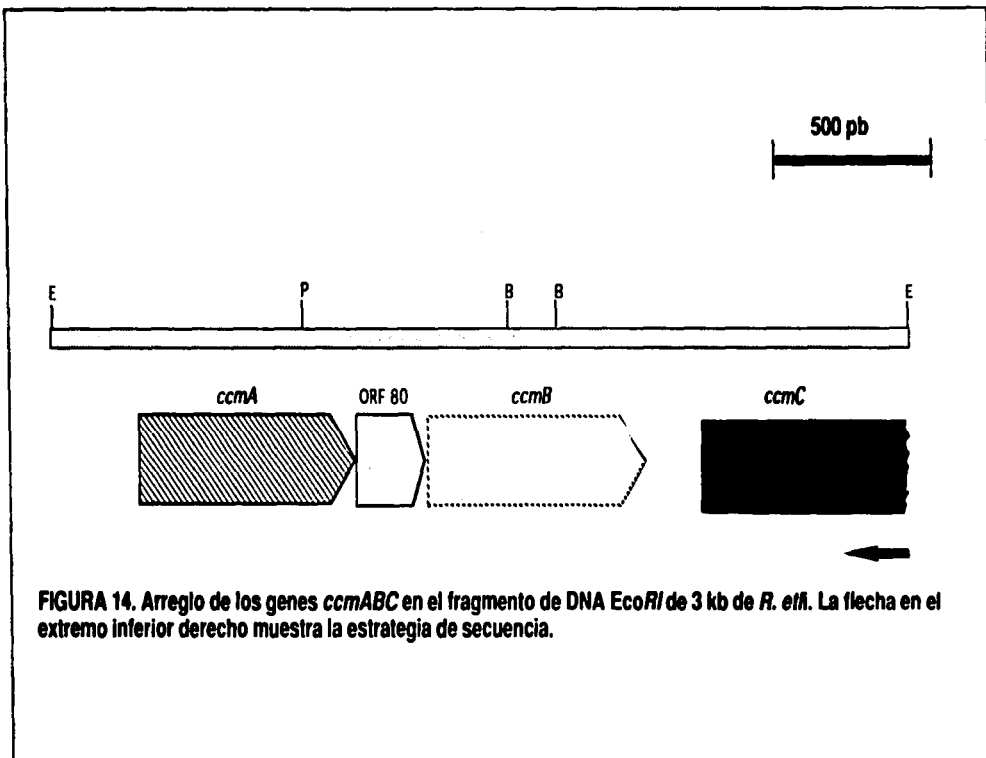
Un dato interesante que se encontró en el presente trabajo que de igual modo de que el gene *cycJ* del operón *cycHJKL* se encuentra reiterado la cepa la CE2 de *R. etli*, el gene *ccmC* del grupo de genes *ccmABCD* también lo está. Esta afirmación se basa en la evidencia experimentale descritas en la Figura 12C:

Cuando los plásmidos pGMR1, pGMR2 y pGMR3 (este último contiene clonado el fragmento *EcoRI* de 4 kb), contra un fragmento *EcoRI-BamHI* conteniendo la parte 3' del gene *ccmB* y la secuencia de DNA corriente abajo de este gene, todos los fragmento *EcoRI* (de 3, 4 y 8.7 kb) dieron señal de hibridación. Todos estos datos demuestran que la porción del fragmento *EcoRI* de 3 kb que se repite en los fragmentos *EcoRI* de 4 kb corresponde a la secuencia que se encuentra corriente abajo del gene *ccmB* (Figura 12C, líneas 1-3).

La identidad entre el gene *ccmC* de *B. japonicum* (Bj) y la secuencia nucleotídica encontrada hacia el extremo 3' del fragmento de DNA de *EcoRI* de 3 kb de *R. etli* (Re) (Figura 13), permitieron proponer que el gene que se encuentra reiterado en el fragmento de *EcoRI* de 4 kb cromosomal y muy probablemente en el fragmento *EcoRI* de 4 kb del plásmido *e* es el gene *ccmC*. Estos datos también nos permitieron proponer un esquema sobre el posible arreglo de estos genes en el fragmento *EcoRI* de 3 kb (Figura 14).

La presencia de secuencias reiteradas en *R. etli* no está restringida a unos cuantos genes. Actualmente se han encontrado una gran variedad de secuencias reiteradas en el genoma de estos organismos. Estas reiteraciones pueden comprender desde repeticiones de genes hasta operones completos como el caso del operón *nifHDK* (Quinto *et al.*, 1982). Estas secuencias reiteradas han sido localizadas en el cromosoma como en varios plásmidos, lo que ha puesto de manifiesto que la reiteración de secuencias de DNA es una característica general de las bacterias de la familia de las Rhizobiaceas (Palacios *et al.*, 1983).

Por otro lado, el supuesto transportador CcmAB puede contener subunidades adicionales. En *R. capsulatus* el gene corriente abajo de *ccmB*, denominado *ccmC*, es requerido para la biogénesis de los citocromos de tipo c. El producto del gene *ccmC* contienen seis hélices transmembranales y, pueden representar una subunidad adicional del aparato de translocación CcmAB. Un motivo de unión no covalente con el grupo hemo con una



**FIGURA 14.** Arreglo de los genes *ccmABC* en el fragmento de DNA *EcoRI* de 3 kb de *R. etli*. La flecha en el extremo inferior derecho muestra la estrategia de secuencia.

limitada homología puede ser detectado en esta proteína (Thöny-Meyer *et al.*, 1994) (Ver Figura 8, Biogénesis).

Como se mencionó arriba el gene *ccmC* en *R. capsulatus* es requerido para la biogénesis de los citocromos de tipo c. No obstante, en *B. japonicum* mutantes en este gene no tienen fenotipo distinguible. Este tipo de evidencia sugiere y, como se ha venido apuntando, que muy probablemente en *B. japonicum* al igual que en *R. etli*, el gene *ccmC* se encuentre reiterado y que esta reiteración es capaz de substituir la función del gene mutado. Nosotros no poseemos ningún tipo de evidencia (mutaciones en *ccmC*) que permita poner en claro el papel que juega *ccmC* en la biogénesis de los citocromos de tipo c. Por lo que sería interesante tratar de generar mutaciones en el gene *ccmC* de *R. etli* con el fin de resolver este problema.

Por otro lado, y como se mencionó, los productos de *ccmAB* no comparten homología significativa con otras proteínas con función conocida. CcmB tampoco poseen un motivo detectable de unión no covalente con el grupo hemo. Aunque es probable que este motivo se encuentre distribuido a lo largo de sus hélices transmembranales, lo cual hace difícil distinguirlo.

En este sentido, es sabido que ocurre transporte activo del grupo hemo a través de las membranas en bacterias que utilizan a este grupo como fuente de hierro (Henderson y Payne, 1993; Stojiljovic y Hantke, 1992). Aunque si bien, en este caso, a diferencia del CcmAB el correspondiente translocador media la importación más bien que la exportación, pone de manifiesto la presencia de un mediador proteico en el ingreso del grupo hemo en bacterias. Sería por lo tanto muy interesante saber la secuencia de aminoácidos de tales proteínas y compararlas con la secuencia de CcmB.

El hecho de que CcmB no posea un motivo de unión no covalente con el grupo hemo detectable y que por el otro lado CcmC si lo tenga (ver Figura 8, Biogénesis), hace probable que estas dos subunidades hidrofóbicas juntas formen parte del poro del translocador ABC del grupo hemo. Esta suposición se basa en el hecho de que el producto de *ccmC* participa en la biogénesis de los citocromos de tipo c en *R. capsulatus*. Por lo que sería interesante de tratar de probar esta posibilidad, mediante la purificación de este transportados y de ésta manera determinar su composición de subunidades. Ésto también permitiría su reconstitución en membranas lipídicas para la determinación del transporte del grupo hemo, así como medir su dependencia de ATP para llevar a cabo este proceso.

El hecho que la cepa CFN4201 crecida en condiciones aeróbicas exhiba una actividad de NADH resistente a la inhibición por la antimicina, sugirió que esta mutante se encontraba afectada en la biosíntesis del complejo citocromo  $bc_1$  del sistema respiratorio. Esta hipótesis fué comprobada experimentalmente mediante ensayos más finos.

Ensayos de Western Blot utilizando anticuerpos dirigidos contra citocromo  $c_1$  de bovino revelaron que las membranas de la cepa CFN4201 presenta niveles bajos pero detectables de la apoproteína  $c_1$  cuando se compara con la cepa silvestre. Sin embargo, el análisis del contenido del grupo hemo de las proteínas de tipo  $c$  revelaron que el apocitocromo  $c_1$  no contiene este grupo en la cepa CFN4201 (Figura 4B1, Artículo). Esto sugiere que el complejo citocromo  $bc_1$  en esta cepa mutante no es funcional. Esto apoya lo mencionado con anterioridad: Las dos ramificaciones independientes del complejo respiratorio III (flavoproteína y citocromo  $bc_3$ ) son responsables de la oxidación del NADH durante el crecimiento en condiciones aeróbicas en la cepa mutante CFN4201. El hecho de que *R. etli* posea un sistema respiratorio ramificado no es nada extraño. Las bacterias aeróbicas generalmente son capaces de hacer uso de un amplio rango de concentraciones de oxígeno para la conservación de energía por respiración. Esta flexibilidad se las da el hecho de contar con dos o más oxidasas terminales que tienen diferentes afinidades para el  $O_2$ . Los equivalentes reductores son derivados de substratos de carbono por la acción enzimática de varias deshidrogenasas que envían los electrones hacia la poza de quinona/quinol dentro de la membrana citoplásmica. De aquí, los electrones fluyen hacia las oxidasas terminales que están integradas en la membrana, y que son los sitios donde se lleva a cabo la reducción del  $O_2$ . En las bacterias se conocen dos tipos principales de oxidasas terminales, las quinol oxidasas y las citocromo  $c$  oxidasas (García-Horsman 1994). Las quinol oxidasas reciben los electrones directamente de la poza de quinol, mientras que las citocromo  $c$  oxidasas reciben los electrones del citocromo  $c$  que ha sido reducido anteriormente por la ubiquinol-citocromo  $c$  oxidoreductasa (también llamada complejo citocromo  $bc_1$  (Trumpower, 1990). Por lo tanto, cuando las bacterias emplean más de una oxidasas terminal, la cadena respiratoria es ramificada, y el punto de ramificación es a partir de la poza del quinol (P. ej. cuando dos quinol oxidasas o una citocromo  $c$  oxidasas más una quinol oxidasas están presentes), o bien es a nivel del complejo citocromo  $bc_1$  (P. ej. cuando dos citocromo  $c$  oxidasas están presentes). En contraste a lo que ocurre en mitocondria donde sólo está presente una cadena respiratoria, la existencia de una cadena respiratoria ramificada es la regla en las bacterias aeróbicas.

En bacterias, la presencia en los pre-apocitocromos *c* de una secuencia señal cargada positivamente, con un segmento de cuando menos diez residuos hidrofóbicos seguidos normalmente de un sitio de corte para la peptidasa líder, sugiere que estas proteínas son secretadas a través de la maquinaria común de secreción (*sec*) de la célula bacteriana (Pugsley 1993). El péptido señal de varios citocromos *c* ha demostrado ser funcional en dirigir la fusión de una proteína pasajera (fosfatasa alcalina; PhoA) a través de la membrana (Brandner *et al.*, 1991; von Wachenfeldt y Hederstedt 1990b). Estas características señalan que el sitio funcional de los citocromos de tipo *c* se encuentra del lado periplásmico de la membrana plasmática (Pettigrew y Moore 1987).

Un cuestionamiento interesante con respecto a la translocación de citocromo *c*, es si el grupo hemo se une a la apoproteína antes, durante o después de ser exportada a través de la membrana citoplásmica hacia el periplasma.

En el presente trabajo, nosotros demostramos que *R. etli* es capaz de translocar la forma apo de citocromo *c*<sub>1</sub> al periplasma sin que la unión del grupo hemo haya ocurrido. Esto último fué comprobado experimentalmente. Ensayos de Western Blot anteriormente mencionados (Figura 4A1, Artículo), revelaron que las membranas de la cepa CFN4201 presenta niveles bajos pero detectables de la apoproteína *c*<sub>1</sub> cuando se compara con la cepa silvestre. Sin embargo, el análisis del contenido del grupo hemo de las proteínas de tipo *c* revelaron que el apocitocromo *c*<sub>1</sub> ni ninguna otra forma apo de los citocromo de tipo *c* contiene a éste grupo prostético unido covalentemente en la cepa CFN4201 (Figura 4B1, artículo). Esto sugiere, que la unión del grupo hemo ocurre después de que el precursor es translocado al periplasma. Esto parece ser razonable, dado que la unión del grupo hemo a la apoproteína antes de la translocación puede generar varias restricciones sobre la estructura tridimensional del precursor, el cual, independientemente de la secuencia señal, puede no llenar lo requisitos de las proteínas de exportación dependiente del sistema *sec*. Adicionalmente, y como se mencionó, en *R. etli* se han identificado los genes *cycHJ* y *K* (CCHL) cuyos productos se cree están implicados en catalizar la unión covalente de grupo hemo a la apoproteína (Tabche 1995), se encuentran localizados en la membrana citoplásmica de cara al periplasma. Todos nuestros datos apoyan la hipótesis de que la unión covalente de grupo prostético hemo a las formas apo de los citocromos de tipo *c* no es un requisito para que estos últimos sean exportados a través de la membrana plasmática hacia el periplasma.

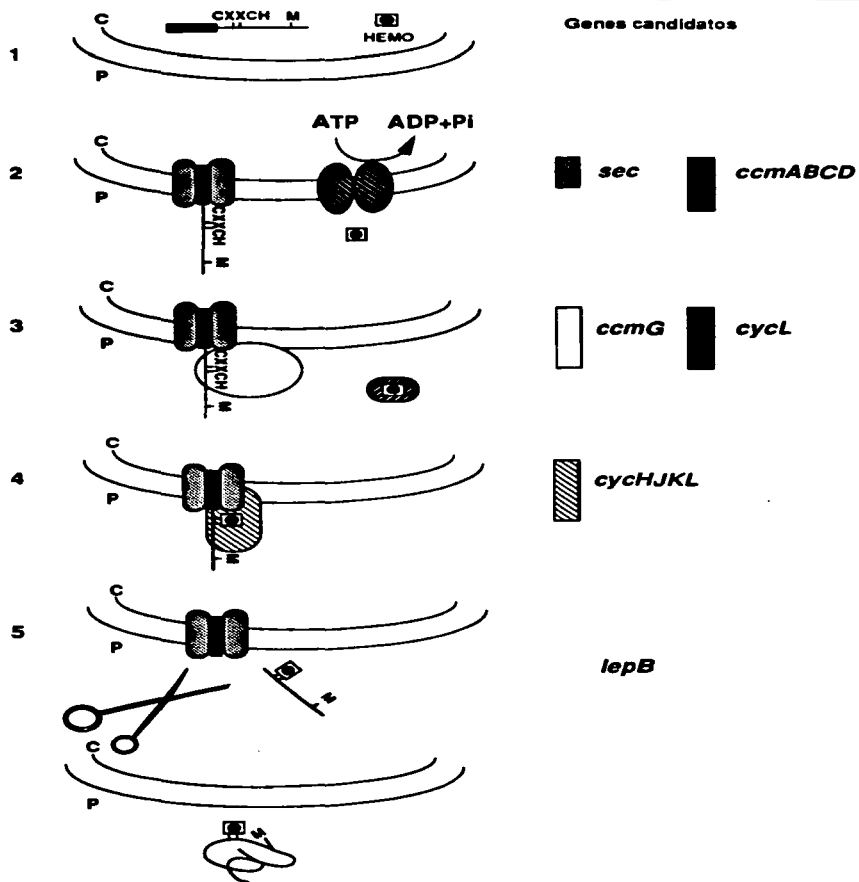


FIGURA 16. Modelo de la vía de maduración de los citocromos de tipo c bacteriales. El modelo es esquematizado para un citocromo c soluble. Los números a la derecha corresponden a los pasos en ésta vía. El paso 4 está ausente en los citocromos de tipo c que se encuentran unidos a la membrana, excepto para citocromo  $c_1$ . c=citoplasma, p=lado periplásmico de la membrana, CXXCH=sitio de unión covalente del grupo hemo en la apoproteína, M=metionina, sexto ligando del grupo hemo en algunos citocromos de tipo c. *lepB*= gene que codifica para la peptidasa señal.



El resultado de todos estos estudios nos permiten sugerir un modelo de trabajo sobre la biogénesis de los citocromos c en *R. etli* (Figura 16). Este modelo es semejante al propuesto por Thöny-Meyer (1994), sobre las vías de maduración de los citocromos de tipo c en bacterias, en donde se proponen cuando menos nueve genes directamente relacionados con la biogénesis de los citocromos de tipo c en bacterias.

**Paso 1.** Después de la síntesis del pre-apocitocromo c y el grupo hemo en el lado citoplásmico de la membrana, los dos componentes son translocados a través de la membrana. Se ha propuesto que la pre-apoproteína asistida por su secuencia señal utiliza la maquinaria *sec* de la célula para ser exportada. El grupo hemo es probablemente transportado por un transportador ABC, conformado por el producto de los genes *ccmAB*. Este transportador puede ser inusual y contener subunidades adicionales, tales como los productos de los genes *ccmC* y *ccmD*.

**Paso 2.** El sitio de unión de grupo hemo C-X-X-C-H es mantenido en su forma reducida en el lado periplásmico de la membrana por la proteína semejante a la tioredoxina, producto del gene *ccmG*. El grupo hemo es llevado a, o mantenido en su estado reducido y presentado a la hemoliasa CCHL. El gene candidato para esta función es *cycL*.

**Paso 3.** El grupo hemo es ligado al apocitocromo por la hemoliasa CCHL. Las subunidades de esta enzima bien pudieran ser los productos de los genes *cycHJK*.

**Paso 4.** La peptidasa líder remueve el péptido señal de los citocromos c solubles, los cuales son liberados de la membrana hacia el periplasma.

**Paso 5.** Los citocromos se estabilizan para funcionar. Esto ocurre mediante el proceso de plegamiento y ensamblaje dentro de un complejo constituido por varias subunidades.

Este modelo está basado en el hecho de que el grupo hemo es unido después de la translocación del precursor protéico (o al menos parte de este) a través de la membrana. Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos de estudios de la maduración de citocromo c en *P. denitrificans*, *R. capsulatus* y *B. japonicum* y, con el hecho de que muchos de los componentes involucrados en el proceso de maduración, poseen una secuencia señal en el extremo aminoterminal y, por lo tanto, requieren de ser exportados para ser funcionales. En el paso 2, si uno considera que la hemoliasa CCHL es un complejo multienzimático formado por varias subunidades, es probable que la reducción tanto de grupo hemo como de

su sitio de unión en la apoproteína pudiera ser lavado a cabo por una de las subunidades de tal complejo. Este modelo es muy semejante, en cierto modo, a la biogénesis de citocromo  $c_1$  en mitocondria (Nicholson *et al.*, 1989) y toma en cuenta el fenotipo de mutantes, información obtenida de las secuencias nucleotídica y funciones bioquímicas esperadas.

**BIBLIOGRAFIA**

- Ames, G.F.-L., Nikaido, K., Groarke, J., Petithory, J. 1989. Reconstruction of periplasmic transport in insi-out membrane vesicles: energization by ATP. *J. Biol. Chem.* 264:3998-4002.
- Ames, G.F.-L., Joshi, A. 1991. Energy coupling in bacteria periplasmic permeases. *J. Bacteriol.* 172:122-137.
- Anraku, Y. 1988. Bacterial electron transport chains. *Ann. Rev. Inc.* 57:101-132.
- Appleby, C.A. and Bergersen, J.F., 1958. Cytochromes of *Rhizobium*. *Nature (London)* 182:1174.
- Appleby, C.A., 1969. Electron transport systems of *Rhizobium japonicum* II. *Rhizobium* haemoproteins cytochromes and oxidases in free living (culture cell) *Biochim. Biophys. Acta.* 172: 88-105.
- Appleby, C.A. 1984. Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Annv. Rev. Plant. Phusiol.* 35: 443-478.
- Avisar, Y.J., and Nadler, K.D. 1978. Stimulation of tetrapyrrole formation in *Rhizobium japonicum* by restricted aeration. *J. Bacteriol.* 135:782-789.
- Azzaria, M., Schurr, E., Gros, P. 1989. Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding site of the *mdr-1* gene abolish its ability to confer multidrug resistance. *Mol. Cell Biol.* 9:5289-5297.
- Bachmann, B.J. 1990 Linkage map of *Escherichia coli* K12. edition 8. *Microbiol. Revs.* 54:130-97
- Barquera, B., García-Horsman, A. y Escamilla, E. 1991a. Cytochrome d expression and regulation pattern in free living *Rhizobium phaseoli*. *Arch. Microbiol.* 115: 114-119.
- Barquera, B., García-Horsman, A. y Escamilla, J.E. 1991b. An alternative non-cytochrome containing branch in the respiratory system of free-living *Rhizobium phaseoli*. *Arch. Microbiol.* 155: 428-435.
- Beckman, D. L., Trawick, D. R. and Kranz, R. G. : Bacterial cytochromes c biogenesis. *Genes Dev.* 6 (1992) 268-283.
- Beckman, D. L. & Kranz, R. G. 1993. Cytochromes c biogenesis in a photosynthetic bacterium requires a periplasmic thioredoxin-like protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 2179-83.
- Bell, A.W., Buckel, S.D., Groarke, J.M., Hope, J.N., Kingsley, D.H., et al. 1986. The nucleotide sequence of the *rbsD*, *rbsA* and *rbsC* genes of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 261:7652-7658.

- Berger, E.A., Heppel, L.A. 1974. Different mechanisms of energy coupling for the shock-sensitive and shock-resistant amino acid permeases of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 249:7747-7755.
- Bergersen, F.J. 1984. Oxygen and the physiology of diazotrophic organisms. En: Advances on Nitrogen Fixation Research C. Veeger y W.E. Newton (eds.).pp. 171-180. Nijhoff, Junk and Pudoc, The Hague and Wageningen, The Netherlands.
- Berkower, C., Michaelis, S. 1991. Mutational analysis of yeast  $\alpha$ -factor transporter STE6, a member of the ATP binding cassette (ABC) protein superfamily. EMBO J. 10:3777-3785.
- Biel, S. W., and Biel, A. J. 1990. Isolation of a *Rhodobacter capsulatus* mutant that lacks c-type cytochromes and excretes porphyrins. J Bacteriol 172: 1321-1326.
- Bishop, L., Agbayani, R., Ambudkar, S.V., Maloney, P.C., Ames, G.F.-L. 1989. Reconstitution of a bacterial periplasmic permease in proteoliposomes and demonstration of ATP hydrolysis concomitant with transport. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6953-6957.
- Blattner, F. R., Burland, V., Plunkett, G., Sofia, H. J. and Daniels, D. L. 1993. Analysis of the *Escherichia coli* genome. IV. DNA sequence of the region from 89.2 to 92.8 minutes. Nucleic Acids Res 21: 5408-5417.
- Boistard, P., Batut, J., David, M., Fourment, J., Garnerone, A.M., Kahn, D., de Philip, P., Reyrat, J.M. y Waelkens, F. 1991. Regulation of nitrogen fixation genes in *Rhizobium meliloti*. En H. Hennecke y D.P.S. Verma, eds. Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. Vol.I, pp. 195-202, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Bott, M., Bolliger, M. y Hennecke. 1990. Genetic analysis of the cytochrome c-a<sub>3</sub> branch of the *Bradyrhizobium japonicum* respiratory chain. Mol. Microbiol. 4: 2147-2157.
- Bott, M., Ritz, D. y Hennecke, H. 1991. The *Bradyrhizobium japonicum* *cycM* gene encodes a membrane-anchored homolog of mitochondrial cytochrome c. J. Bacteriol. 173: 6766-6772.
- Bott, M., Preisig, O. y Hennecke, H. 1992. Genes for a second terminal oxidase in *Bradyrhizobium japonicum*. Arch. Microbiol. 158: 335-343.
- Brandner, J. P., Stabb, E. V., Temme R., and Donohue, T. J. 1991. Regions of *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome c<sub>2</sub> required for export, heme attachment, and function. J Bacteriol 173, 3958-3965.

- Brown, S., Moody, A.J., Mitchell, R. and Rich, P.R. 1993. Binuclear center structure of terminal protonmotive oxidases. *FEBS Lett.* 316:216-223.
- Capaldi, R.A. 1990. Structure and function of cytochrome c oxidase. *Annu. Rev. Biochem.* 59:569-596.
- Cheng, S.H., Rich, D.P., Marshall, J., Gregory, R.J., Welsh, M.J., *et al.* 1991. Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell* 66:1027-036.
- Coulton, J.W., Mason, P., Allatt, D.D. 1987. *fhuC* and *fhuD* genes for iron(III)-ferrichrome transport into *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 169:3844-3849.
- Covarrubias, L., Bolivar, F., 1982. Construction and characterization of new cloning vehicles. VI. Plasmid pBR329, a new derivative of pBR328 lacking the 482-base-pair inverted duplication. *Gene* 17: 79-89
- Creusot, F., Verdier, J., Gaisne, M. and Slonimski, P. P. 1988. CYP1 (HAP1) regulator of oxygen-dependent gene expression in yeast. I. Overall organization of the protein sequence displays several novel structural domains. *J Mol Biol* 204: 263-276.
- Dailey, H.A., 1990. In *Biosynthesis of Heme and Chlorophylls*; Dailey, D.H. (ed). New York: McGraw-Hill, pp.123-165.
- Davidson, E., Ohnishi, T., Tokito, M. and Daldal, F. 1992. *Rhodobacter capsulatus* mutants lacking the Rieske FeS protein form a stable cytochrome bcl subcomplex with an intact quinone reduction site. *Biochemistry* 31: 3351-3358.
- Delepelaire, P., and Wandersman, C. 1991. Characterization, localization and transmembrane organization of three proteins PrtD, PrtE and PrtF necessary for protease secretion by Gram-negative bacterium *Erwinia chrysanthemia*. *Mol. Microbiol.* 5:2427-2434.
- Dumont, M.E., Ernst, J.F., Hampsey, M.D., Sherman, F. 1987. Identification an sequence of the gene encoding cytochrome-c-heme lyase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 6: 235-241.
- Ehrmann, M., Boyd, D., Beckwith, J. 1990. Genetic analysis of membrane protein topology by a sandwich gene fusion approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:7574-7578.
- Fath, M.J., and Kolter, R., 1993. ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Rev.* 57:995-1017.
- Felmler, T., Pellett, S., Welch, R.A. 1985. Nucleotide sequence of an *Escherichia coli* chromosomal haemolysin. *J. Bacteriol.* 163:94-105.

- Frustaci, J.M., Sangwan, I. and O'Brian, M.R. 1991. Aerobic growth and respiration of a delta-aminolevulinic acid synthase (*hema*) mutant of *Bradyrhizobium japonicum*. J. Bacteriol. 173: 1145-1150.
- Gabel, C. y Maier, R.J. 1990. Nucleotide sequence of the *coxA* gene encoding subunit I of cytochrome  $a_3$  of *Bradyrhizobium japonicum*. Nucleic Acids Res. 18: 6143.
- Gabel, C., Bittinger, M. A. and Maier, R. J. 1994. Cytochrome  $a+a_3$  gene regulation in members of the family Rhizobiaceae: comparison of copper and oxygen effects in *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium tropici*. Appl Environ Microbiol 60: 141-148.
- Gallagher, M.P., Pearce, S.R., Higgins, C.F. 1989. Identification and localization of the membrane-associated, ATP-binding subunit of oligopeptide permease of *Salmonella typhimurium*. Eur. J. Biochem. 180:133-141.
- Gallon, J.R., 1992. Tansley review No. 44. Reconciling the incompatible:  $N_2$  fixation and  $O_2$ . New Phytol. 122: 571-609.
- García, E. 1992. Tesis de Licenciatura, UNAM. Papel del citocromo  $a_3$  en la fijación simbiótica de nitrógeno: análisis de una mutante  $a+a_3$  de *Rhizobium phaseoli*.
- García-Horsman, J.A., Barquera, B., Rumbley, J., Ma, J and Gennis, R.B. 1994a. The Superfamily of Hemo-Copper Respiratory Oxidases. Journal of Bacteriology. 176:5587-5600.
- García-Horsman, J.A., Berry, E., Shapleigh, J.P., Alben, J.O. and Gennis, R. B.1994a. A novel citocromo c oxidase from *Rhodobacter spheroides* that lacks  $Cu_A$ . Biochemistry 33:3113-3119.
- Georges, E., Bradley, G., Gariepy, J., Ling, V. 1990. Detection of P-glycoprotein isoforms by gene-specific monoclonal antibodies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:152-156.
- Germann, U.A., Willingham, M.C., Pastan, I., Gotesman, M.M. 1990. Expression of the human multidrug transporter in insect cells by a recombinant baculovirus. Biochemistry 29:2295-2303.
- Glick, B. S., Beasley, E. M. & Schatz, G. 1992. Protein sorting in mitochondria. Trends Biochem Sci 17: 453-459.
- Gray, K.L., Grooms, M., Myllykallio, H., Moomaw, C., Slaughter, C. and Dalda, F. 1994. *Rhodobacter capsulatus* contains a novel cb-type cytochrome c oxidase without a  $Cu_A$  center. Biochemistry 33:3120-3127.

- Gregory, R.J., Rich, D.P., Cheng, S.H., Souza, D.W., Paul, S., *et al.* 1991. Maturation and function of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator variants bearing mutations in putative nucleotide-binding domains 1 and 2. *Mol. Cell. Biol.* 11:3886-3893.
- Guerinot, M.L. y Chelm, B.K. 1986. Bacterial delta-aminolevulinic acid synthase activity is not essential for leghemoglobin formation in soybean/*Bradyrhizobium japonicum* symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 1837-1841.
- Haag, E., Eaton-Rye, J. J., Renger, G. and Vermaas, W. F. 1993. Functionally important domains of the large hydrophilic loop of CP47 as probed by oligonucleotide-directed mutagenesis in *Synechocystis sp.* PCC 6803. *Biochemistry* 32: 4444-4454.
- Haltia, T., Saraste, M. and Wikström, M. 1991. Subunit III of cytochrome c oxidase is not involved in proton translocation: a site-directed mutagenesis study. *EMBO J.* 10:2015-2021.
- Hartl, F. U., and Neupert, W. 1990. Protein sorting to mitochondria: evolutionary conservations of folding and assembly. *Science* 247: 930-938.
- Henderson, D. P. and Payne, S. M. 1993. Cloning and characterization of the *Vibrio cholerae* genes encoding the utilization of iron from haemin and haemoglobin. *Mol Microbiol* 7: 461-469.
- Hendler, R.W., Pardhasaradhi, K., Reynafarge, B. and Ludwig, B. 1991. Comparison of energy-traducing capabilities of the two and three-subunit cytochrome aa<sub>3</sub> from *Paracoccus denitrificans* y las 13-subunit beef heart enzyme. *Biophys. J.* 60:415-423.
- Hengge, R., Boss, W. 1983. Maltose and lactose transport in *Escherichia coli*. Examples of two different types of concentrative transport systems. *Biochim. Biophys. Acta* 737:443-77.
- Higgins, C.F., Ames, G.F.-L. 1981. Two periplasmic proteins which interact with a common membrane receptor show extensive homology: complete nucleotide sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:6038-6042.
- Higgins, C.F., Haag, P.D., Nikaido, K., Ardeshir, F., García, G., *et al.* 1982. Complete nucleotide sequence and identification of membrane components of histidine transport operon of *Salmonella typhimurium*. *Nature* 298:723-727.
- Higgins, C.F., Hiles, I.D., Salmond, G.P.C., Gill, D.R., Downie, J.A., *et al.* 1986. A Family of related ATP binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* 323:448-450.

- Higgins, C.F. 1992. ABC transporters from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 8:67-113.
- Hiles, I.D., Higgins, C.F., 1986. Peptide uptake by *Salmonella typhimurium*. The periplasmic oligopeptide-binding protein. *Eur. J. Biochem.* 158:561-567.
- Hiles, I.D., Gallagher, M.P., Jamieson, D.J., Higgins, C.F. 1987. Molecular characterization of the oligopeptide permease of *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* 195:125-142.
- Hill, S., Viollet, S., Smith, A.T. y Anthony, C. 1990. Roles for enteric d-type cytochrome oxidase in N<sub>2</sub> fixation and microaerobiosis. *J. Bacteriol.* 172: 2071-2078.
- Hill, B.C. 1993. The sequence of electron carries in the reaction of cytochrome c oxidase with oxygen. *J. Bioenerg. Biomembr.* 25:115-120.
- Hoffman, P.S., Morgan, T.V. y DerVartanian, D. 1979. Respiratory-chain characteristics of mutants of *Azotobacter vinelandii* negative to tetramethyl-p-phenylenediamine oxidase. *Eur. J. Biochem.* 100:19-27.
- Hosler, J.P., Fetter, J., Tecklenburg, M.M.J., Espe, M., Lerma, C. and Ferguson-Miller, S. 1992. Cytochrome aa<sub>3</sub> of *Rhodobacter Spheroides* as a model for mitochondrial cytochrome c oxidase: purification, kinetics, proton pumping and spectral analysis. *J. Biol. Chem.* 267:24264-24272.
- Hosler, J.P., Ferguson-Miller, S., Calhoun, M.W., Thomas, J.W., Lemieux L., Georgiou, J. Ma.C., Fetter, J., Shapliagh, J., Tecklenburg, M.M.J., Babcock, G.T. and Gennis, R.B. 1993. Insight into the active-site structure and function of cytochrome oxidase by analysis of site-directed mutants bacterial cytochrome aa<sub>3</sub> and cytochrome bo. *J. Bioenerg. Biomembr.* 25:121-136.
- Howe, G., Merchant, S. 1992. The biosynthesis of membrane and soluble plastidic c-type cytochrome of *Chlamydomonas reinhardtii* is dependent on multiple common gene products *EMBO J.* 11:2789-2801.
- Howe, G., Merchant, S. 1993. Maturation of thylakoid lumen protein proceeds post-translationally through an intermediate *in vivo*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90:1862-1866.
- Ingledeu, W.J., and Poole, R.K. 1984. The respiratory chains of *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 48:222-271.



- Ishizuka, M., Machida, K., Shimada, S., Mogi, A., Tsuchiya, T., Ohmori, T., Souma, Y., Goda, M. and Sone, N. 1990. Nucleotide sequence of the gene coding for four subunits of cytochrome c oxidase from thermophilic bacterium PS3. *J. Biochem (Tokyo)* 108:866-873.
- Jenney, F.E., and Daldal, F. 1993. A novel membrane-associated c-type cytochrome, cyt  $c_y$ , can mediate the photosynthetic growth of *Rhodobacter capsulatus* and *Rhodobacter sphaeroides*. *EMBO J* 12, 1283-1292.
- Jensen, R. E., Schmidt, S., and Mark, R. J. 1992. Mutations in a 19-amino-acid hydrophobic region of the yeast cytochrome  $c_1$  presequence prevent sorting to the mitochondrial intermembrane space. *Mol Cell Biol* 12: 4677-4686.
- Jones, C.W. 1988. in *Bacterial Energy Transduction*. 1-82 pp. Academic Press, London.
- Kahn, D., Batut, J., Daveran, M.L. y Fourment, J. 1993. Structure and regulation of the *fixNOQP* operon from *Rhizobium meliloti*. En R. Palacios, J. Mora y W.E. Newton (eds.). *New horizons in nitrogen fixation*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. pp.393-398.
- Keister, D.L. y Marsh, S.S. 1990. Hemoproteins of *Bradyrhizobium japonicum* cultured cells and bacteroids. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2736-2741.
- Kelly, M.J.S., Poole, R.K., Yates, M.G. y Kennedy, C. 1990. Cloning and mutagenesis of genes encoding the cytochrome bd terminal oxidase complex in *Azotobacter vinelandii*: mutants deficient in the cytochrome d complex are unable to fix nitrogen in air. *J. Bacteriol.* 172: 6010-6019.
- Kerppola, R. E., Shyamala, U.K., Klebba, P., Ames, G.F.-L. 1991. The membrane-bound proteins of periplasmic permease from a complex. *J. Biol. Chem.* 266:9857-9865.
- Kitts, C. L. and Ludwig, R. A. 1994. *Azorhizobium caulinodans* respire with at least four terminal oxidases. *J Bacteriol* 176: 886-95.
- Konishi, K., Van Doren, S. R., Kramer, D. M., Crofts, A. R. and Gennis, R. B. 1991. Preparation and characterization of the water-soluble heme-binding domain of cytochrome  $c_1$  from the *Rhodobacter sphaeroides*  $bc_1$  complex. *J Biol Chem* 266: 14270-1426.
- Kranz, R.G. and Gennis, R.B. 1985. Immunological investigation of distribution of cytochromes related to two terminal oxidases of *Escherichia coli* in other gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 161;709-713.

- Kranz, R.G. and Gennis, R.B. 1982. Isoelectric Focusing and crossed immunoelectrophoresis of hemo proteins in *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *J. Bacteriol.* 150:36-45.
- Loferer, H., Bott, M. and Hennecke, H. 1993. *Bradyrhizobium japonicum* TlpA, a novel membrane-anchored thioredoxin-like protein involved in the biogenesis of cytochrome aa3 and development of symbiosis. *EMBO J* 12: 3373-3383.
- Lory, S. 1992. Determinants of extracellular protein secretion in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 174:3423-3428.
- Lübben, M., Kolmerer, B. and Saraste, M. 1992. An archeobacterial terminal oxidase combines core structures of two mitochondrial respiratory complex. *EMBO J.* 11:805-812.
- Ludden, P. W. & Burris, R. H. 1979. Removal of an adenine-like molecule during activation of dinitrogenase reductase from *Rhodospirillum rubrum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 6201-6205.
- Ludwig, B. 1992. Terminal oxidases in *Paracoccus denitrificans*. *Biochim. Biophys. Acta* 1101:195-197.
- Maier, R.J., Moshiri, F., Keefe, R.G. y Gabel, C. 1990. Molecular analysis of terminal oxidases in electron-transport pathways of *Bradyrhizobium japonicum* and *Azotobacter vinelandii*. En *Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives*, pp 301-308, Editores: P.M. Gresshoff, L.E. Roth, G. Stacey y W.E. Newton eds. Chapman and Hall, New York.
- Mandon, K., Kaminsky, P.A. y Elmerich, C. 1994. Functional analysis of the *fixNOQP* region of *Azorhizobium caulinodans*. *J. Bacteriol.* 176: 2560-2568.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. 1982. *Molecular Cloning a Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory).
- Markwell MAK, Haas SM, Vieber ZZ, Tolbert NE. 1978. A modification of the Lowry procedure to Simplify protein determinations in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem.* 87:206-210.
- Matsuyama, S., Fujita, Y. and Mizushima, S. 1993. SecD is involved in the release of translocated secretory proteins from the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J* 12: 265-270.
- Mimmack, M.L., Gallagher, M.P., Hyde, S.C., Pearce, S.R., Booth, I.R., Higgins, C.F. 1989. Energy-coupling to periplasmic binding protein-dependent transport systems: Stoichiometry of ATP hydrolysis during transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8257-8261.

- Minghetti, K.C., Goswitz, V.C., Gabriel, N.E., Hill, J.J. Barasi, C., Georgiou, C.D., Chan, S.I. and Gennis, R.B. 1992. Modified, large-scale purification of cytochrome *c* complex of *Escherichia coli* yields a two heme/one copper terminal oxidase with high specific activity. *Biochemistry* 31:6917-6924.
- Miranda, J.-R., Membrillo, J.-H., Tabche, M.L. and Soberón, M. 1996. *Rhizobium etli* cytochrome mutants with derepressed expression of cytochrome terminal oxidase and enhanced symbiotic nitrogen accumulation. *Appl Microbiol Biotechnol* 45:182-188.
- Nautiyal, C., van Berkum, P., Sadowsky, M.J. y Keister, D.L. 1989. Cytochrome mutants of *Bradyrhizobium* induced by transposon Tn5. *Plant Physiol.* 90: 553-559.
- Navarro, Y., Miranda, J. and Soberón, M. 1995. Cytochrome expression in two strains of *Bradyrhizobium* species. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 3:327-331.
- Nicholson, D.W., and Neupert, W. 1989. Import of cytochrome *c* into mitochondria: Reduction of heme, mediated by NADH and flavin nucleotides, is obligatory for its covalent linkage to apocytochrome *c*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:4340-4344.
- Nicholson, D.W., Stuart, R.A., and Neupert, W. 1989. Biogenesis of cytochrome *c*<sub>1</sub>. *J. Biol. Chem.* 264:281-298.
- Noel, K.D. ; Sanchez, A.;Fernandez,L.;Leemans,J.;and Cevallos,M.A. 1984. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutant with transposon Tn5 insertion. *J. Bact.* 158:148-155.
- O'Brian, M.R., and Maier R.J. 1983. Involvement of cytochromes and a flavoprotein in hydrogen oxidation in *Rhizobium japonicum* bacteroids. *J. Bacteriol.* 155 481-487.
- O'Brian, M. R., and Maier, R. J. 1987. Bacterial heme synthesis is required for expression of the leghemoglobin holoprotein but not the apoprotein in soybean root nodules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 3219-3223.
- O'Brian, M.R., and Maier, R.J. 1989. Molecular aspects of the energetics of nitrogen fixation in *Rhizobium-legume* symbioses. *Biochem. Biophys. Acta.* 974:229-246.
- Ohyama, K., Fukuzawa, H., Kohchi, T., Sano, T., Sano, S., Shirai, H., Umesono, K., Shiki, Y., Takeuchi, M., Chang, Z. and ... 1988. Structure and organization of *Marchantia polymorpha* chloroplast genome. I. Cloning and gene identification. *Mol Biol* 203: 281-298

- Page, M.D., Ferguson, S.J. 1989. A bacterial c-type cytochrome can be translocate to the periplasm as an apo form; the biosynthesis of cytochrome *cd1* (nitrite reductase) from *Paracoccus denitrificans*. *Mol. Microbiol.* 3:653-661.
- Page, M.D., Ferguson, S.J. 1990. Apo forms of cytochrome *c550* *Paracoccus denitrificans* in the absence of haem incorporation caused by either mutation or inhibition of haem synthesis. *Mol. Microbiol.* 4:1181-1192
- Palacios,R., Quinto,C., de la Vega,H., Flores,M., Fernandez,L., Hernandez,M., Ballado,T., and Soberon,G. (1983) *Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interactions*.Puhler (edt).Berlin: Springer Verlag.
- Pearce, S.R., Mimmack, M.L., Gallagher, M.P., Gileadi, U., Hyde, S.C. *et al.* 1992. Membrane topology of the integral membrane components, OppB and OppC, of the oligopeptide permease of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* 6:47-57.
- Pedersen, P.L., Carafoli, E. 1987. Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function. *Trends Biochem. Sci.* 12:146-150.
- Pettigrew, G.W., Moore, G.R. 1987. *Cytochromes c*. Springer Verlag, Berlin. pp. 160-179.
- Petronilli, V., Ames, G.F.-L. 1991. Binding protein-independent histidine permease mutants. *J. Biol.Chem.* 266:16293-16296.
- Poole RK (1983) *Bacterial Cytochrome Oxidases*. A structurally and functional diverse group of electron transfer proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 726:205-243.
- Powis, S.H., Mockridge, I., Kelly, A., Kerr, L.-A., Beck, S., *et al.* 1992. Polymorphism in a second ABC transporter gene located with the class II region of the MHC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:1463-1467.
- Preisig O, Anthamatten D, Hennecke H (1993) Genes for a Micro aerobically induced oxidase complex in *Bradyrhizobium japonicum* are essential for nitrogen-fixing endosymbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 3309-3313.
- Preisig, O., Zufferey, R., Thony-Meyer, L., Appleby, C. A. and Hennecke, H. 1996. A high-affinity *cbb<sub>3</sub>*-type cytochrome oxidase terminates the symbiosis-specific respiratory chain of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 178: 1532-1538.
- Pugsley, A.P., d'Enfert, C., Reyss, I., and Kornacker, M.G. 1990. Genetics of extracellular protein secretion by Gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 24:67-90.

- Pugsley, A.P. 1993 The complete general protein secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 57:50-108.
- Pugsley, A.P. 1993. The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 57:50-108.
- Puustinen, A., Finel, M., Haltia, T., Gennis, R.B. y Wikström, M. 1991. Properties of the two terminal oxidases of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 30: 3936-3942.
- Puustinen, A., Morgan, J.E., Verkhovsky, M., Thomas, J.W., Gennis, R.B. y Wikström, M. 1992. Low spin heme site of cytochrome o from *Escherichia coli* is promiscuous with respect to heme type *Biochemistry* 31: 10363-10369.
- Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Fernandez, L., Ballado, T., Soberón, G. and Palacios, R. 1982. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. *Nature*. (London). 299:724-726.
- Raitio, M. and Wikström, M. 1994. An alternative cytochrome oxidase of *Paracoccus denitrificans* function as a proton pump. *Biochim. Biophys. Acta* 1186:100-116.
- Rees, D.C., Kim, J., Georgiadis, M., Chan, M.K., Komiya, H., Woo, D., Chirino, A.J., Schlessman, J. y Hsu, B.T. 1993. Structures and functions of the nitrogenase proteins. En R. Palacios, J. Mora y W.E. Newton (eds.). *New horizons in nitrogen fixation*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. pp.393-398.
- Reidl, J., Romisch, K., Ehrmann, M., Boos, W. 1989. MalK, a novel protein involvrd in regulation of the maltose system of *Escherichia coli* is highly homologous to the repressor protein GalR, CytR and lacI. *J. Bacteriol.* 171:4888-4899.
- Rice, C.W., and Hempfling, W.P. 1978. Oxygen-limited continuous culture and respiratory energy conservation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 134:115-124.
- Riordan, J.R., Rommens, J.M., Keren, B.-S., Alon, N., Rozmahel, R., et al. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245:1066-1073
- Ritz, D., Bott, M. y Hennecke, H. 1993. Formation of several bacterial c-type cytochromes requires a novel membrane-anchored protein that faces the periplasm. *Mol. Microbiol.* 9: 729-740.
- Ritz, D., Thöny-Meyer, L., Hennecke, H., 1995 The *cycHJKL* gene cluster plays an essential role in the biogenesis of c-type cytochromes in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Gen. Genet.* 247:27-38

- Ronson, C.W. and Astwood, P.M. (1985) in Nitrogen Fixation Research Progress (Evans, H.J., Bottomley, P.J. and Newton, W.E., eds.), pp. 201-207. Martinus Nijhoff, Boston.
- Saraste, M. and Castresana, J. 1994. Cytochrome oxidase evolved by tinkering with denitrification enzymes. *FEBS Lett.* 341:1-4.
- Schuster, W., Combettes, B., Flieger, K. and Brennicke, A. 1993. A plant mitochondrial gene encodes a protein involved in cytochrome c biogenesis. *Mol Gen Genet* 239: 49-57.
- Schlüter, A., Patschkowski, Weidner, S., Uden, G., Hynes, M.F. y Priefer, U. 1993. Functional and regulatory characteristics of FnrN, an oxygen-responsive transcriptional activator in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. En R. Palacios, J. Mora y W.E. Newton (eds.). New horizons in nitrogen fixation. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. pp.393-398.
- Simon R, Priefer U, Puhler A., 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technol.* 1:784-791.
- Smith, A., Hill, S. y Anthony, C. 1990. The purification, characterization and role of the d-type cytochrome oxidase of *Klebsiella pneumoniae* during nitrogen fixation. *J. Gen. Microbiol.* 136: 171-180.
- Soberón, M., Williams, H.D., Poole, R.K. y Escamilla, E. 1989. Isolation of a *Rhizobium phaseoli* cytochrome mutant with enhanced respiration and symbiotic nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* 171: 465-472.
- Soberón, M., Membrillo-Hernández, Aguilar, G.R. y Sánchez, F. 1990. Isolation of a *Rhizobium phaseoli* Tn5-induced mutants with altered expression of cytochrome terminal oxidases o and aa<sub>3</sub>. *J. Bacteriol.* 171: 465-472.
- Soberón, M., Aguilar, G.R. and Sánchez, F. 1993. *Rhizobium phaseoli* cytochrome c-deficient mutant induces empty nodules on *Phaseolus vulgaris* L. *Mol. Microbiol.* 8: 159-166.
- Solioz, M., Carafoli, E., and Ludwig, B. 1982. The cytochrome c oxidase of *Paracoccus denitrificans* pumps protons in a reconstituted system. *J. Biol. Chem.* 257:1579-1582.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
- Spies, T., Bresnahan, M., Bahram, S., Arnold, D., Blanck, G., et al. 1990. A gene in the human major histocompatibility complex region controlling the class I antigen presentation pathway. *Nature* 348:744-747.

- Spiro, S. y Guest, J.R. 1991. Adaptive responses to oxygen limitation in *Escherichia coli*. Trends in Biochemical Sciences. 16: 310-314.
- Stuart, R. A., and Neupert, W. 1990. Apocytochrome c: an exceptional mitochondrial precursor protein using an exceptional import pathway. Biochimie 72: 115-121.
- Surpin, M. A., Moshiri, F., Murphy, A. M. and Maier, R. J. 1994. Genetic evidence for a fourth terminal oxidase in *Bradyrhizobium japonicum*. Gene 143: 73-77.
- Tabche, M.L. 1995. Tesis de Maestría, UNAM. Identificación de genes involucrados en la expresión de citocromos tipo c y la oxidasa terminal  $a+a_3$  de *Rhizobium etli*.
- Taniuchi, H., Basile, G., Taniuchi, H., and Veloso, D. 1983. Evidence for formation of two thioether bonds to link heme to apocytochrome c by partially purification cytochrome c synthetase. J. Biol. Chem. 258:10963-10966.
- Thöny-Meyer, L., James, P., Hennecke, H. 1991. From one gene to two proteins: the biogenesis of cytochrome b and  $c_1$  in *Bradyrhizobium japonicum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:5001-5005.
- Thöny-Meyer, L., Ritz, D., Hennecke, H. 1994. Cytochrome c biogenesis in bacteria: a possible pathway begins to emerge. Mol. Microbiol. 12:1-9.
- Trowsdale, J., Hanson, I., Mockridge, I., Beck, S., Townsend, A., et al. 1990. Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporters. Nature 348:741-744.
- Trumpower, B.L. 1990. Cytochrome  $bc_1$  complexes of microorganisms. Microbiol. Rev. 54: 101-129.
- van der Bliek, A.M., Kooiman, P.M., Schneider, C., Borst, P. 1988. Sequence of *mrD3* encoding a human P-glycoprotein. Gene 71:401-411.
- von Wachenfeldt, C. and Hederstedt, L. 1990a. *Bacillus subtilis* 13-kilodalton cytochrome c-550 encoded by *cycA* consists of a membrane-anchor and a heme domain. J. Biol. Chem. 265: 13939-13948.
- von Wachenfeldt, C., and Hederstedt, L. 1990b. *Bacillus subtilis* holo-cytochrome c-550 can be synthesised in aerobic *Escherichia coli*. FEBS Lett 270:147-151.

- Vyas, N.K., Vyas, M.N., Quioco, F.A. 1991. Comparison of the periplasmic receptors for L-arabinase, D-glucose/D-galactose and ribose. *J. Biol. Chem.* 266:5226-5237.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., Gay, N.J. 1982. Distantly related sequence, in the a- and b-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1:945-951
- Wandersman, C. 1992. Secretion across the bacterial outer membrane. *Trends Genet.* 8:317-322.
- Wang, R., Seror, S.J., Blight, M., Pratt, J.M., Broome-Smith, J.K., *et al.* 1991. Analysis of the membrane organization of an *Escherichia coli* protein translocator, HlyB, a member of a large familia of prokaryotic and eukaryotic surface transport proteins. *J. Mol. Biol.* 217:441-454.
- Yoshimura, A., Kuwazuru, Y., Sumizawa, T., Ichkawa, M., Ikeda, S.-I., *et al.* 1989. Cytoplasmic orientation and two-domain structure of the multidrug transporter, P-glicoprotein, demonstrated with sequence specific antibodies. *J. Biocl. Chem.* 264:16282-16291.
- Yun, C.-H., Beci, R., Croft, A.R., Kaplan, S. and Gennis, R.B. 1990. Cloning and DNA sequencing of the *fbc* operon encoding the cytochrome bcl complex from *Rhodobacter spheroides*: Characterization of *fbc* deletion mutants, and complementation by a site-specific mutational variant. *Eur. J. Biochem.* 194:399-411.
- Yun, C.-H., Barquera, B., Iba, K., Takamiya, K.-I., Shapleigh, J., Croft, A.R., and Gennis, R.B. 1994. Deletion of the gene encoding cytochrome *bs62* from *Rhodobacter spheroides*. *FEMS Microbiol. Lett.* 120:105-110.
- Zhang, J.T., and Ling, V. 1991. Study of membrane orientation and glycosylated extracellular loop of mouse P-glycoprotein by in vitro translation *J. Bio. Chem.* 266:18224-18232.
- Zimmermann, B.H., Nitsche, C.I., Fee, J.A., Rusnak, F. and Münck, E. 1988. Properties of a copper-containing cytochrome *ba3*: a second terminal oxidase from extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:253-264.



## Cloning and sequence analysis of the *Rhizobium etli* *ccmA* and *ccmB* genes involved in *c*-type cytochrome biogenesis

Germán R. Aguilar, Mario Soberón \*

Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos CP62271, México

Received 21 April 1996; revised 20 June 1996; accepted 21 June 1996

### Abstract

In this paper we describe the sequence analysis of two *Rhizobium etli* genes (*ccmA* and *ccmB*) which are believed to participate in the transport of the haem moiety to the periplasm in other bacterial species. The characterized DNA region was isolated by complementation of a *R. etli* Tn5mob induced mutant (CFN4201) which was affected in the production of *c*-type cytochromes. Sequence analysis of this region identified three open reading frames, two were identified as the *ccmA* and *ccmB* genes. The predicted protein sequence of *ccmA* showed significant homology with ATP binding proteins of the ABC-type transporter systems, while *ccmB* encodes for a hydrophobic protein probably associated with the *ccmA* gene product. The Tn5mob insertion in CFN4201 strain was located in the carboxy terminus of CcmB. Restriction mapping of the EcoRI fragment containing the Tn5mob insertion showed that it involved a deletion of approximately 1.5 kb. Mutagenesis of the wild-type region with a miniMu transposon and complementation analysis showed that the mutation in *ccmB*, and not the deletion, was responsible for the phenotype of CFN4201 strain and that *ccmA* and *ccmB* are independent transcription units. We found that a region located downstream of *ccmB* is reiterated twice, one near the chromosomal *ccmA-ccmB* locus while the second in plasmid *e*. Finally, CFN4201 membranes had detectable levels of *c*<sub>1</sub> apoprotein which did not contain bound haem. This data could suggest that haem binding to the apoprotein occurs after the translocation of the apo form of *c*<sub>1</sub> to the membrane.

**Keywords:** *c*-Type cytochromes; Biogenesis; Haem transport; Symbiosis; cbb3 oxidase; Nitrogen fixation; ABC transporters

### 1. Introduction

Cytochromes are electron carriers that transfer electrons from the reduced quinol in the membrane to a final acceptor, usually O<sub>2</sub>. In contrast to other cytochromes, *c*-type cytochromes carry their prosthetic haem group covalently attached to the apoprotein (Pettigrew and Moore, 1987). All *c*-type cytochromes are either located in the membrane or in the periplasm. *c*-Type cytochromes are widely distributed among bacteria and form part of different electron transport chains with different terminal oxidases (Poole, 1983). Thus, their role in electron transport and energy production is fundamental.

Previous studies have demonstrated that *c*-type cytochromes are important for nitrogen fixation during *Rhizobium*-plant symbiosis (O'Brian and Maier, 1989; Ramseir et al., 1991; Soberón et al., 1993; Vargas et al., 1994). Moreover, the symbiotic terminal oxidase has been shown to contain *c* and *b*-type haem (Preisig et al., 1993; Mandon et al., 1994). This terminal oxidase is thought to possess a high affinity for oxygen and to be efficiently coupled to ATP production (Preisig et al., 1993). Thus, this enzyme enables nitrogen fixation to occur in a micro-aerobic environment as it occurs within the nodule tissue (Witty and Minchin, 1990).

*c*-type cytochromes undergo a complex posttranslational process. In bacteria, several genes participating in the *c*-type cytochrome biogenesis pathway have been described (for review, see Thöny-Meyer et al., 1994). Mutations in any of these genes result in the loss of all *c*-type cytochromes (Thöny-Meyer et al., 1994). In *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhodobacter capsulatus* two homologous clusters of at least four genes (*cycV/helA*, *cycW/helB*, *ORF263/helC* and *cycX/helD*)

\* Corresponding author. Tel. +52 5 6227618; Fax +52 73 172388; e-mail: mario@ibt.unam.mx

Abbreviations: aa, aminoacid(s); bp, base pair(s); kb, kilobase(s); kDa, kilodalton(s); Km, kanamycin; ORF, open reading frame; Tc, tetracycline.

are believed to participate in the transport of the haem group to the periplasm where the covalent binding of the haem group to the apoprotein occurs (Ramseir et al., 1991; Beckman et al., 1992). Sequence analysis suggests that the products encoded by these genes are membrane bound. The *CycV/HelA* proteins shows high homology to the ATP binding proteins of the family of ABC transporter proteins. Members of this family are widely distributed in prokaryotes and eukaryotes and are involved in the transport of a wide variety of molecules (Fath and Kolter, 1993). Usually, one or two hydrophobic proteins are associated with the ATP binding component to give specificity to the transport system (Fath and Kolter, 1993). The *cycW/helB* genes code for hydrophobic membrane proteins which were reported to be part of the transport system together with the ATP binding component (*cycV/helA*) (Ramseir et al., 1991; Beckman et al., 1992). In *R. capsulatus* it was shown that mutations in the *helABC* genes did not impair the transport of the apoprotein of cytochrome  $c_2$  to the periplasm, excluding the possibility that this system is directly involved in the transport of the *c*-type apoproteins to the periplasm (Beckman et al., 1992). The *HelC* protein and the gene product encoded by the

ORF263 of *R. capsulatus* and *B. japonicum* respectively possess an aminoacid motif resembling a haem binding site, suggesting that this system may be involved in the transport of haem to the periplasm (Thöny-Meyer et al., 1994). The cloning and sequence of a gene cluster involved in *c*-type cytochrome biogenesis has been reported in *Escherichia coli*. Two genes (*ccmA* and *ccmB*) with significant homologies to the *cycV/helA* and *cycW/helB* genes were identified in this gene cluster (Thöny-Meyer et al., 1995).

We have previously reported the isolation of an *R. etli* mutant with low levels of *c*-type cytochromes and unable to fix nitrogen during symbiosis (Soberón et al., 1989). In this work we report the cloning and sequence of the mutated gene of this strain. Our sequence analysis identified the mutated gene as *ccmB* gene and showed the existence of a *ccmA* gene closely linked to *ccmB*. Recently a new nomenclature was adopted for genes involved in *c*-type cytochrome biogenesis in bacteria (Thöny-Meyer, L. and Hennecke, H., personal communication). We have adopted this new nomenclature and, therefore, renamed the *cycV/helA* genes as *ccmA* and the *cycW/helB* genes as *ccmB* as proposed.

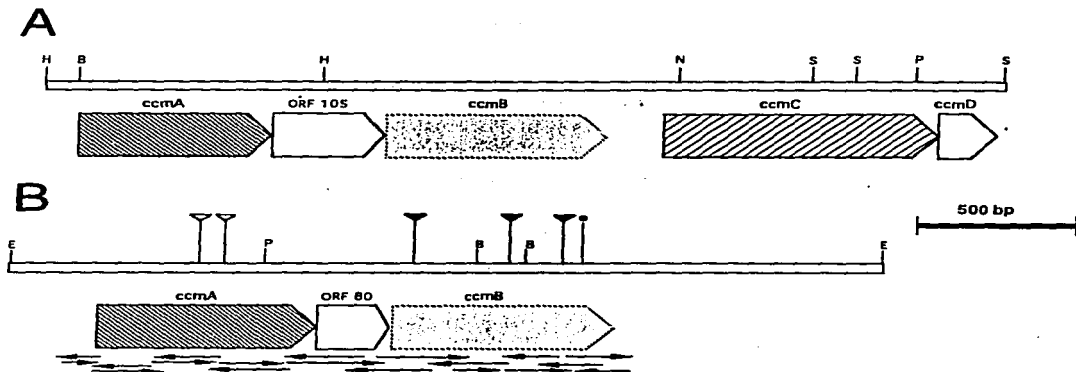


Fig. 1. Physical-genetic map of the sequenced region. (A) Physical-genetic map of the *cyVWX* genetic region from *B. japonicum* (Ramseir et al., 1991). (B) Physical-genetic map of the *R. etli* 3 *Eco* R1 fragment. Vertical bars represent the position of Tn5 (●) and miniMu (▼) insertions. The open symbols for the miniMu insertions represent insertions which complemented CFN4201 strain; closed symbols are miniMu insertions which did not complement the CFN4201 strain (see Section 2.2). The position of the Tn5 $\mu$  and that of the miniMu's were verified by sequencing. Boxes with arrowheads represent the genes described in this paper. Homologous genes are highlighted in corresponding patterns. Non-homologous genes are white. The restriction sites used in subcloning for sequencing are shown. The arrows below indicate the sequence strategy. Letters are restriction enzymes B, *Bam*III; E, *Eco*R1; H, *Hind*III; N, *Nhe*I; P, *Pst*I; S, *Sal*I. The DNA was sequenced using the USB sequencase 2.0 sequencing kit, as specified by the manufacturer, from appropriate subclones. A Tn5 specific oligonucleotide primer was utilized for sequencing the Tn5 borders (Egelhoff et al., 1985). Computer-assisted sequence analysis and comparisons with the GenBank were done using the 'Gene works 2.4' program from Intelligent Inc. Mutagenesis of the 3 kb fragment with the miniMu transposon was performed as reported (Ratet et al., 1988). The nucleotide sequence reported here has the accession number U52866 in the GenBank.

## 2. Experimental and discussion

### 2.1. CFN4201 mutation affected the *cemB* gene

We previously isolated a *R. etli* mutant (CFN4201) unable to oxidize *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine (TMPD). Colonies with functional cytochromes stain blue in a few seconds in the presence of TMPD. CFN4201 strain produced low levels of *c*-type cytochromes and was unable to fix nitrogen during symbiosis with bean plants (Soberón et al., 1989). In order to identify the mutated gene in the CFN4201 strain we cloned the *EcoRI* fragment containing the Tn5 insertion. An *EcoRI* digest of CFN4201 total DNA was ligated into pBR329, transformed into *E. coli* cells and colonies were selected as resistant to Tc (pBR329) and Km (Tn5*mob*) (plasmid pGMR1). From the restriction analysis of this fragment, we found that the right border of the Tn5*mob* was deleted since all the restriction sites from *HindIII* to the end of the border were missing. The size of the deletion was at least 1200 bp if we suppose that no more DNA was deleted after the *HindIII* restriction site. In fact, a *PvuII* restriction site at 250 bp to the 5' of the *HindIII* is still present in the deleted Tn5*mob* border (data not shown). The wild-type gene was cloned after transfer of a cosmid gene bank of the wild-type

strain in CFN4201 strain and selection of plasmids which complemented the TMPD-phenotype of this strain. Two overlapping cosmids were identified and characterized (pcos59 and pcos81). From cosmid pcos59 we subcloned a 3 kb *EcoRI* fragment which complemented CFN4201 TMPD and symbiotic phenotypes (pGMR2, see below). The size of the *EcoRI* fragment containing the wild-type gene suggested that the deletion in the Tn5 border was of approximately 1.5 kb of DNA since the Tn5 *mob* is 7.2 kb and a 3 kb fragment would result in the creation of a 10.2 kb and not of a 8.7 kb fragment.

In order to identify the mutated gene, we sequenced the Tn5*mob* borders in the mutated fragment (8.7 kb *EcoRI* fragment) and completed the sequence in the wild-type fragment. The 1834 bp sequence reported here was obtained using the strategy shown in Fig. 1. We identified three ORF's of 215, 80 and 219 aa, respectively. A search in the Genbank identified the first and the third ORF's as the *cemA* and *cemB* genes. The second ORF did not show a significant homology with any protein sequence so far described. Open reading frames had been identified between *cemA* and *cemB* genes in *R. capsulatus* and *B. japonicum*; in both cases these ORF's were not involved in *c*-type cytochrome biogenesis (Ramseier et al., 1991; Beckman et al., 1992), further work will reveal if ORF80 in *R. etli* is involved or not

## A

|           |   |     |
|-----------|---|-----|
| RHIET     | M---H-LTAE NAAARCGED IFINISFYLA AGEALVLYGR NGSCSTLLR VVACLKPKC CTVIFGDKES PEGQIP-GEV SIVYGIQRNAN KNELIVAFNL DFRHIFLRST C55ADLSVED | 115 |
| BRAJA     | M---LLAVD QLVSRGGIA VLECVSFSLA ACHVALVLRQ NGICRITILLR TLAGQPPILA GRVSN----- P--EG IAVAHIAADCL KALISVRENL SFRAHFL---               | 100 |
| RIIOCA    | M---LLAVD QLVSRGGIA VLECVSFSLA ACHVALVLRQ NGICRITILLR TLAGQPPILA GRVSN----- P--EG IAVAHIAADCL KALISVRENL SFRAHFL---               | 100 |
| HAIEIN    | MEQKRLSLQ NLSGCHGEV FLRALDIGNV SDQFVGHIG NGICRISLIR TLAGVPLRE CEVRVDSIAI SROREYVIRN LLVGHV SCV KPELFAFNL QFYRISQA-                | 119 |
| ECOLI     | ML---LEAR HFLDKERT LFSGLSTLA AGEVWVLSV NGICRITLR LTLGSRVLA CEVTLKQPLN LKRIALLEN KRIALLEN IYVHQDU---                               | 109 |
| Consensus | M---L---L---L---C-RGER--F-GLSF-L AGEAV--G NG-GKITLLR-LAGL-L-P...G-V-----P-E---VYLG-H G-K-LTV-ENL -FV-----                         | 120 |
| RHIET     | ATEAVGCSGI SHLPYFGLSA GQQRRTAFAK LLVAIVRPMV LDEPITALDA SADRI FACLI EAHAKKGVV LAATHQVGL KHAEQKHWG F-----AGV DRVGVG----             | 215 |
| BRAJA     | SIATVGDIA THYATLSA GQRRLSAR LLVRRVTR LDEPTIALDV AGQVHGQGN RDRHARGGI IAAIHAGLI I-DERFHIGG VA-----                                  | 200 |
| RIIOCA    | ALRNMINAL EIRAAASLSA GQRRLICAR LLVIFGRPMVA LDEPYSIDA ASVALFAEVY RHHAAAGCAA LAMATHIDLK SEARVLDLAF FRARFEAGG                        | 214 |
| HAIEIN    | LLKVVGLGR EDHPAAQSLA GQQRRIALGR LWSQAPVY LDEPITALDK KGVSEILFAF DEHAORGQIV LLTSHQVPS SHLCKNLSEA Y-----                             | 212 |
| ECOLI     | ALADQAGCF EDIYPMVSA GQQRVVALR LWTITATVI LDEPTIALDV NGVDRITQRI AQHTEGGCV IITHQPLVY AESKIRRTSI T-----                               | 205 |
| Consensus | ALA-VGL-G- EIRPAA-LSA GQQR-ALAR L-L---RP-MV LDEPTIALD- -GV--F-L---HLA-GVIV LAIHQ-LG- -L-----R-----                                | 234 |

## B

|           |   |     |
|-----------|---|-----|
| RHIET     | HYAL--FL-R DLKESIRA---GGGALIGV LFFLVVAVI PFGVDLKL LSRIGPAIVY ICALLSALIG LDRIFQERD DQSLDLMND EPLVLTIVLY KCFAHWATG LPIVAISPLI   | 113 |
| BRAJA     | HYALSALTR DRIARLV---GGGALIGV LFFLVVAVI PFVVDLAL LSRIGPAILV LCALLSALY LDRIFRQADH DQSLDLEFMS RIFLEACAA KALAHNLAAQ LPIVAISPLI    | 116 |
| RIIOCA    | HYAL--LSR DLKESIRA---GGGALIGV LFFLVVAVI PFGVDGSI LSRISGILV LCALLSALY LDRIFRQADH DQSLDLEFMS RIFLEACAA KALAHNLAAQ LPIVAISPLI    | 113 |
| HAIEIN    | MYL-EIKR ELQIAHK---MAEILNPL WFFLVITLF PVVIGDPLK LSRIPAGIIV VAALLSALS FERLFRDQF DQSLDLEFMS RIFLEACAA KALAHNLAAQ LPIVAISPLI     | 115 |
| ECOLI     | HA-----FMR FLRELRFV RNSAEIAMPL WFFLVITLF PLSIGDPLQ LSRIPAGIIV VAALLSLSA LERLFRDQL DQSLDLEFMS RIFLEACAA KALAHNLAAQ LPIVAISPLI  | 115 |
| Consensus | HYAL---FL-R DLKELR-R---GGG-L-L- FFL-VVVI -PF-VGDP-L LSRIPAGIIV -GALLS-L- LDRLF-.D.- DQSLDLE-...P-L-VAE K-AIM-IG LPL-ASPL- 120 |     |
| RHIET     | GLFNMDFAA IGAIMITLLV GSPATFFIGA GCAVAVALP AGGLVLSIVY LPLTIPVLIF GVSAIYAIV DPAPFLPFL IILIALITFA VIGPMAAALA LRNTAD-             | 219 |
| BRAJA     | GLLNDMDVA TGAVALITLA GPALVTFQV IGAIVAVTLR RGLLMAVLY LPLTIPVLIF GVASQAVIV GVSFGAPFS ICALSVLY VIGPFAAAS LRHGD-                  | 222 |
| RIIOCA    | AVLEPMAVA YLRDVSILG GPALVTFQV IGAALVAVTLR RGLLMSLVY LPLTIPVLIF GAEVYVIG GAEVYVIG GAEVYVIG GAEVYVIG GAEVYVIG GAEVYVIG          | 217 |
| HAIEIN    | ALLLSLEVI WYVALVITLL GPVLSICA IGVAVLTVGR RGVVLSIVY VPLFIPVLF ASSVLEAAGL N-VPTGGLA IGLMAGVA LSPFAATAA LRISLD-                  | 221 |
| ECOLI     | ALLLGMHYV WYVALVITLL GPVLSICA IGVAVLTVGR RGVVLSIVY LPLTIPVLF ATAAAMDASH H-LPVDVGA IGLMAGVTA TSPFAATAA LRISIQ-                 | 220 |
| Consensus | ALLL-LD-.A -A-LITLL GPV-L-F-GA GAEVYVIG RGLLSLVY LPL-IPVLI G-V-A-A---P-.P-LA TL-AL-...L-PFA-AAA LR-LD- 227                    |     |

Fig. 2. Amino acid alignments of the predicted protein products of the *cemA* (A) and *cemB* (B) genes with related bacterial proteins. RHIET, *R. etli*; BRAJA, *B. japonicum*; RIIOCA, *R. capsulatus*; HAIEIN, *H. influenzae*; ECOLI, *E. coli*. The ATP binding cassette is underlined with two lines in the *cemA* protein, and the sequences underlined with single lines correspond to the structural loops conserved in this type of protein (see Section 2.1).

in *c*-type cytochrome biogenesis. Fig. 2A shows an alignment of the predicted protein of the *R. etli* *ccmA* gene with the *B. japonicum*, *R. capsulatus*, *Haemophilus influenzae* and *E. coli* *ccmA* genes. The *R. etli* *ccmA* gene product shares an homology (identity) of 43, 41, 34 and 34% with the *ccmA* gene products of the organisms mentioned above. The CcmA protein shows extensive homology with other ATP binding proteins involved in the active transport of a wide range of molecules (ABC-type transporters). This protein has the ATP binding domain which is conserved in this type of protein and also three conserved structural regions (see Fig. 2A). Fig. 2B shows an alignment of the *R. etli* *ccmB* gene product with the *ccmB* gene products of the organisms mentioned above. The *R. etli* *ccmB* gene product shares an homology (identity) of 61, 45, 35 and 38% with the *B. japonicum*, *R. capsulatus*, *H. influenzae* and *E. coli* *ccmB* gene products, respectively. The predicted amino acid sequence of the *R. etli* *ccmB* gene predicts a membrane protein with six transmembrane spanning regions (data not shown), similar to the gene products of the *B. japonicum* and *R. capsulatus* *ccmB* genes, respectively (Ramseir et al., 1991; Beckman et al., 1992). The Tn5mob insertion in CFN4201 strain was located within *ccmB* at aa 199 in the carboxy terminus (see Fig. 1B).

## 2.2. The *ccmB* mutation is responsible for the TMPD<sup>-</sup> phenotype of CFN4201

The Tn5mob insertion in the *ccmB* gene included a deletion of roughly 50–300 bp to the 3' end of *ccmB*. Therefore it was possible that the phenotype shown by the mutant strain was due to the deletion of a gene located at the 3' end of *ccmB* rather than at the Tn5mob insertion in the *ccmB* gene. In order to identify the gene responsible for the TMPD<sup>-</sup> phenotype of CFN4201, we mutagenized the 3 kb *EcoRI* fragment with a miniMu transposon. After transfer of the mutagenized plasmids in the CFN4201 strain, we selected 3 independent miniMu insertions which did not complement the TMPD<sup>-</sup> phenotype of this strain. Sequence analysis of the miniMu borders, demonstrated that the 3 insertions selected mapped within the *ccmB* gene (see Fig. 1B). Two extra miniMu insertions which were able to complement the TMPD<sup>-</sup> of CFN4201 strain mapped in the *ccmA* gene (see Fig. 1B), showing that both genes are organized as independent transcription units and that the mutation in the *ccmB* gene is solely responsible for the phenotype of CFN4201 strain.

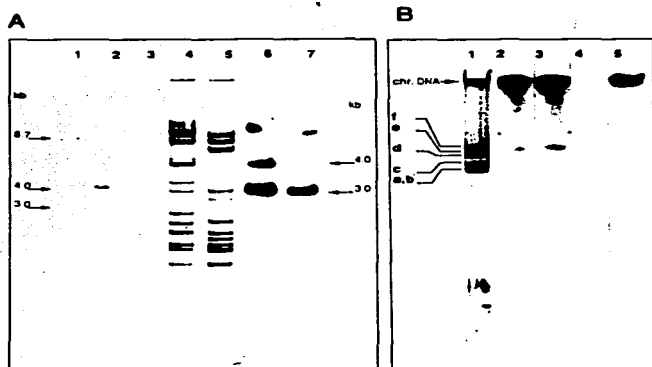


Fig. 3. Southern blot analysis of the *ccmA* and *ccmB* region and localization of the CFN4201 mutation. (A) Total DNA's and cosmids digested with *EcoRI*: lane A1, CE3; lanes A2 and A3, CFN4201; lanes A4 and A5, cosmids pcos59 and pcos81, respectively (ethidium bromide stained); lanes A6 and A7, cosmids pcos59 and pcos81. Hybridization probes were: 8.7 kb *EcoRI* containing the Tn5mob insertion in *ccmB* (lanes A1 and A2), Tn5 (lanes A3) and the wild-type 3 kb *EcoRI* fragment (lanes A6, A7). (B) Southern blot of plasmid profiles (plasmids are labelled as reported by Quinto et al., 1982): lane 1, ethidium bromide stained of strains CE3; lanes B2 and B4, CE3; lanes B3 and B5, CFN4201. Hybridization probes were: the wild-type 3 kb *EcoRI* fragment (lanes B2 and B3) and Tn5 (lanes B4 and B5). Cloning, restriction mapping, transformation, plasmid isolation, nick translation, Southern blotting and hybridization were performed according to standard protocols (Maniatis et al., 1982). Isolation of chromosomal DNA from *R. etli* cells was done as described (Martinez et al., 1985).

### 2.3. A DNA region contiguous to *ccmB* is reiterated

We performed Southern blot hybridization of total *EcoRI* restricted DNA from CFN4201 and the wild-type strains against the *EcoRI* fragment containing the *Tn5mob* insertion of CFN4201 strain. Fig. 3A shows

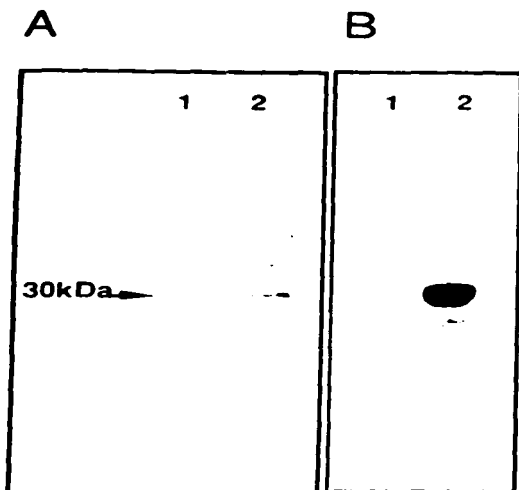


Fig. 4. Immunodetection and haem content of  $c_1$  protein in CFN4201 membranes. (A) Western immunoblotting of CFN4201 membranes (lane 1) and CE3 membranes (lane 2) using bovine cytochrome  $c_1$  antiserum. Membrane proteins were blotted from 12% polyacrylamide-SDS gels loaded with 100  $\mu$ g protein, to nitrocellulose membranes and immunodetection was performed using the Western blot detection kit (Problot A-P) from Promega with alkaline phosphatase. The antiserum was diluted 1000-fold before incubation with nitrocellulose paper as previously described (Soberón et al., 1993). (B) Analysis of c-type cytochromes (haem stain) in membranes of CFN4201 (lane 1) and CE3 (lane 2). c-Type haem proteins were detected after 12% acrylamide-sodium dodecyl sulfate gel (SDS-PAGE) electrophoresis which were loaded with 600  $\mu$ g protein and run. After electrophoresis c-type cytochromes were revealed by the peroxidase activity of the haem moiety. Non-covalent bound haem (b, a, o) is lost due to denaturing conditions of the electrophoresis. Protein haem peroxidase detection was done with the Amersham ECL Western blotting detection reagents as reported (Vargas et al., 1993). Gels were incubated with ECL detection reagents and exposed to an auto-radiogram. Membranes were prepared from 10 liter cultures grown for 24 h on PY medium (Noel et al., 1984). Cells were harvested by centrifugation, washed and suspended (30% w/v) in 50 mM Tris hydrochloride (pH 7.4), 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM  $\text{MgCl}_2$ . Cell membranes were prepared mechanically as previously described (Barquera et al., 1991). Protein was measured as described (Markwell et al., 1978), using serum albumin as standard.

that this fragment hybridized both with a 3 kb band in the *EcoRI* digest of the wild-type strain and also with a 4 kb fragment (lane A1). This figure shows that the *Tn5mob* was inserted into the 3 kb fragment in CFN4201 strain since the 3 kb signal was absent in the *EcoRI* digest of this strain and a new 8.7 kb signal appeared in its place. In addition, a 4 kb signal was present in the CFN4201 strain (see Fig. 3, lane A2). As expected, the *EcoRI* digest of CFN4201 showed only the 8.7 kb signal when hybridized against *Tn5* sequences (lane A3). Hybridization of *EcoRI* digests of the two cosmid clones previously isolated against the 3 kb *EcoRI* fragment containing the *ccmA* and the *ccmB* genes showed that *pcos81* contains the 3 kb *EcoRI* fragment while plasmid *pcos59* has both the 4 kb and the 3 kb *EcoRI* fragments (see Fig. 3A, lanes A6 and A7). The 4 kb fragment did not complement the  $\text{TMPD}^-$  phenotype of the CFN4201 strain (data not shown). These data show that the DNA reiteration in the 4 kb fragment did not include a functional *ccmB* gene. Plasmid *pcos59* was hybridized against two DNA probes which contained either only the *ccmA-ccmB* genes or only the *ccmB* gene (obtained by PCR). It was found that these probes only hybridized with the 3 kb fragment and not with the 4 kb fragment (data not shown).

*R. etli* CE3 strain contains 5 megaplasmids. Plasmid d is the plasmid which contains most of the *fix* and *nod* genes (symbiotic plasmid) (Quinto et al., 1982) (see Fig. 3B, lane 1). In order to locate in the genome the mutation present in CFN4201 we hybridized plasmid profiles of the wild-type and mutant strains with the 3 kb *EcoRI* fragment and with *Tn5*. Fig. 3B shows that the *Tn5* hybridized in the chromosome region of CFN4201 strain (lanes B4 and B5). Fig. 3B shows that the 3 kb fragment containing the *ccmA* and *ccmB* genes hybridized with the chromosome and with plasmid *e* in both the wild-type and CFN4201 strains (lanes B2 and B3). These data show that the mutation in CFN4201 strain is located in the chromosome. However, a sequence present in this 3 kb *EcoRI* fragment is reiterated in two others 4 kb *EcoRI* fragments; one is located in the chromosome close to the *ccmA-ccmB* locus (present in cosmid *pcos59*) and the other in plasmid *e*.

### 2.4. CFN4201 strain produces $c_1$ apoprotein

The *ccmA* and *ccmB* genes are believed to be involved in the transport of the haem moiety to the periplasm (Beckman et al., 1992; Ramseir et al., 1991). In *R. capsulatus*, a *ccmA-ccmB* deletion mutant was still able to translocate to the periplasm a protein fusion of the aminoterminal of apocytochrome  $c_2$  fused with alkaline phosphatase, suggesting that this transport system was not involved in protein translocation (Beckman et al., 1992). Spectrophotometric analysis of CFN4201 membranes showed that this strain produced detectable levels

of *c*-type cytochromes (Soberón et al., 1989); nevertheless, the spectral data obtained could not definitively distinguish between *c*-type and *b*-type cytochromes. In addition, we did not have any evidence that the mutation in CFN4201 strain affected the production of the corresponding apoproteins. Therefore we analyzed the production of proteins containing *c*-type haem (covalent bound haem) and also the production of apocytochrome  $c_1$  which is part of the electron transfer  $bc_1$  complex. For this purpose, we utilized an antibody raised against bovine  $c_1$  cytochrome. Fig. 4A shows that CFN4201 membranes had low but detectable levels of  $c_1$  apoprotein when compared to the wild-type strain; nevertheless, the analysis of *c*-type proteins by their haem content revealed that the apocytochrome  $c_1$  did not contain bound haem in CFN4201 strain (see Fig. 4B). In *Paracoccus denitrificans* a mutant lacking *c*-type cytochromes was shown to translocate the apo-forms of cytochrome  $cd_1$  and cytochrome  $c_{350}$  to the periplasm in the absence of haem binding (Page and Ferguson, 1989, 1990).

A central question with respect to the translocation of cytochrome *c* is whether haem is attached to the apoprotein before, during, or after export (to the membrane or the periplasm). Four gene products which are believed to catalyze the covalent attachment of the haem to the apoprotein are located in the membrane facing the periplasm (Ritz et al., 1993, 1995; Kereszt et al., 1995; for review, see Thöny-Meyer et al., 1994). Our data support the hypothesis that the covalent attachment of the haem moiety to  $c_1$  apoprotein is not a necessary step to translocate it to the membrane.

#### Acknowledgement

We are grateful to Alejandra Bravo for reading the manuscript, to Dr. Diego González-Alphen and Miriam Vázquez-Acevedo for the bovine cytochrome  $c_1$  rabbit antiserum and to Paul Gaytan, Eugenio Bustos and Claudia Morera for their technical assistance. This work was supported by the European Union through the Scientific Co-operation Program, contract no. ERBCI1\*CT940042, by CONACyT contract no. 4020-N9403 and by DGAPA IN204291. G.R. Aguilar would like to thank CONACyT (No. 55278) and PADEP (No. 030301) for financial support during work on his PhD.

#### References

- Barquera, B., García-Horsman, A. and Escamilla, J.E. (1991) Cytochrome *d* expression pattern in free-living *Rhizobium phaseoli*. Arch. Microbiol. 155, 114-119.
- Beckman, D.L., Trawick, D.R. and Kranz, R.G. (1992) Bacterial cytochromes *c* biogenesis. Genes Dev. 6, 269-283.
- Egelhoff, T.T., Fisher, R.F., Jacobs, T.W., Mulligan, J.T. and Long, S.R. (1985) Nucleotide sequence of *Rhizobium meliloti* 1021 nodulation genes: *nodD* is read divergently from *nodABC*. DNA 4, 241-248.
- Fath, M.J. and Koltter, R. (1993) ABC transporters: Bacterial exporters. Microbiol. Rev. 57, 995-1017.
- Kereszt, A., Slaska-Kiss, K., Putnok, P., Banfalvi, Z. and Kondorosi, A. (1995) The *cycHJKL* genes of *Rhizobium meliloti* involved in cytochrome *c* biogenesis are required for 'respiratory' nitrate reduction ex planta and for nitrogen fixation during symbiosis. Mol. Gen. Genet. 247, 39-47.
- Mandon, K., Kaminski, A. and Elmerich, C. (1994) Functional analysis of the *fixoQ* region of *Azorhizobium caulinodans*. J. Bacteriol. 176, 2600-2608.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Markwell, M.A.K., Haas, S.M., Bieber, Z.Z. and Tolbert, N.E. (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determinations in membrane and lipoprotein samples. Anal. Biochem. 87, 206-210.
- Martinez, E., Pardo, M.A., Palacios, R. and Cevallos, M.A. (1985) Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L. J. Gen. Microbiol. 13, 179-1786.
- Noel, K.D., Sanchez, A., Fernandez, L., Leemans, J. and Cevallos, M.A. (1984) *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. J. Bacteriol. 158, 148-155.
- O'Brian, M.R. and Maier, R.J. (1989) Molecular aspects of the energetics of nitrogen fixation in *Rhizobium-legume* symbiosis. Biochim. Biophys. Acta 974, 229-246.
- Page, M.D. and Ferguson, S.J. (1989) A bacterial *c*-type cytochrome can be translocated to the periplasm as an apo form; the biosynthesis of cytochrome *cd1* (nitrite reductase) from *Paracoccus denitrificans*. Mol. Microbiol. 3, 653-661.
- Page, M.D. and Ferguson, S.J. (1990) Apo forms of cytochrome  $c_{350}$  and cytochrome  $cd_1$  are translocated to the periplasm of *Paracoccus denitrificans* in the absence of haem incorporation caused either by mutation or inhibition of haem synthesis. Mol. Microbiol. 4, 1181-1192.
- Poole, R.K. (1983) Bacterial cytochrome oxidases. A structurally and functionally diverse group of electron transfer proteins. Biochim. Biophys. Acta 726, 205-243.
- Pettigrew, G.W. and Moore, G.R. (1987) Cytochromes *c*. Springer Verlag, Berlin, pp. 160-179.
- Preisig, O., Anthamatten, D. and Hennecke, H. (1993) Genes for a microaerobically induced oxidase complex in *Bradyrhizobium japonicum* are essential for nitrogen-fixing endosymbiosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 3309-3313.
- Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Fernández, L., Ballado, R., Soberón, G. and Palacios, R. (1982) Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. Nature (London) 224, 724-726.
- Ramseir, T.M., Harald, V.W. and Hennecke, H. (1991) Discovery and sequence analysis of bacterial genes involved in the biogenesis of *c*-type cytochromes. J. Biol. Chem. 266, 7793-7803.
- Ratet, P., Schell, J. and de Bruijn, F.J. (1988) Mini-Mulac transposons with broad-host-range origins of conjugal transfer and replication designed for gene regulation studies in Rhizobiaceae. Gene 63, 41-52.
- Ritz, D., Bott, M. and Hennecke, H. (1993) Formation of several bacterial *c*-type cytochromes requires a novel membrane-anchored protein that faces the periplasm. Mol. Microbiol. 9, 729-740.
- Ritz, D., Thöny-Meyer, L. and Hennecke, H. (1995) The *cycHJKL* gene cluster plays an essential role in the biogenesis of *c*-type cytochromes in *Bradyrhizobium japonicum*. Mol. Gen. Genet. 247, 27-38.
- Soberón, M., Williams, H.D., Poole, R.K. and Escamilla, E. (1989)

- Isolation of a *Rhizobium phaseoli* cytochrome mutant with enhanced respiration and symbiotic nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* 171, 465-472.
- Soberón, M., Aguilar, G.R. and Sanchez, F. (1993) *Rhizobium phaseoli* cytochrome *c*-deficient mutant induces empty nodules on *Phaseolus vulgaris* L. *Mol. Microbiol.* 8, 159-166.
- Thöny-Meyer, L., Ritz, D. and Hennecke, H. (1994) Cytochrome *c* biogenesis in bacteria: a possible pathway begins to emerge. *Mol. Microbiol.* 12, 1-9.
- Thöny-Meyer, L., Fisher, F., Kunzler, F., Ritz, D. and Hennecke, H. (1995) *Escherichia coli* genes required for cytochrome *c* maturation. *J. Bacteriol.* 177, 4321-4326.
- Vargas, C., McEwan, A.G. and Downie, J.A. (1993) Detection of *c*-type cytochromes using enhanced chemiluminescence. *Anal. Biochem.* 209, 323-326.
- Vargas, C., Guanhuí, W., Davies, A.E. and Downie, A. (1994) Identification of a gene encoding a thioredoxin-like product necessary for cytochrome *c* biosynthesis and symbiotic nitrogen fixation in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* 176, 4117-4123.
- Witty, J.F. and Minchin, F.R. (1990) In: Gresshoff, P.M., Roth, L.E., Stacey, G. and Newton, W.E. (Eds.), *Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives*. Chapman and Hall, New York, pp. 285-292.