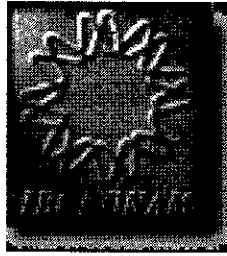
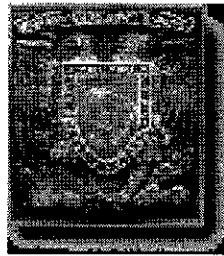


03072
3
2ef

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION
DE LOS GENES *nodT* DE *Rhizobium
etli* CEPA CE3**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE *MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA*
PRESENTA EL BIOL. Armando Hernández Mendoza.

0271273

TUTOR: MIBB María del Carmen Monserrat Quinto Hernández.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1999



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Existen, invariablemente, diversos puntos de vista acerca de como llevar a cabo una investigación. Cuál es la mejor forma de iniciar un experimento y qué tipo de cambios deben de hacerse para lograr el objetivo final, que es el responder una pregunta dada. Esto mismo he observado en la vida diaria. Cada quien da el mejor consejo que considera necesario en base a su experiencia, para que el aconsejado logre finalmente contestarse su pregunta más importante, que al menos en mi caso, es saber el porqué se está en este mundo, en esta vida y en este momento.

Finalmente al unir ambas facetas, logré comprender que nadie tiene la respuesta a las preguntas que estas tratando de responder. Todos dan su mejor opinión para que cada quien alcance la suya propia. En el laboratorio, el experimento sólo va a dar un resultado en base a las condiciones que cada quien establezca, y este llevará a diseñar otro experimento que nuevamente, dependiendo de los requisitos que delimiten, dará otra respuesta, que seguirán guiandonos hasta contestar un conjunto de preguntas que se fueron estableciendo en base a los resultados.

La vida es exactamente igual. Sólo en base a la evaluación de los problemas, se toma una decisión que darán ciertos resultados ante los cuales se tendrán que establecer otras opciones, para continuar revelando el misterio de la vida. Y cualquier consejo que se aplique permitirá un crecimiento dado, en base a la experiencia y con las condiciones que cada persona estableció.

Pero lo más importante, es que al saber que hay gente que desea dar un consejo, se entiende que no se está sólo en la formación profesional o personal. Que siempre existen puntos de vistas que permiten reevaluar los actos llevados a cabo y aprender tanto de los errores como de los aciertos. Y que siempre se puede encontrar a alguien que va a desear ayudarnos a mejorar.

Es por eso que en esta tesis deseo dar las gracias en primer lugar a Dios, en cualquiera de sus manifestaciones o formas, ya que siempre ha estado cerca para oírme y me ha ayudado a encontrar mis propias respuestas.

A mis padres, Genaro y Rosa Elena, que junto con mis hermanos, han compartido conmigo distintos estados de ánimo, pero antes quienes tengo que reconocer que cualquier logro que he tenido en la vida ha sido gracias a su apoyo en todos los aspectos.

A Erika, por haber usado todo el amor que tenía para cuidar a nuestras hijas y reemplazar en gran parte mi ausencia, logrando ubicar en ellas los valores que siempre hubiera querido sembrarles.

A Erianita y a Rosita, quienes más que nada han sido ambas un descanso cuando me permiten compartir con ellas sus juegos, sus risas, sus lágrimas, sus besos, sus abrazos, sus gritos, su todo.

A Carmen y Federico, quienes con su decidido apoyo y consejos, me han ayudado terminar una nueva etapa en mi carrera, y que han tenido la confianza para permitirme seguir avanzando en el aprendizaje de la ciencia.

A Olivia y Noreide, quienes contribuyeron ampliamente en el desarrollo de este proyecto. A mis actuales compañeros de laboratorio: Luis, Jimena, Minerva, Gregory, Selene, Daniel, Alma Lilian, Gabriel, Edgar, Nayeli, Lidia, Rosaura, Geo, Nati, Juanito, Luis Carlos, Rodolfo, y a quienes han decidido continuar en otros proyectos: Nieves, Elisa, Mike, Raúl, Nelson, Pastor y Rafael. En especial a Héctor. Sin saberlo, me ayudó demasiado sin darme tiempo a agradecerlo en esta vida. Aunque estoy seguro que nos volveremos a encontrar.

A mis cotutores: Victor Valdés y Alejandro Alagón, quienes con sus evaluaciones y recomendaciones, me ayudaron a terminar esta etapa de mi formación.

A mis amigos de Universidad, la Sociedad de los Biólogos Muertos: El patriarca Sabino, Dectorchenko, Roberto Gamez El Pastrana, Toño, Joel y Castañeda. Cada uno ha tomado rumbos diferentes, pero siempre sabemos donde estamos y que hacemos.

Y a los amigos que aquí han sabido darme su apoyo y consejo oportuno. Nunca les hice caso, pero siempre han sabido estar cerca de mí: Alma, Laura, Jimena, Adriana Josué, y Marco Villanueva.

Y finalmente, a Caro; y solo tú sabes el porqué.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
INICIO Y MORFOLOGIA DEL NODULO.....	4
PROCESO DE INFECCION.....	8
INTERCAMBIO DE SEÑALES.....	11
REGULACION DE LOS GENES <i>nod</i>	12
FACTORES DE NODULACION.....	14
EL ESQUELETO DE OLIGOMEROS DE QUITINA.....	15
SINTESIS DE PRECURSORES.....	15
SINTESIS DEL ESQUELETO QUITOOLIGOSACARIDO.....	16
DECORACIONES ESPECIFICAS.....	18
<i>N</i> -metilación.....	18
Sustituyentes ácido graso.....	18
<i>O</i> -SUSTITUCIONES EN EL EXTREMO NO REDUCTOR.....	19
<i>O</i> -acetilación.....	19
<i>O</i> -carbamilación.....	19
<i>O</i> -SUSTITUCIONES EN EL EXTREMO REDUCTOR.....	20
6- <i>O</i> -sulfatación.....	20
<i>O</i> -acetilación.....	21
<i>O</i> -glucosilación.....	21
Sustituciones 1- <i>O</i> -glicerol.....	22
TRANSPORTE DE FACTORES DE NODULACION.....	25
SISTEMA DE TRANSPORTADORES ABC.....	25
IMPORTADORES BACTERIANOS ABC.....	26
EXPORTADORES BACTERIANOS ABC.....	26
FAMILIAS DE TRANSPORTADORES REPORTADAS EN BACTERIAS.....	28
SECRECION DE LOS FACTORES DE NODULACION.....	29
ANTECEDENTES	30
MATERIALES Y METODOS	39
EXTRACCION DE DNA DE PLASMIDO POR MEDIO DE LISIS ALCALINA.....	39
PURIFICACION DE DNA TOTAL DE <i>Rhizobium</i> sp.....	41
IDENTIFICACION DE DNA DE PLASMIDO DE <i>Rhizobium</i> EN GEL DE AGAROSA (Método de Eckhardt, 1978).....	41
PREPARACION DE CELULAS ELECTROCOMPETENTES.....	42
ELECTROPORACION Y PLAQUEO.....	43
CONJUGACION.....	43
ESTRATEGIAS PARA CLONACION EN PLASMIDOS VECTORES.....	44
LIGACION DE FRAGMENTOS CON EXTREMOS COHESIVOS.....	45
LIGACION DE FRAGMENTOS CON EXTREMOS ROMOS.....	45
BUSQUEDA EN COLONIA EN UN BANCO GENOMICO DE FRAGMENTOS DE DNA DE INTERES	45
HIBRIDACION SOUTHERN.....	46
SEPARACION DE LOS FRAGMENTOS DE DNA GENOMICO O DE PLASMIDO.....	46
TRANSFERENCIA DEL DNA DEL GEL DE AGAROSA A UN SOPORTE SOLIDO (MEMBRANA DE NYLON) TRANSFERENCIA CAPILAR.....	47
MARCAJE RADIOACTIVO DE LA SONDA DE DNA UTILIZANDO EL SISTEMA DE MARCAJE DE DNA CON CEBADORES MULTIPLES.....	47

HIBRIDACION DE SONDAS MARCADAS RADIOACTIVAMENTE	
A ACIDOS NUCLEICOS INMOVILIZADOS.....	48
SECUENCIACION DE DNA DE PLASMIDO POR EL METODO DE	
TERMINACION DE CADENA.....	48
PROTOCOLO PARA EXTRACCION DE METABOLITOS	
NOD DEL MEDIO DE CULTIVO.....	51
EXTRACCION DE PROTEINAS DE <i>Rhizobium etli</i> cepa CE3.....	51
ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GEL DE POLIACRILAMIDA	
DESNATURALIZANTE (SDS-PAGE) Y NATIVO.....	52
ELECTROTRANSFERENCIA	53
INMUNODETECCION.....	53
TINCION CON AZUL DE COOMASSIE.....	54
ELECTROFORESIS DE DOS DIMENSIONES.....	54
MEDIOS DE CULTIVO.....	55
RESULTADOS	56
1.- IDENTIFICACION Y AISLAMIENTO DE LOS GENES <i>nodT</i>	
EN <i>R. etli</i> CEPA CE3.....	56
2.- LOCALIZACION DE LOS GENES <i>nodT</i> EN <i>R. etli</i> CEPA CE3.....	56
3.- ANALISIS POR MEDIO DE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA	
DE LA SECRECION DE LOS FACTORES DE NODULACION AL	
MEDIO DE CULTIVO, DE LAS CEPAS CURADAS	
DE LOS DIFERENTES PLASMIDOS DE <i>R.etli</i> CE3.....	58
4.- COMPLEMENTACION DE LA CEPA CFNX184 CON EL GEN	
<i>nodT</i> DEL PLASMIDO <i>c</i> O CON EL DE CROMOSOMA.....	60
5.- MUTAGENESIS DEL GEN <i>nodT</i> DE CROMOSOMA.....	62
6.- EXPRESION DE LA PROTEINA NodT EN <i>Rhizobium etli</i> CE3,	
CEPA CFNX184 Y CFNX184 COMPLEMENTADA CON <i>nodT</i>	
DEL PLASMIDO <i>c</i>	66
7.- SECUENCIACION DE LOS GENES <i>nodT</i> DE <i>R. etli</i> CEPA CE3.....	68
8.- ANALISIS DE LAS LECTURAS DE SECUENCIA OBTENIDAS	
DE LOS FRAGMENTOS SUBCLONADOS.....	75
DISCUSION	87
CONCLUSIONES	93
BIBLIOGRAFIA	94

RESUMEN

La relación simbiótica entre leguminosas y bacterias de rhizobia para efectuar la fijación biológica del nitrógeno, inicia cuando la planta secreta flavonoides que activan la transcripción de los genes *nod* encargados de la formación y excreción de lipoquitooligosacáridos o factores Nod, los cuales inducen diversos cambios en la planta que finalmente llevan a la formación del nódulo radicular donde se establece el microsimbionte.

El gen *nodT* ha sido descrito en las tres biovariedades de *R. leguminosarum*: bvs. *viciae*, *trifolii* y *phaseoli*; en dos de ellas formando operones con genes de nodulación. Mutaciones de este gen en *R. leguminosarum* bvs. *viciae* y *trifolii* no afectan significativamente la nodulación. Hay evidencias que sugieren que la proteína Nod T está asociada a la membrana bacteriana externa y muestra una limitada, pero clara similitud con dominios específicos encontrados en una familia de proteínas de membrana externa que incluyen a Tol C, Hly D y Cya E que forman parte de un sistema de secreción tipo ABC, de proteínas en bacterias Gram negativas.

Hemos propuesto, junto con otros grupos (Paulsen *et al*, 1997a y b) que el producto génico de *nodT* podría formar parte de un complejo de excreción de los factores Nod junto con las proteínas que se ha reportado que participan en este proceso (Nod I y Nod J).

En este trabajo presentamos la identificación de dos copias del gen *nodT* en *Rhizobium etli* CE3, su aislamiento, secuenciación, y localización genómica. Una de estas copias está localizada en el plásmido c y la otra proponemos que está en cromosoma. Se reporta el análisis de las características particulares a nivel de secuencia, y los experimentos realizados para caracterizarlas funcionalmente.

La copia del plásmido c se localiza físicamente cerca de regiones que presentan identidad con dos genes que, en *Escherichia coli*, participan en un sistema de transducción de señales de dos componentes involucrado en respuesta a estrés calórico. El otro gen *nodT* presenta, corriente arriba, regiones que tienen homología con genes que en *Pseudomonas aeruginosa* forman un operón que participa en la secreción de múltiples drogas. Ninguna de las dos copias presenta regiones con similitud a cajas de nodulación en su región promotora. La expresión de la copia que proponemos ubicada en cromosoma es independiente del inductor de genes de nodulación, naringenina, en las condiciones en que fue analizada.

Encontramos que una cepa curada del plásmido c secreta menos de la mitad de los factores de nodulación, sin embargo este efecto no depende de la presencia del gen *nodT* que se encuentra en este plásmido.

Estos datos en su conjunto, nos permiten proponer que en *R. etli* CE3, los genes *nodT*, inicialmente identificados como genes de nodulación en otras especies, podrían estar participando en funciones distintas que no están relacionadas directamente con el proceso de nodulación, y que sus productos puedan tener otro papel en el metabolismo bacteriano.

INTRODUCCION

Aproximadamente 170 millones de toneladas de nitrógeno atmosférico son convertidas a amoniaco cada año y de éstas, 120 millones de toneladas son convertidas por bacterias que fijan nitrógeno en vida libre, en forma asociada o en forma estrictamente simbiótica. El estudio de la fijación biológica del nitrógeno ha sido la base para establecer programas de inoculación de leguminosas para aumentar la productividad agrícola y este proceso ha atraído a químicos, bioquímicos y biólogos moleculares.

La reducción biológica del nitrógeno a amoniaco puede ser llevada a cabo por algunos procariontes y es un proceso muy sensible al oxígeno. Los microorganismos que fijan nitrógeno en forma más eficiente, establecen una simbiosis con plantas superiores, que son las que proveen la energía para la fijación de nitrógeno y que ayuda a aislar a las bacterias del oxígeno. Las bacterias que normalmente se encuentran en el suelo llevan a cabo el proceso simbiótico en órganos que se desarrollan especialmente para este proceso, como es el caso de la simbiosis entre rhizobia y plantas leguminosas (de Bruijn y Downie, 1991; Hirsch, 1992) o de la bacteria *Frankia sp.* con actinorhizas (Hirsch y La Rue, 1997) donde sólo estos ejemplos contribuyen a fijar aproximadamente 96 millones de toneladas de N₂, mientras que la cianobacteria *Nostoc* establece una relación simbiótica con la angiosperma *Gunnera*, donde las algas azules se encuentran en las células de la base de la hoja sin formación de nuevos órganos (Brewin, 1991). En los tres casos, los microorganismos fijan nitrógeno y permanecen dentro de las plantas, pero están separados del citoplasma por membranas derivadas del plasmalema.

La relación simbiótica que se establece entre las bacterias del género rhizobia y las raíces de las plantas leguminosas inicia cuando los dos participantes simbióticos se encuentran uno al otro, iniciándose un intercambio de señales químicas que se difunden en la rizósfera (Fisher y Long, 1992; Hirsh, 1992). Las raíces de la planta secretan flavonoides, que son compuestos heterocíclicos que contienen oxígeno y un anillo común 1,3-difenilpropano, los cuales sirven como quimioatrayentes y afectan la producción de polisacáridos, y el crecimiento y metabolismo celular bacteriano (Brewin, 1991). Su principal función es la de interactuar con las proteínas reguladoras nodD producidas por la bacteria, las cuales funcionan como activadores transcripcionales de los genes de nodulación (genes *nod*) que sintetizan y secretan lipoquitooligosacáridos (factores Nod).

Los genes de nodulación se han localizado en plásmidos de alto peso molecular, conocidos como plásmidos simbióticos, que en el caso de la cepa *Rhizobium* NGR234 acaba de ser completamente secuenciado (Freiberg *et al.*, 1997). Algunos genes *nod* han sido localizados en cromosoma, como en el

caso de la bacteria de crecimiento lento *Bradyrhizobium*. Estos factores, en concentraciones nanomolares, son capaces de inducir una serie de respuestas en la planta, que van desde la deformación de los pelos radiculares hasta la formación de primordios de nódulo (Cárdenas *et al*, 1995), y eventualmente conducen a la formación de un nuevo órgano, conocido como nódulo, donde el microorganismo se establece y comienza a fijar nitrógeno atmosférico para hacerlo asimilable a la planta (**fig. 1 y 2D**). El nódulo radicular es el sitio donde el gas N_2 es reducido a amoníaco por la bacteria y ésta lo transfiere a la planta, donde es incorporado dentro de los aminoácidos que son usados para sintetizar otros compuestos que contienen nitrógeno. Este último paso es complejo porque: *i*) hay una reducción del dinitrógeno (N_2) por el complejo de enzimas de la nitrogenasa, que requiere el gasto de más de 42 moles de ATP por mol de N_2 reducido; *ii*) la enzima nitrogenasa es muy sensible al oxígeno; y *iii*) existe un gran número de genes involucrados en la fijación de nitrógeno (para revisión ver de Bruijn y Downie, 1991).

Dentro del grupo bacteriano que participa en la simbiosis con leguminosas, hay cinco géneros distintos reportados: *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y *Rhizobium*. Las bacterias que pertenecen a estos géneros varían en la cantidad de hospederos a los que pueden infectar (Dénarié y Debelle, 1993). *Sinorhizobium meliloti* es capaz de nodular alfalfa (*Medicago sativa*) o *Melilotus albus*; *R. tropici* nodula frijol (*Phaseolus vulgaris*) y *Leucaena*; *Mesorhizobium loti* induce nódulos en *Lotus sp.* (Palacios *et al*, 1998); *R. fredii* en soya (*Glycine max*) y *R. leguminosarum* bv. *viciae* nodula al chícharo (*Pisum sativum*) y a la arveja (*Vicia sativa*). *R. leguminosarum* bv. *trifolii* nodula tréboles (*Trifolium sp.*), y *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* al frijol (Downie, 1994). *R. etli*, la bacteria que empleamos en este estudio, fué originalmente clasificada como *R. phaseoli* (Segovia *et al* 1993, Vázquez *et al*, 1991), y establece una asociación simbiótica con *Phaseolus vulgaris*. La bacteria de crecimiento lento *Bradyrhizobium japonicum* nodula a la soya, *Azorhizobium caulinodans* a *Sesbania sp.* (provocando nódulos en las raíces y en el tallo), y la especie de *Rhizobium*, NGR234, tiene un amplio espectro de plantas a nodular (arriba de 120 géneros de leguminosas) entre ellas a *Parasponia*, que no es leguminosa (para revisión ver Downie, 1994). *Parasponia* pertenece a la familia Ulmaceae, pero los nódulos que se forman difieren de los de las leguminosas en que estos son raíces naturales modificadas y tienen un parénquima vascular central (Dénarié *et al* 1992).

INICIO Y MORFOLOGIA DEL NODULO

Los nódulos formados en leguminosas se dividen en dos tipos: nódulos

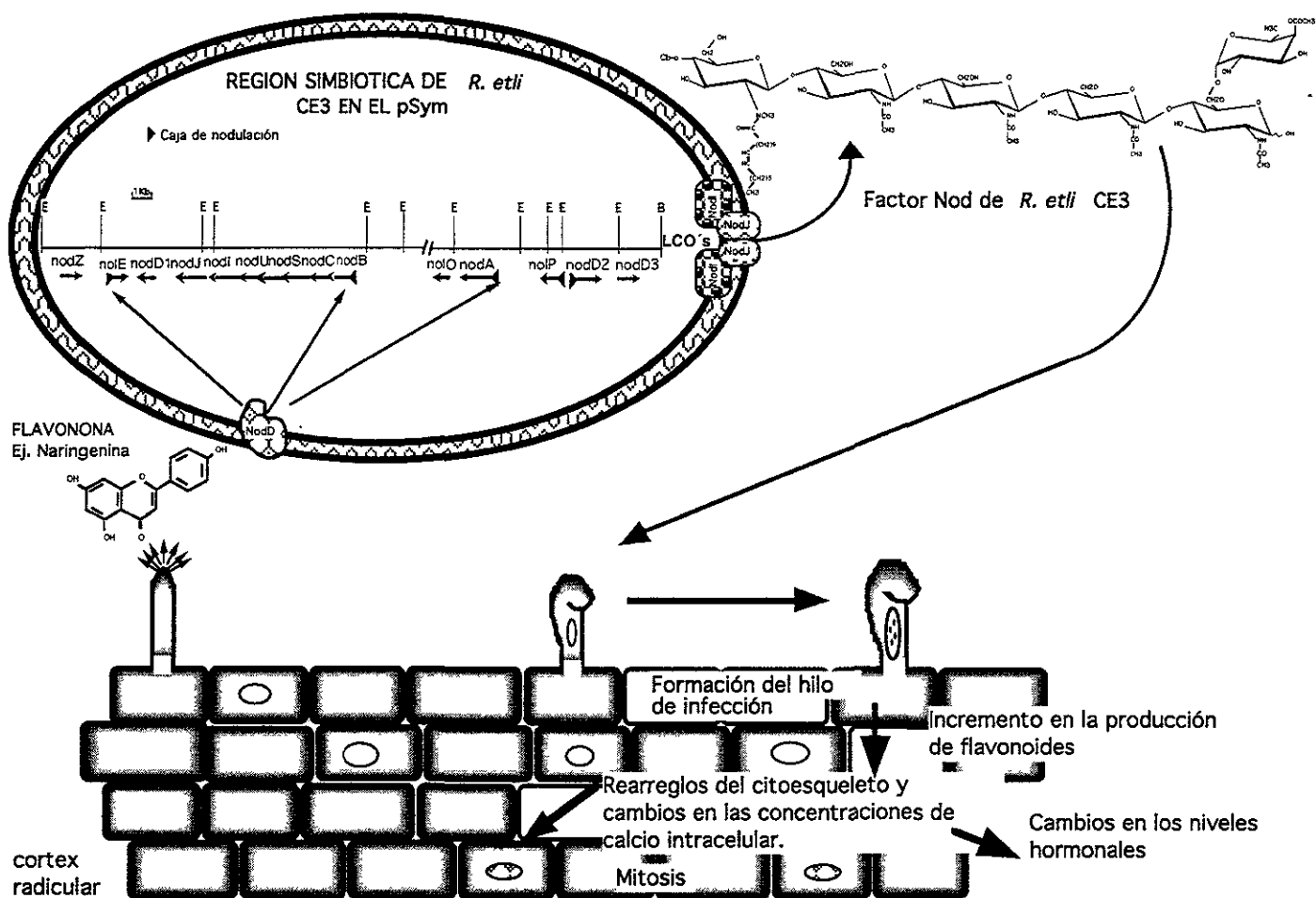


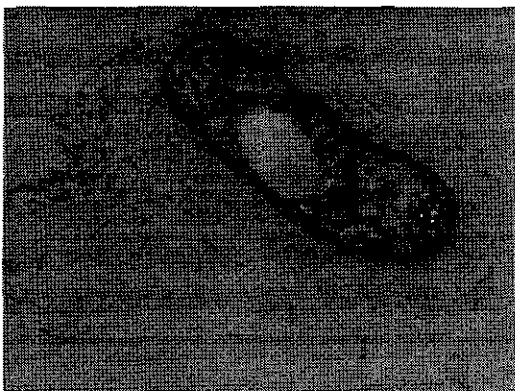
FIG. 1.- Esquema que representa algunos de los eventos que ocurren durante la interacción simbiótica que se establece entre bacterias de la familia Rhizobia y plantas leguminosas.

determinados e indeterminados y el tipo de nódulo a desarrollar depende de la planta, no de la bacteria.

Los nódulos indeterminados presentan un meristemo persistente el cual falta en los determinados. El **nódulo indeterminado** (**fig. 3A**) se inicia por medio de divisiones celulares anticlinales en el cortex interno de la raíz, las que eventualmente forman un primordio de nódulo. Estas células corticales en división están separadas por una estructura tubular que se inicia desde el pelo radicular (hilo de infección) y que al parecer es precedido por la formación de un puente citoplásmico que se genera en las células corticales externas. El meristemo da lugar a todos los tejidos del nódulo maduro, excepto el cortex y los tejidos de la zona basal. El cortex del nódulo indeterminado proviene del crecimiento y división celular de la capa cortical externa de la raíz y algunos de los tejidos basales se derivan de divisiones del periciclo y tejidos asociados a éste. Las células endodérmicas de la raíz se dividen tangencialmente y se extienden dentro del nódulo en desarrollo. Cuando el nódulo incrementa su tamaño, la mitosis gradualmente cesa en las células que están cercanas a la estela, pero continúa en el extremo apical del nódulo. Al irse alejando el meristemo de la estela de la raíz, el hilo de infección, que ha comenzado a invadir el primordio de nódulo, se ramifica y se extiende hacia el meristemo del nódulo (para revisión ver McKhann y Hirsch, 1994 y Mylona *et al*, 1995).

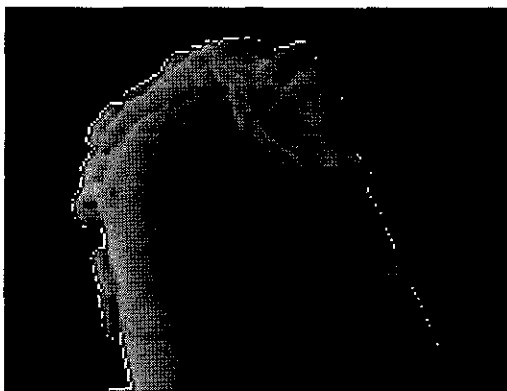
La presencia del meristemo hace que los nódulos indeterminados sean alargados y con forma de mazo, porque hay una adición de células nuevas al extremo distal del nódulo. El meristemo del nódulo da lugar a células diferenciadas dentro del tejido central, el cual consiste de células infectadas y no infectadas, además de haces vasculares periféricos rodeados por endodermis vascular y parénquima de nódulo (cortex interno). La diferenciación de estos tejidos es acropétala. Debido a esto, los nódulos indeterminados muestran un gradiente de diferenciación desde el meristemo distal del nódulo hasta los tejidos más viejos que están unidos a la raíz parental. Este gradiente se refleja en una diferenciación de zonas citológicas dentro de los nódulos maduros que fijan nitrógeno, ya que cierto número de células forman la región central del nódulo. Cerca del meristemo del nódulo se localiza la zona de invasión. No todas las células dentro de esta zona están invadidas por hilos de infección. Estas células son más grandes y ligeramente más vacuoladas que las células del meristemo nodular. Una zona de células mayores y más vacuoladas se localiza cerca de la zona de invasión. Se ha establecido una nomenclatura en base a los estados de desarrollo del bacteroide para describir la histología de los nódulos indeterminados. Se le ha designado "zona de prefijación II" a las zonas de invasión y simbióticas

A



<http://commtechlab.msu.edu/sites/dlc-me/zoo/zdrr0101.html>

B



<http://commtechlab.msu.edu/sites/dlc-me/zoo/zdrr0125.html>

C



<http://commtechlab.msu.edu/sites/dlc-me/zoo/zdrr0126.html>

D



http://www.bsi.vt.edu/facultyfiles/biol_4684/Microbes/rhizobium.html

FIG. 2.- Diversas micrografías electrónicas con un aumento de 15000X, de las etapas de vida de *Rhizobium*.

A) *R. leguminosarum* bv. *trifolii* en su estado de vida libre en el suelo, rodeado por un halo protector de exopolisacáridos, conocido como capsula.

B) Punta de un pelo radicular de trébol. Las estructuras cilíndricas son las bacterias que se han pegado a este pelo radicular.

C) Las microfibrillas de celulosa que se extienden desde *Rhizobium* hasta cubrir la superficie del pelo radicular, le permiten a las bacterias unirse por sí mismas a la célula vegetal.

D) Interior del nódulo radicular, mostrando a los bacteroides individuales.

Las fotografías fueron tomadas de las páginas de Netscape, en la dirección electrónica que se indica.

tempranas. La zona simbiótica tardía (zona III) se subdivide en zona de fijación de nitrógeno y zona ineficiente. La zona IV es la zona de senescencia. Rodeando a la zona de invasión y a todo el tejido central, hay tejidos que consisten de varios tipos celulares, incluyendo el tejido vascular, la endodermis vascular y las células del parénquima adyacente. El parénquima nodular está delimitado en su capa externa por la endodermis del nódulo, y rodea completamente los haces vasculares y la endodermis vascular. Este tipo de nódulos está presente en arveja, trébol, alfalfa y chícharo (Brewin, 1991).

Los **nódulos determinados** (**fig. 3B**) son esféricos y también tienen tejido central y periférico. El tejido periférico consiste de parénquima de nódulo y cortex del nódulo, los cuales están separados por una endodermis. Los haces vasculares están embebidos en el parénquima del nódulo.

El cortex del nódulo está hacia el exterior del endodermis y se deriva de las células corticales radicales que rodean al primordio de nódulo. Las primeras divisiones celulares ocurren en respuesta a la infección rizobial, siendo anticlinales e hipodérmicas y más tarde, cuando ocurre la división celular en el periciclo y el cortex interno, varias células son removidas de las divisiones iniciales. Posteriormente, las dos zonas meristemáticamente activas se unen y dan lugar a un nódulo incipiente. Las que se derivan de las células hipodérmicas forman el tejido central del nódulo, el cual está compuesto en su mayoría de células enriquecidas citoplásmicamente. Las derivadas del cortex interno y del periciclo tienen una gran vacuola, y se desarrollan dentro del parénquima que rodea al tejido central del nódulo. Los hilos vasculares se diferencian a partir de células pequeñas, citoplásmicamente densas, en el parénquima nodular. La mayor parte de la actividad de división celular de la región central del nódulo, cesa de los 12 a los 18 días de la inoculación. Algunas células del tejido central comienzan a ser invadidas por hilos de infección. Esas células son grandes y densas, debido a la presencia de bacterias liberadas que se diferencian a bacteroides. Esparcidas entre las células infectadas hay células pequeñas, con una gran vacuola, que no están infectadas. La forma que adquieren estos nódulos se debe a un aumento celular y no a divisiones celulares. El frijol y la soya presentan nódulos determinados (Brewin,1991; Hirsch,1992).

PROCESO DE INFECCION

Cuando la bacteria se une a la pared celular del pelo radicular (**fig 2A, B y C**), este último comienza a presentar un encurvamiento que alcanza un ángulo de 360° y la bacteria queda englobada en esa zona. Comienza entonces una hidrólisis de la pared celular vegetal en la zona de encurvamiento; la membrana plasmática se invagina y comienza a depositarse nuevo material

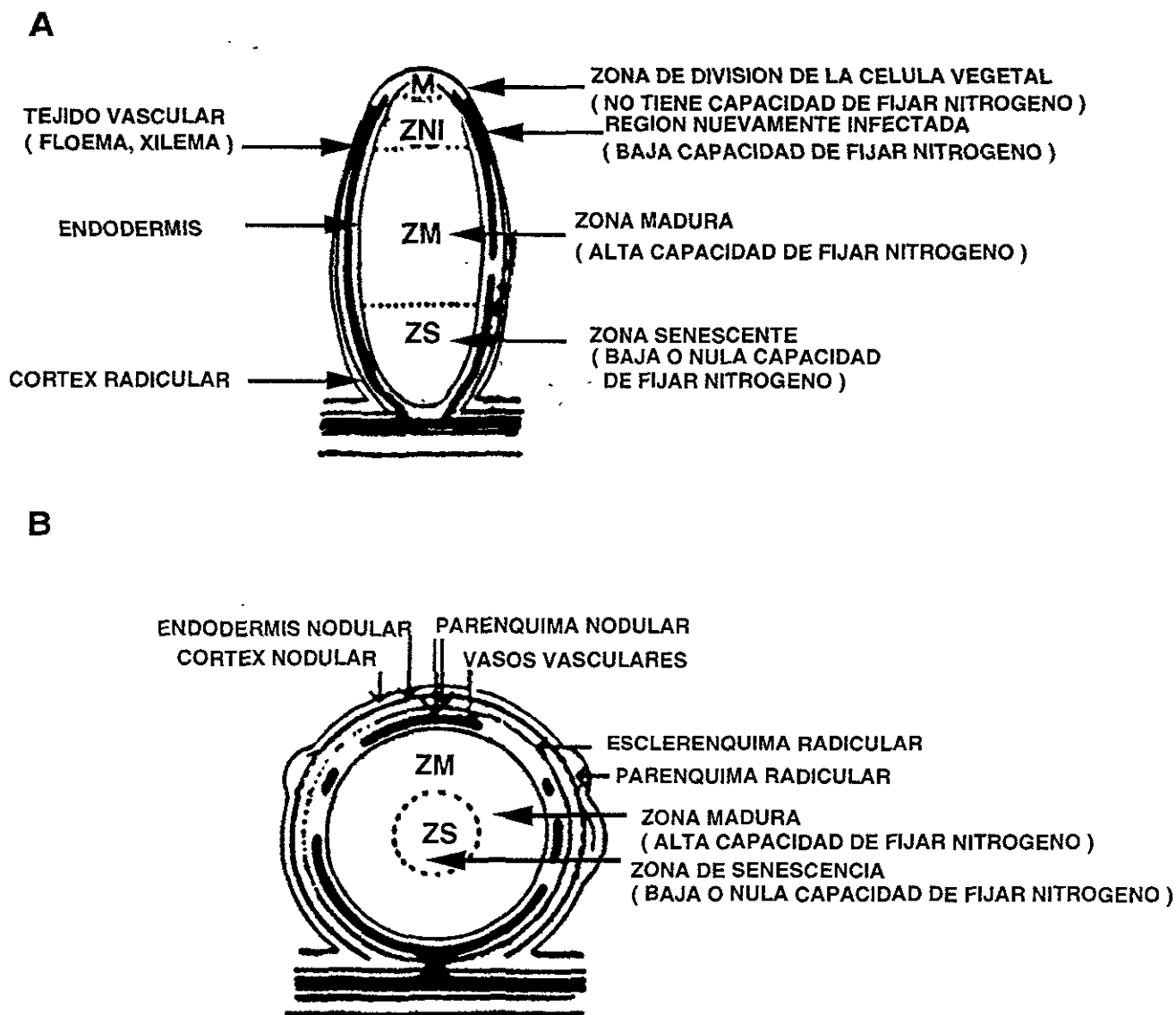


Fig. 3.- Esquema que señala las diferencias que se presentan entre los nódulos indeterminados (A) y los determinados (B) en las raíces de las plantas leguminosas M).-meristemo;ZS) zona senescente; ZM).- zona madura y ZNI) zona nuevamente infectada.

de la pared celular vegetal. Así se forma una nueva estructura tubular que se conoce como **hilo de infección** y que contiene bacterias dividiéndose y en crecimiento, las cuales atraviesan varias capas de células y llegan a las células vegetales del nódulo en desarrollo donde van a ser liberadas. Las bacterias que están dentro de este hilo de infección se encuentran rodeadas por una matriz, que al parecer está formada por materiales que provienen tanto de la planta como de la bacteria (McKhann y Hirsch, 1994).

Los genes de *Rhizobium* que parecen ser esenciales para la formación del hilo de infección son *ndv*, *lps* y *exo* los cuales están involucrados en la síntesis de β -1,2 glucano, lipopolisacáridos y exopolisacáridos ácidos respectivamente (Carlson *et al* 1994, Cheng y Walker, 1998; Petrovics, 1993), aunque se ha propuesto que los factores de nodulación son también requeridos para la formación de esta estructura, pues si se inoculan raíces de *V. unguiculata* con mutantes *nodABC* de *Rhizobium* NGR234, estas mutantes penetran a la raíz a través del hilo de infección (Relic *et al* 1994).

La membrana celular de *Rhizobium* y los componentes de la superficie celular producidos por los genes arriba mencionados están involucrados de alguna manera en la entrada de los rhizobia a las células vegetales. Hay diferencias significativas en la forma en que una planta hospedera en particular responde a la infección con mutantes *exo* o *lps* (Brewin, 1991) y la importancia de esta interacción con respecto a las señales producidas por la bacteria continúa estudiándose. También la planta contribuye en este reconocimiento con sus propios genes. Por ejemplo, el gen *psl* que codifica para una lectina, una proteína no enzimática que se une a azúcares, es capaz de permitir una interacción específica entre *Rhizobium leguminosarum* bv.*viciae*, y plantas de trébol blanco transformadas con este gen, algo que normalmente no ocurre en la naturaleza (Díaz *et al*, 1995)

Se ha demostrado que el hilo de infección es una continuación de la pared celular vegetal. Una mancha transparente usualmente es el primer signo de la penetración del hilo de infección. En respuesta a la unión de rhizobia al pelo radicular, ocurre un marcado flujo citoplásmico. El núcleo migra hacia la mancha refráctil. Después de la disolución de la pared celular, la membrana plasmática del pelo radicular se invagina y el material de la pared celular se deposita alrededor de la invaginación permitiendo que las bacterias entren. La invaginación junto con la pared celular que se ha regenerado forman el hilo de infección. El núcleo celular del hospedero, unido por microtúbulos a la punta del hilo de infección, precede a éste conforme atraviesa a la célula del pelo radicular. La bacteria viaja atravesando las células del hospedero utilizando el hilo de infección y sus ramificaciones (para revisión ver Hirsch, 1992).

En la región meristemática no se desarrollan hilos de infección, aunque las células que se están dividiendo secretan una cierta cantidad de glicoproteínas de la matriz. Probablemente debido a la estructura compacta de esas células, a su pequeño tamaño y a la ausencia de un plano regular de división, sean resistentes al desarrollo de hilos de infección. Inmediatamente próximo al meristemo del nódulo, se observa que el hilo de infección se esparce de célula a célula a lo largo del eje longitudinal del nódulo.

Muchos pelos radiculares se deforman, sin embargo, muy pocos de ellos forman verdaderos "cayados de pastor". Los eventos de formación del hilo de infección y penetración son muy raros, lo que hace suponer que podría haber una respuesta de la planta parecida a la respuesta hipersensible, la cual se ha observado en las interacciones planta-patógeno (para revisión ver Hirsch, 1992; Lawson *et al*, 1994, para revisión ver McKhann y Hirsch, 1994). Después de que el primer primordio de nódulo se ha formado, aumenta la proporción de hilos de infección abortados en alguna o en pocas células corticales de la raíz, donde se observa que tanto la bacteria como la célula vegetal se necrotizan. En esas células se observa la acumulación de compuestos fenólicos y proteínas asociadas con mecanismos de defensas de la planta, lo cual sugiere que la activación de una respuesta hipersensible es parte de los mecanismos por los cuales la planta controla la infección y regula la nodulación (Vasse *et al*, 1993)

El siguiente estado de la invasión es la liberación de la bacteria en el citoplasma vegetal, cuando comienza a formarse un tubo de infección, muy parecido al hilo de infección, aunque al final se agranda como una bolsa vesicular que permanece unida a la membrana plasmática, porque no está rodeada por una pared celular especializada. Esta pequeña vesícula de infección tiene un diámetro de 10-25 μm y contiene de 10 a 100 bacterias (para revisión ver Brewin, 1991 y McKhann y Hirsch, 1994). Una vez liberada del hilo de infección, la bacteria se establece en las células del nódulo, se diferencia a bacteroide, y comienza a fijar nitrógeno atmosférico

INTERCAMBIO DE SEÑALES

La comunicación entre rhizobia y las leguminosas al parecer involucra múltiples intercambios de señales que tienen una regulación muy complicada. Una planta dada produce una mezcla de diferentes flavonoides y la interacción de las diferentes proteínas reguladoras de los genes *nod* con los flavonoides agonistas o antagonistas parecen determinar la fuerza y la calidad de la inducción de los genes *nod*. Así como los flavonoides inducen a los genes *nod*, las señales que produce rhizobia consisten de una compleja mezcla de factores Nod (FN's) que van a causar cambios a nivel molecular y metabólico

en la planta. El reconocimiento de una cepa de *Rhizobium* por una planta hospedera parece estar influenciado por un balance finamente regulado por parte de la concentración de señales Nod activas y antagonistas (para una revisión ver Spaink, 1996 y Schultze y Kondorosi, 1996). También podrían participar señales alternas a la de los FN's, como es el caso del ácido *N*-acetilglutámico (a concentraciones micromolares) y los diglicosildiacyl glicéridos (a concentraciones nanomolares), que una vez purificados de *R. leguminosarum* *bv. trifolii* son capaces de inducir divisiones celulares en el cortex del trébol blanco (Dazzo *et al* 1996). Todos estos datos reflejan una adaptación evolutiva entre ambos participantes.

REGULACION DE LOS GENES *nod*

La mayoría de los genes *nod* se mantienen transcripcionalmente apagados cuando las bacterias crecen en cultivo. Su expresión se controla por el activador transcripcional NodD, que actúa junto con los inductores de la planta y también con otros reguladores bacterianos como NodR.

Una vez que NodD sensa a los flavonoides, interactúa con las secuencias consensos que se encuentran en la región promotora conocida como "cajas *nod*", y se produce el doblamiento del DNA (Fisher and Long, 1993), facilitando que la polimerasa inicie la transcripción. Estas cajas de nodulación son secuencias regulatorias en *cis*, altamente conservadas y con una longitud de 47 pb (Dénairé y Debellé, 1993)

La caracterización inicial de los genes de nodulación, demostró que los productos de los genes *nodD* procedentes de diversas especies bacterianas parecen activar a los genes *nod* diferencialmente, en respuesta a mezclas específicas de inductores derivados de las raíces de cada planta hospedera. Entre los inductores se incluyen: luteolina, methoxichalcona, naringenina y la daidzeína, y también existen inductores de naturaleza diferente a la de los flavonoides como la trigonellina y la estaquidrina. El espectro de los flavonoides secretados puede cambiar con las condiciones ambientales, lo que puede tener consecuencias ecológicas y en el desarrollo de una bacteria rhizobiana de vida libre, al no poder interactuar con su hospedero (para revisión ver Dénairé *et al*, 1992). Además, existen compuestos que en lugar de inducir, reprimen la expresión de los genes *nod*, lo que puede disminuir el número de nódulos producidos en las plantas. Esto se observó cuando las bacterias fueron inoculadas en presencia de riboflavina, un componente del espacio peribacteroidal (Mellor, 1994). Otro tipo de compuestos que actúan como inductores son las chalconas, que son producidas en alfalfa, y pertenecen a la familia de los fenilpropanoides (Dixon *et al*, 1996)

Las diversas respuestas a nivel de la inducción de los genes *nod* están

mediadas en parte por la acción de los miembros de la familia multigénica *nodD*. Sin embargo, estudios recientes indican que en el circuito de regulación de los genes *nod* también se involucran genes reguladores adicionales y que estos se expresan diferencialmente dependiendo de las etapas de la simbiosis, lo que puede provocar efectos diferenciales en la síntesis de los FN's que probablemente dependen de la planta hospedera o del subconjunto de genes *nod* que son inducidos.

Se ha observado que NodD3 de *Rhizobium meliloti* controla la producción de grupos acilos variados (grupos *N* -acilados de 18 a 26 carbonos, con modificaciones ω -1-OH) que estaban presentes en las preparaciones de FN's. Además, en *R. meliloti* cepa 41, se ha observado que el represor NolR tiene diferentes efectos sobre la expresión del operón de genes *nod* comunes y sobre otros operones con "cajas *nod*". Se sabe que NolR reprime la expresión del gen activador *nodD1*, y del operón común *nodABC*, al unirse a una región sobrelapada de los dos promotores junto al la caja *nod* n1. Además se ha demostrado que NolR también controla la expresión de dos genes adicionales, *nodD2* y *nodM*, pero no regula directamente la expresión de los genes de nodulación hospedero-específico localizados corriente abajo de las cajas *nod* n2, n3 y n5. Los genes *nod* son diferencialmente regulados por NolR, y sólo aquellos que van a tener funciones de nodulación comunes, como es la de determinar la estructura principal de los FN's, están sujetos a esta regulación negativa. Esto sugiere que la síntesis del conjunto de FN's y los grupos que modifican a la molécula, pueden ser regulados diferencialmente (Cren *et al*, 1995)

En esta especie bacteriana se observó que los factores externos, como la presencia de amoníaco asimilable para la planta, afectan la expresión de los genes de nodulación por medio de un sistema detector de dos componentes. Los niveles de nitrógeno fluctuantes son detectados por el sistema regulador general de nitrógeno (*ntr*), que transmite la señal a los genes *syrM-nodD3*, que son los que determinan directamente el nivel de regulación de los genes *nod* dependiendo del amonio detectado. NtrR detecta altos niveles de amoníaco y actúa en conjunto con el activador transcripcional SyrM que permite la expresión del activador transcripcional *nodD3*. NtrC detecta bajos niveles de amoníaco y regula la activación de los genes *nod* en *R. meliloti* permitiendo también la expresión de NodD3 (Dusha y Kondorosi, 1993).

En el caso de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, se localizaron tres copias de este gen regulador y cada una de esas copias era capaz de complementar la capacidad de nodulación en una mutante *nodD* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* para la nodulación de chícharos lo que indica que las tres copias son funcionales. Mutaciones en cada una de esas copias no

interrumpen la nodulación de frijol, aunque las propiedades regulatorias de los tres genes *nodD* son diferentes (Davis y Johnston, 1990b) lo que habla de lo complejo que puede ser este circuito de regulación (Davis y Johnston, 1990a).

En *B. japonicum* se ha observado que operan reguladores adicionales, como es el caso del gen *nodW*, que parece ser un regulador de dos componentes. Su expresión es necesaria para una colonización exitosa de algunas plantas hospedero (*Vigna radiata*, *V. unguiculata* y *Macroptilium japonicum*), y en su ausencia, los genes *nod* de *B. japonicum* no se expresan completamente (Grob *et al*, 1993).

El grupo de genes simbióticos de *B. japonicum* incluye al regulador negativo *nolA*, cuyo producto ejerce su efecto represor en forma indirecta (García *et al*, 1996), y un gen que participa en la síntesis de la molécula señal, *nodZ*, que no es controlado por NodD (Stacey *et al*, 1994). Así, existe evidencia de que al menos en dos parejas simbióticas la regulación de los genes *nod* puede ser ajustada en respuesta a las señales específicas.

Por último, se tiene que tomar en cuenta que hay otro tipo de regulación que no necesariamente se da por los activadores transcripcionales y por las zonas promotoras del DNA. En el caso de *R. meliloti* se ha observado que el gen *nodD3* no puede actuar si la chaperona GroELc no se encuentra presente. Esto indica que otro tipo de proteínas que se encargan de favorecer el plegamiento de algunas proteínas podrían estar involucradas en la efectividad de la simbiosis (Ogawa y Long, 1995).

FACTORES DE NODULACION

Las asociaciones planta-rhizobia son específicas, porque una bacteria puede nodular un número definido de plantas; sin embargo, el grado de especificidad varía. Como se mencionó arriba, *R. meliloti* y *R. leguminosarum* *bv. trifolii* tienen un reducido margen de hospederos a nodular, pero *Rhizobium* spp. NGR234 nodula alrededor de 120 leguminosas y a *Parasponia*, que no es leguminosa.

Los sobrenadantes estériles de cultivos de rhizobia causan cambios en la morfología de los pelos radiculares y de la raíz de hospederos que pueden ser nodulados y esta actividad es dependiente de los genes *nodABC*. Se purificaron los FN's extracelulares (Nod porque son producidos por los genes *nod*)(Roche *et al*, 1991b) de una cepa de *Rhizobium meliloti* genéticamente modificada para sobreexpresar los genes *nod*. Los FN's presentaron una naturaleza anfifílica y fueron extraídos de cultivos filtrados, usando una extracción líquida/líquida= agua/butanol y purificados por cromatografía de intercambio iónico y cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa.

Los FN's purificados se analizaron por espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear y análisis químicos, para identificarlos como lipooligosacáridos. Estos factores son capaces de inducir la deformación de los pelos radiculares.

Los FN's han sido purificados de varias especies de rhizobia utilizando métodos similares. A partir de cultivos bacterianos que fueron filtrados para eliminar a las células, se extrajeron los FN's, tanto con butanol o con procedimientos líquido/sólido usando columnas de C18 en fase reversa o polímeros cruzados de estireno divinilbenzeno. También se han realizado métodos analíticos que incluyen cromatografía en capa fina, mono o multidimensional, con fase reversa o directa, después de haber marcado radioactivamente a los FN's y crecer a rhizobia en presencia de precursores radioactivos como acetato con ^{14}C , glucosamina con ^{14}C o sulfato con S_{35} (Lerouge, 1990). Los FN's de todas las especies rhizobiales pertenecen a la misma familia química: son lipooligosacáridos mono-*N*-acilados, en su mayoría pentámeros y tetrámeros. El esqueleto de los oligómeros de quitina presenta diversas sustituciones en los dos extremos terminales de glucosamina . Los FN's de *R. meliloti* consisten de un esqueleto de oligómeros de quitina que contiene de 4 a 5 residuos de glucosamina unidos por enlaces tipo $\beta,1-4$. El esqueleto de oligómeros de quitina está mono *N*-acilado en el extremo terminal no reductor por ácidos grasos insaturados de 16 carbonos, que poseen de uno a dos dobles enlaces conjugados con el grupo amido, *N*-acilados en otros residuos, *O*-acetilados en el extremo no reductor y *O*-sulfatados en el extremo reductor (para una revisión ver Spaink, 1994 y 1996).

Los FN's purificados son moléculas señales muy activas y son capaces de provocar a concentraciones pico y nanomolares, muchas de las respuestas simbióticas de la planta inducidas por la bacteria misma, como es la deformación y el encurvamiento de los pelos radiculares, cambios en los niveles del calcio intracelular, rearrreglos del citoesqueleto y formación de primordios de nódulos (Cárdenas *et al*, 1995; Relić *et al*, 1994).

EL ESQUELETO DE OLIGOMEROS DE QUITINA

SINTESIS DE PRECURSORES:

La (GlcNAc) es un constituyente importante del lipopolisacárido localizado en la membrana externa y del peptodiglicano, los cuales son componentes importantes de la cubierta bacteriana. El uridil difosfato (UDP)-GlcNAc es un precursor común para la biosíntesis de esos dos componentes y también puede ser usado como un donador activo de azúcar para la síntesis

del esqueleto de los FN's en las diferentes especies de rhizobia (Price *et al*, 1994).

El gen *nodM*, identificado en *R. meliloti* (Baev *et al*, 1991) y en *R. leguminosarum* *bv. viciae* y *trifolii*, codifica para una glucosamina sintetasa. Las mutantes *nodM* muestran un retardamiento en la nodulación y un nivel bajo de producción de FN's. Además de *nodM*, *R. leguminosarum* *bv. viciae* posee una proteína glucosamina sintetasa (GlmS) y las proteínas NodM y GlmS tienen funciones intercambiables. Una doble mutante *nodM/glmS* es auxotrófica para la glucosamina e incapaz de inducir la nodulación, pero la presencia de cualquiera de esos dos genes en este fondo genético restaura la prototrofia y las capacidades simbióticas. Al parecer, las dos vías (*nod* y *glm*) alimentan una reserva de UDP-GlcNAc común (Marie *et al*, 1992)

SINTESIS DEL ESQUELETO QUITOOLIGOSACARIDO:

En todas las especies rhizobianas, los genes *nodABC* son requeridos para la producción de lipo-quitooligosacáridos. Por ejemplo, en una de las cepas de *R. leguminosarum* *bv. viciae* curada del plásmido simbiótico, el gen regulador *nodD* y los genes comunes *nodABC* son suficientes para producir un conjunto de moléculas de FN's con cuatro o cinco residuos de glucosamina, que no tienen sustituciones O y están *N*-acilados con ácido vaccénico (C18:1), que es el ácido graso membranal más abundante en estas especies (para revisión ver Dénarié y Debellé, 1993).

NodC presenta homologías significativas con varias β -glucosil transferasas procesadoras: quitina sintetetasas, celulosa sintetasa, *Streptococcus* hialurano sintetasa, y con la proteína de desarrollo de *Xenopus*, DG42. La comparación a nivel de secuencia por varios métodos, incluyendo el análisis de grupos hidrofóbicos, indica que esas β -glucosil transferasas constituyen una familia de proteínas que tienen una arquitectura modular con dominios transmembranales, unidos a una región globular compuesta de dos dominios, que están presuntamente involucrados en la formación del enlace β . Extractos celulares que expresan *nodC*, en presencia de UDP-GlcNAc radioactivo como donador de azúcar, incorporan GlcNAc en los quitooligosacáridos con más de cinco residuos de glucosamina. Para que alcance su actividad máxima, la reacción requiere GlcNAc libre, la cual no puede ser substituida por glucosamina, galactosamina, o *N*-acetil-D-galactosamina, como aceptor de moléculas. Experimentos de pulso y caza indican que la elongación de la cadena del oligosacárido avanza hacia el extremo no reductor, y que la reacción sigue un mecanismo simple, porque la quitobiosa libre, la quitotriosa o quitotetraosa no son sustratos para la iniciación o la elongación (para revisión ver Carlson, 1994; Dénarié *et al* 1992 y Dénarié y Debellé 1993).

La síntesis de los oligosacáridos o los polisacáridos a menudo ocurre por la transferencia de glucosil activado, a un residuo de azúcar que está unido glucosídicamente a un primero de aglicona. Sin embargo, aún no existen evidencias que demuestren la presencia de intermediarios lipídicos o proteicos, en la síntesis *in vitro* dependiente de NodC de los quitooligosacáridos. La síntesis de los oligosacáridos de quitina por NodC es el primer paso en la biosíntesis de los lipo-quitino-oligosacáridos rhizobianos. Los resultados indican que *nodC* contribuye a darle una especificidad por el huésped a *R. meliloti*.

Se ha propuesto un dominio hidrofóbico de NodC en la región carboxilo terminal que le permite a esta zona estar ubicada en el periplasma y que la región que tiene la función de beta-glucosil transferasa esta expuesta al espacio citoplásmico donde se efectúa la polimerización de las moléculas de *N*-acetil glucosamina. NodC es el primer ejemplo de una nueva clase de β (1,4) *N*-acetil-D-glucosaminil transferasas. A diferencia de las quitino sintetasas, NodC no está involucrada en la síntesis de polímeros sino de oligómeros. Extractos celulares conteniendo NodC y las fracciones membranales, especifican la incorporación de GlcNAc en los oligómeros con un tamaño máximo de cinco, y no se detectan productos insolubles parecidos a la quitina. Las especies rhizobiales producen esqueletos de FN's constituídos por un número definido de residuos de glucosamina. Por ejemplo, la mayoría de los FN's excretados por *R. meliloti* tienen cuatro residuos de glucosamina, mientras que *R. tropici* produce pentámeros. La introducción de *nodC* de *R. tropici* dentro de una mutante *nodC* de *R. meliloti* da como resultado la producción de una mayoría de pentámeros, indicando que los genes *nodC* están involucrados en el control de la longitud de los esqueletos quitooligosacáridos (Carlson, 1994, Dénarié *et al*, 1992).

Extractos celulares de *R. meliloti* sobreproduciendo a NodA, convierte a una quitotetraosa purificada, marcada radioactivamente y desacetilada en el extremo no reductor por NodB, en compuestos que comigran con los FN's y exhiben actividad biológica de FN's. Estos resultados son similares a los obtenidos con células permeabilizadas de *E. coli* expresando combinaciones de genes *nodA* y *nodB* de *R. meliloti* (Mergaert *et al*, 1995). La actividad de acilación es sensible a la longitud de la cadena del quitooligosacárido, con tetrámeros sirviendo como mejores aceptores que los dímeros y los trímeros. NodA también muestra especificidad por el grupo acilo. En *R. meliloti*, al reemplazar el gen *nodA* por el alelo *nodA* de *R. tropici*, da como resultado la producción de FN's que están acilados por el ácido vaccénico (C18:1), el acilo sustituyente de los FN's de *R. tropici*, y no por los grupos acilos de 16 carbonos poliinsaturados y (ω -1)-hidroxilados, que normalmente modifican los FN's de

R. meliloti (Debellé *et al*, 1996). Todos esos datos muestran que NodA es requerido para la *N*-acilación de los FN's y apoyan la hipótesis de que NodA es una *N*-acil transferasa, con las cuales presenta similitud (Röhrig *et al*, 1994).

Todos los factores Nod están *N*-acilados en el extremo no reductor, pero las *N*-substituciones pueden variar entre las especies y pueden estar involucradas en el control de la especificidad del hospedero. En la mayoría de las especies, el átomo N está acilado con un ácido graso común y puede llevar un grupo metilo como una segunda substitución. En unas pocas especies de *Rhizobium*, los FN's están *N*-acilados con ácidos grasos poliinsaturados específicos que son sintetizados bajo el control de los genes *nod* (Debellé F. 1996).

NodB es homóloga a una quitina desacetilasa de hongos, que requiere un sustrato de al menos cuatro residuos de GlcNAc para su actividad. Experimentos llevados a cabo *in vivo*, creciendo a las células bacterianas con varias combinaciones de los genes *nodABC*, en presencia de precursores radioactivos, indican que NodB es una deacetilasa específica. La proteína NodB de *R. meliloti* purificada, ha demostrado deacetilar el residuo de *N*-acetil glucosamina terminal no reductor del quito-oligosacárido. El monosacárido *N*-acetil glucosamina no es desacetilado por NodB, pero los quitoooligosacáridos con dos a seis *N*-acetil glucosaminas, sí. El grupo amino libre resultante en el extremo no reductor, puede entonces ser acilado, y en algunas especies, metilado (John *et al* 1993).

DECORACIONES ESPECIFICAS:

N-metilación:

La presencia de un grupo *N*-metilo ha sido reportada en la mayoría de las especies rhizobianas estudiadas hasta ahora. Este gen no es indispensable, pero hace más eficiente la nodulación. La evidencia genética de ganancia de función de una cepa de *E. coli* con los genes *nodABCS* de *Azorhizobium caulinodans*, indica que *nodS* es responsable de la *N*-metilación. La proteína NodS tiene similitud con las proteínas metiltransferasas que utilizan *S*-adenosilmetionina. Los experimentos en general indican que NodS es una metiltransferasa y sugieren que la *N*-metilación precede a la acilación de los factores de nodulación (Göttfert *et al*, 1990; Mergaert *et al*, 1995; Villalobos *et al*, 1994).

Sustituyentes ácido graso:

Los FN's de la mayoría de las especies rhizobianas, son acilados con ácidos grasos comunes. El constituyente principal es el ácido *cis*-vaccénico

($\Delta 11$ -C18:1) y los menos comunes incluyen al ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (C16:1) y el ácido esteárico (C18:0).

Los genes *nodFE* están involucrados en la síntesis de grupos acilos poliinsaturados en *R. leguminosarum* bvs. *viciae* y *trifolii* y en *R. meliloti*. NodF es homólogo a una proteína acarreadora de acilos y transporta un grupo 4'-fosfopanteteíno unido al residuo serina 45. NodE tiene homología con varias β -cetoacil sintetasas. En *R. meliloti*, los genes *nodFE* se requieren para la infección de alfalfa y especifican la síntesis de grupos acilos insaturados de 16 carbonos. La introducción de los genes *nodFE* de *R. l. bv. viciae*, en mutantes *nodFE* de *R. meliloti* da lugar a la formación de grupos acilos insaturados de 18 carbonos (para revisión ver de Bruijn y Downie, 1991; Demont *et al*, 1993).

O-SUSTITUCIONES EN EL EXTREMO NO REDUCTOR:

O-acetilación:

Un grupo *O*-acetil ha sido encontrado en la posición del carbono 6 en los FN's de *R. meliloti*, *R. l. viciae* y *R. l. trifolii*. La proteína NodL tiene similitud de secuencia con las acetil transferasas bacterianas, y las mutaciones en el gen *nodL* dan como resultado la producción de FN's que no están *O*-acetilados. NodL específicamente substituye un grupo *O*-acetilo en el C6 del azúcar no reductor (Dénarié *et al*, 1992; Dénarié y Cullimore, 1993; Dénarié y Debelle, 1993; Downie, 1994).

O-Carbamilación:

En contraste con la *O*-acetilación, la *O*-carbamilación es observada en el C-6, y también en las posiciones C-4 y posiblemente en C-3. En *Rhizobium* sp. NGR234, la mayoría de los FN's están doblemente carbamilados con una substitución demostrada en el C-6 y la otra presuntamente en el C-3 o en C-4. NodU tiene una alta similitud de secuencia con una proteína de *Nocardia* involucrada en la biosíntesis de antibióticos β -lactámicos carbamilados. La introducción del gen *nodU* de *R. sp.* NGR234 en *R. fredii* USDA257 permite que esta bacteria sea capaz de producir FN's 6-*O*-carbamilados. Una mutación en *nodU* de *R. sp.* NGR234 hace que decaiga, pero no que se detenga la carbamilación de los FN's y suprime la formación de especies bis-carbamiladas. Esos resultados sugieren que en la NGR234, *nodU* está involucrado en la 6-*O*-carbamilación, y que otros genes controlan la carbamilación en las posiciones 3 o 4. Adicionalmente, una mutante *nodU* en la cepa NGR234, ha perdido la capacidad de nodular *Leucaena*. Por otro lado, la transferencia de un gen *nodU* activo al simbionte de soya *R. fredii*

USDA257, extiende su intervalo de hospedero a *Leucaena*, indicando que la 6-*O*-carbamilación de los FN's es requerida para la especificidad en la nodulación de ciertos hospederos (para revisión ver Carlson *et al*, 1995; Jabbouri *et al*, 1995).

O-SUSTITUCIONES EN EL EXTREMO REDUCTOR:

6-*O*-sulfatación:

La sustitución en la glucosamina con un sulfato que causa un notable cambio en la carga de los FN's ha sido encontrado en *Rhizobium* sp NGR234 (Hanin M. *et al*, 1997), *R. meliloti* (Folch-Mallol *et al*, 1998), *R. tropici* (Folch-Mallol *et al*, 1996), *Rhizobium* sp. ORS1001 y en *Sinorhizobium teranga* (Lorquin *et al*, 1997)

En el primer caso, la proteína que tiene la actividad de sulfotransferasa, es NoeE la cual, si esta ausente en la cepa, ésta ya no produce factores sulfatados, aunque el lugar que sulfata es en la fucosa. En *R. meliloti*, todos los FN's están sulfatados, y se ha demostrado que los genes *nodPQ* y *nodH* están involucrados, tanto en la sulfatación de los FN's, como en la especificidad del hospedero a nodular. Las mutantes *nodH* producen factores no sulfatados y presentan un cambio en su espectro de hospedero, ya que han perdido la capacidad de nodular alfalfa, y adquieren la capacidad de nodular arveja, que normalmente no es su hospedero. Las mutantes *nodPQ* producen una mezcla de FN's sulfatados y no sulfatados y pueden infectar a la alfalfa y la arveja. Esta actividad de sulfatación es debida a la presencia de copias homólogas de *nodPQ* en el genoma de *R. meliloti*, y las mutantes alteradas en las dos copias sólo producen FN's no sulfatados. Los factores sulfatados purificados son activos en la alfalfa, mientras que los factores no sulfatados son activos en arveja (Roche *et al*, 1991a)

NodH tiene homología con las sulfotransferasas de mamíferos. En presencia de PAPS, el NodH parcialmente purificado de *R. meliloti* o de *E. coli* transfiere el grupo sulfato de los PAPS a los FN's no sulfatados o a la quitotreosa. Análisis genéticos con factores de nodulación, quito-oligosacáridos y sus derivados desacetilados, revelan que los FN's son los sustratos preferidos y que los factores tetraméricos son mejores sustratos que los triméricos o pentaméricos. Esos datos sugieren que los diferentes lipoquitooligosacáridos deben ser sintetizados previamente a su modificación hospedero específica con un grupo sulfato (Schwedock and Long, 1992)

R. tropici produce una mezcla de FN's 6-*O*-sulfatados y no sulfatados, y esta capacidad contribuye a que esta cepa tenga un amplio espectro de hospederos. La introducción de los genes *nodPQ* de *R. meliloti* dentro de *R.*

tropici da como resultado la sulfatación completa de los FN's mientras que la introducción de *nodH* no tiene ningún efecto, sugiriendo que la sulfatación parcial es debida a una síntesis limitada de sulfato activado. La introducción de los genes *nodPQ* de *R.meliloti* también resulta en la producción de una mezcla de NF's metilados y no metilados, sugiriendo una unión entre las vías de sulfatación y metilación dependiente de *S*-adenosilmetionina, con una competencia entre esas dos vías por el limitado número de sulfatos activados disponibles para la síntesis de los FN's. La actividad de estos genes es independiente de NodD (Folch-Mallol *et al*, 1996, Folch-Mallol *et al*, 1998)

O-acetilación:

Esta rara modificación sólo ha sido observada en una cepa de *R. leguminosarum* bv.*viciae*, que tiene un espectro particular de hospedero. Ciertas cepas de *R. leguminosarum* bv. *viciae* pueden nodular eficientemente algunas variedades de chícharos, tales como el cultivar Afganistán. Una cepa representativa (TOM) tiene al gen adicional *nodX*, que es requerido para la nodulación del cultivar Afganistán. La cepa TOM hace FN's similares a los producidos por otras cepas de *R. l. viciae*, pero *nodX* especifica la síntesis de FN's adicionales O-acetilados en el carbono 6 del residuo de glucosamina reductor. Los FN's pentaméricos presentan ésta acetilación extra, lo que no sucede con los factores tetraméricos. La cepa TOM, por lo tanto, posee dos O-acetiltransferasas de los FN's, NodL y NodX. Aunque tanto NodL y NodX O-acetilan el mismo carbono (C-6) de los residuos de glucosamina, existe muy poca similitud entre esas dos enzimas, las cuales pertenecen a dos familias distintas de acetil transferasas (Davis, 1988; para revisión ver Dénarié y Debelle, 1993). La proteína NodL de *R. leguminosarum* bv. *viciae* purificada, tiene actividad de transacetilasa *in vitro*, usando al acetilCoA como el donador de acetilos, y esta actividad la ejerce sobre lipoquitooligosacáridos, fragmentos de quitina y GlcNAc (Bloemberg *et al*, 1994).

O-glucosilación:

Dos tipos de glucosilación han sido reportadas: fucosilación y arabinosilación. Muchas especies rhizobianas tienen como sustitución a una fucosa y se sabe que esta glucosilación puede posteriormente sufrir modificaciones. Una mutación en *nodZ* de *B. japonicum*, produce FN's carentes de 2-O-metil fucosil y tienen una nodulación defectuosa de siratro. La complementación con el gen *nodZ* de *R. leguminosarum* bv.*viciae*, da como resultado la producción de lipoquitooligosacáridos con un residuo fucosil sobre el carbono 6 de la GlcNAc del extremo reductor (López-Lara *et al*, 1996). Además, los ensayos enzimáticos *in vitro*, han demostrado que NodZ de

Rhizobium es una fucosil transferasa (Quinto *et al* 1997).

El residuo fucosil de *R. etli* y de *R. loti* en el extremo reductor puede ser una 4-*O*- acetil-L-fucosa, y el gen que participa en la 4-*O*-acetilación es la acetil transferasa codificada por el gen *nolL*. Esta modificación permite que *R. etli* lleve a cabo una nodulación eficiente de algunos cultivares de *Phaseolus vulgaris* y de *Vigna umbellata*. (Corvera *et al*, 1999)

La *O*-arabinosilación de los FN's ha sido observada en las bacterias de rhizobia que pueden nodular los tallos y las raíces de *Sesbania rostrata* y de *S. saheli*. En *A. caulinodans*, la proteína NodZ, que tiene una alta similitud con la proteína NodZ de *B. japonicum*, está involucrada en la arabinosilación, sugiriendo que las proteínas de esta familia están involucradas en la *O*-glucosilación del residuo de glucosamina reductor. NolK puede tener una participación en la glucosilación ya que presenta homología con las enzimas azúcar epimerasas/deshidrogenasas que unen NAD/NADP (Mergaert *et al* 1996, 1997).

Sustituciones 1-*O*-glicerol:

Hay pocos reportes de sustituciones sobre el carbón anomérico. En *B. elkanii*, los FN's minoritarios tienen la glucosamina "reductora" unida al glicerol. En *B. japonicum*, las mutantes *nolO* producen algunos derivados que no están 2-*O*-metil fucosilados pero están glucosídicamente unidos al glicerol. El hecho de que los FN's que tengan glicerol unido sean compuestos minoritarios en una bacteria silvestre y que puedan ser encontrados en una mutante alterada en la síntesis de FN's, sugiere que pueden existir intermediarios biosintéticos (para revisión ver Dénarié y Debellé, 1993; Downie, 1994). En *Rhizobium* sp. NGR234, *NolO* y *NoeL* están involucrados en la 3-*O*- carbamilación del extremo no reductor y en la 2-*O*- metilación del grupo fucosil de los factores de nodulación. Se ha demostrado la actividad de carbamiltransferasa de *NolO*, aunque se supone que en esta cepa debe haber otras carbamiltransferasas que puedan complementar una mutación en este gen (Jabbouri *et al*, 1998).

En resumen, estas estructuras químicas son diversas en su forma y composición química final, lo cual les permite tener especificidad sobre el hospedero (para revisión ver Dénarié *et al*, 1992, Dénarié y Cullimore, 1993). Aunque hasta la fecha no se ha determinado su forma de acción, se ha postulado la participación de un posible receptor en la membrana no descrito hasta el momento. Otro posible papel de los factores de nodulación podría ser participando como una hormona. Las evidencias con que se cuenta hasta ahora no descartan a ninguna de las dos hipótesis. Lo que se sabe es que

estos factores son capaces de inducir la expresión de diversos genes que codifican para las llamadas "nodulinas", las cuales son específicas del desarrollo del nódulo (para revisión ver Brewin 1991; Dénarié y Cullimore, 1993; Downie, 1994; Hirsch, 1992 y Long 1996; Vijn *et al*, 1995). La bacteria también induce la expresión de proteínas relacionadas con el sistema de defensa contra patógenos y daño reportados en las plantas superiores (Ribeiro *et al* 1995), lo cual permite suponer que la bacteria es reconocida como un agente extraño que usa al factor para escapar del sistema de defensa e infectar a la planta, y que las vías de señales para que la planta responda a diversos estímulos están relacionadas (Lawson *et al* 1994; McKhann y Hirsch, 1994; Penmetsa y Cook, 1997). Por ejemplo, una leguminosa mutante con insensibilidad al etileno, que es una molécula señal de daño, puede ser hiperinfectada por una bacteria de *Rhizobium* silvestre (Penmetsa y Cook, 1997). Además los FN's son capaces de provocar cambios en el potencial de membrana de la célula, alteración del ciclo celular y cambios en los niveles de calcio (Ehrhardt *et al*, 1996, Cárdenas *et al* , sometido a publicación, Felle *et al*, 1995, Pingret *et al*, 1998, Yang *et al*, 1994) indicando que se les puede considerar como moléculas señalizadoras, aunque la forma en que son detectados por la planta aún no se ha aclarado.

En la **tabla 1** se hace un resumen de los genes de nodulación encontrados a la fecha y sus funciones de acuerdo con la información que se ha reportado acerca de ellos.

TABLA 1. GENES *nod* REQUERIDOS PARA LA SINTESIS Y TRANSPORTE DEL Factor Nod

CONSTITUYENTE	PROTEINA Nod	PRODUCTO GENETICO	EVIDENCIA	FUNCION
N-Acetilglucosamina	NodM	Glucosamino Sintasa	Similitud en secuencia	Síntesis de glucosaminas
?	NodN	?	?	?
N-Acetilglucosamina	NodC	UDP-Acetilglucosaminosil Transferasa	Similitud en secuencia a Quitina Sintasa y Actividad Enzimática	Requerido para la nodulación
Acidos grasos	(R1) NodA	N-Aciltransferasa	Actividad Enzimática	Requerido para la nodulación
Glucosamina terminal	NodB	N-Acetilasa	Actividad Enzimática	Requerido para la nodulación
Acidos grasos con insaturaciones múltiples (R1)	NodE	Enzima Condensante	Similitud en secuencia	Determinante de especificidad del huésped
Acidos grasos con insaturaciones múltiples (R1)	NodF	Proteína Acarreadora de Grupos Acilo	Similitud en secuencia	Determinante de especificidad del huésped
N-Metilglucosamina	(R2) NodS	S-Adenosil metionina metil Transferasa	Actividad Enzimática	Posible determinante del rango del huésped
O-acetilglucosamina	(R3) NodL	O-Acetil transferasa	Actividad Enzimática	Determinante de especificidad del huésped, únicamente para <i>R. Leguminosarum</i>
O-carbamilglucosamina	(R3) ?	?	?	Posible determinante del rango del huésped
Sulfato	(R4) NodP,NodQ	ATP Sulfurilasa, APS Kinasa	Similitud en secuencia y Actividad Enzimática	Determinante de especificidad del huésped
Sulfato	(R4) NodH	Sulfotransferasa	Actividad Enzimática	Determinante de especificidad del huésped
N-acetilglucosamina O-6 acetil	(R4) NodX	Acetil Transferasa	Similitud en secuencia, su transferencia resulta en Factor con grupo acetilo	Determinante de especificidad del huésped
Metilfucosa, Fucosa	(R4) NodZ	Fucosil Transferasa	Actividad Enzimática	Determinante de especificidad del huésped
O-Carbamilo	(R4) NodU	Carbamil transferasa		
Grupo metil sobre un residuo fucosil	?	?	?	?
O-acetil sobre un residuo metilfucosil	?	?	?	?
Sulfato sobre metilfucosil	?	?	?	Posible determinante del rango del huésped
Glicerol	(R5) ?	?	?	?
-----	NodI,NodJ	Proteínas Transportadoras	Actividad Enzimática	Transporte del factor Nod a través de la membrana celular
-----	NodT	Proteínas Transportadoras	? Similitud en secuencia	Transporte del factor Nod a través de la membrana celular?
-----	NodO	Hemolisina, proteína de unión a Ca ²⁺	Similitud en secuencia	Proteína formadora de poros

TRANSPORTE DE FACTORES DE NODULACION

SISTEMA DE TRANSPORTADORES ABC:

Muchas de las proteínas, de los péptidos, polisacáridos y otras moléculas que son sintetizadas en el citoplasma bacteriano, a menudo deben cruzar una o más membranas para alcanzar su destino final. La mayoría de las proteínas bacterianas son secretadas por la vía *Sec*. La secreción dependiente de *Sec* requiere que el producto secretado sea una proteína con una secuencia señal amino terminal. Esto limita drásticamente el tipo de molécula que puede ser transportado por este sistema porque no pueden usarlo las moléculas que no son proteicas ni las proteínas extracelulares de bacterias Gram-negativas que tienen que cruzar las dos membranas (interna y externa) (para revisión ver Pugsley, 1993). Existen además proteínas bacterianas que no comparten las características de las que son transportadas por el sistema *Sec* y al parecer son incompatibles con esta ruta de transporte. Por lo tanto, muchas moléculas deben poseer otra forma de dejar el citoplasma. Recientemente se han identificado dos sistemas dedicados a la exportación de moléculas en bacterias Gram-negativas: los transportadores **ABC** y los transportadores parecidos a la familia de la **pululanasa** (Binet y Wandersman, 1995; para revisión ver Schatz y Dobberstein, 1996).

Una característica común en los sistemas dedicados al transporte es que, al igual que el sistema *Sec*, requieren energía para facilitar el desplazamiento, y muchos de los sistemas estudiados hasta ahora parecen utilizar Trifosfato de Adenosina (*ATP*). Los sistemas que usan el *ATP* como fuente de energía necesitan un agente capaz de unir este nucleótido y los dominios estructurales que pueden unir eficientemente el *ATP* facilitando su hidrólisis, se han conservado a través de la evolución. Este dominio es conocido como pliegue de Rossman, motivo de Walker o motivo de Doolittle y consiste de dos sitios conservados (*A* y *B*) que forman una cavidad para unir *ATP*. El sitio de unión a *ATP* se encuentra al final de una α -hélice; los residuos **GXGKST** forman una vuelta, poniendo al residuo de lisina muy cercano a los fosfatos del Mg^{2+} -*ATP*. El residuo de ácido aspártico en el sitio *B* está cercano en el espacio al sitio *A*, y su carga negativa puede interactuar con la molécula de Mg^{2+} . La secuencia consenso se definió al comparar secuencias relacionadas en las subunidades alfa y beta de la *ATP* sintasa, de la miosina y de muchas cinasas. Este consenso en la secuencia de aminoácidos tiene un pequeño número de residuos, que generalmente están presentes en proteínas que unen nucleótidos (para revisión ver Pugsley, 1993).

Se han analizado extensamente a los complejos multiproteicos que forman a las permeasas bacterianas involucradas en la adquisición de

nutrimentos, y se ha demostrado que están compuestos por proteínas que tienen sitios consenso de unión a ATP. Todos los sistemas de permeasas tienen un componente conservado que incluye una región de 200 aa con un alto grado de identidad a nivel de secuencia y que contiene los sitios consensos de unión a ATP A y B. Esta extendida región de similitud claramente distingue a estos componentes de las permeasas de otras proteínas que unen nucleótidos como las ATP sintasas, las miosinas o las cinasas y también está presente en muchas proteínas bacterianas que forman parte de sistemas dedicados a la exportación. Esta región tan conservada ha sido llamada el cassette de unión a ATP (ATP binding cassette o ABC), y las proteínas que presentan esta región son llamadas transportadores ABC. Estos transportadores se han clasificado en tres tipos: importadores ABC bacterianos; transportadores ABC eucarióticos; y exportadores ABC bacterianos (para revisión ver Pugsley, 1993; Walshaw y Poole, 1996).

IMPORTADORES BACTERIANOS ABC:

Las permeasas periplásmicas bacterianas componen una gran subfamilia de transportadores ABC. Todas ellas son sistemas de multisubunidades dedicadas a importar moléculas con una organización estructural similar, y presentan una proteína asociada a la membrana de naturaleza hidrofílica con un dominio de unión del tipo ABC. En varios sistemas, este componente tan conservado se asocia con dos proteínas hidrofóbicas. Una característica única de los importadores bacterianos ABC es que todos tienen una proteína unida al periplasma que interactúa con el sustrato que va a llegar, lo une y lo expone al complejo importador en la membrana interna. Los importadores ABC bacterianos tienen el dominio de unión a ATP y los dominios que atraviesan a la membrana (membrane-spanning domains o MSDs) en polipéptidos separados. En contraste, la mayoría, aunque no todos los dominios de unión a ATP en los sistemas exportadores bacterianos están presentes en los mismos polipéptidos que en los que están los MSDs (Pugsley, 1993).

EXPORTADORES BACTERIANOS ABC:

Hasta la fecha hay más de 40 identificados. Todos los transportadores ABC de esta subfamilia tienen conservado el motivo de unión a ATP y este motivo puede estar en el mismo polipéptido en el que están los MSDs (como en los exportadores ABC eucarióticos), o en polipéptidos separados de sus dominios hidrofóbicos (como en los importadores bacterianos ABC). Muchos de estos exportadores ABC necesitan proteínas accesorias para formar un complejo funcional. Se han identificado en bacterias Gram negativas y han

demostrado ser necesarios cuando el producto secretado está destinado a una liberación inmediata al medio extracelular. Estas proteínas son llamadas factores accesorios, y la mayoría se pueden encontrar en la membrana interna, aunque unos pocos están localizados en la membrana externa y esto parece apoyar la hipótesis de que los factores accesorios están anclados en la membrana interna y atraviesan el periplasma. El factor accesorio probablemente conecta a la membrana interna con la externa y funciona facilitando la exportación de productos a través de ambas membranas en las células gram negativas. El gen que codifica para el factor accesorio siempre ha sido encontrado unido a los genes que codifican para las proteínas del sistema ABC (para revisión ver Pugsley, 1993; Paulsen, 1997a).

Muchos exportadores ABC de bacterias Gram negativas no tienen factores accesorios, en particular aquéllos involucrados en el transporte de sustratos no proteicos. En esos sistemas, el destino final de la molécula exportada es el periplasma o la membrana externa. En algunos casos, es necesaria la participación de proteínas accesorias para completar el desplazamiento del producto dentro de la membrana externa. Sin embargo, en esos sistemas el transporte a la membrana externa es un proceso distinto y las proteínas involucradas son diferentes de las proteínas que participan como factores accesorios tipo ABC (Pugsley, 1993).

Otros genes relacionados con la exportación, cuyos productos también participan en varios sistemas de exportación de moléculas en bacterias Gram negativas, codifican para proteínas de membrana externa que son requeridas para la secreción de diferentes compuestos (Fath *et al*, 1991). Los genes que codifican para esos factores accesorios de membrana externa pueden estar localizados muy cerca de los genes que codifican para los exportadores, o físicamente distantes de estos últimos. Además, el factor de membrana externa ha mostrado tener funciones celulares aparte de la de exportador.

Hasta ahora no se ha reportado la estructura de algún factor de membrana externa, aunque en el caso de TolC, el factor de membrana externa que participa en la secreción de hemolisina y colicina, su estructura se ha determinado en forma tridimensional a partir de imágenes bidimensionales y se ha propuesto que la homotrimerización de esta proteína formaría un poro en la membrana externa (Koronakis *et al*, 1997) aunque algunos autores usan el perfil de hidrofobicidad, comparándolo con el promedio de similitud y de anfipaticidad para proponer una estructura de 14 dominos ramificados- β en barril que haría que la proteína formara un poro a través del cual exportaría su sustrato (Loveless y Saier, 1997)

FAMILIAS DE TRANSPORTADORES REPORTADAS EN BACTERIAS

Se ha propuesto al menos tres tipos de sistemas de transporte que son el ABC (ATP-binding cassette), el de resistencia-nodulación-división (RND) y el de la superfamilia facilitadora mayor (MFS), que funcionan junto con proteínas transperiplásmicas llamadas proteínas de fusión membranal (membrane fusion proteins- MFP) (Dinh *et al* 1994, Saier *et al*, 1994). Adicionalmente, se ha propuesto que algunos de esos sistemas funcionan en conjunto con proteínas de la familia de los factores de membrana externa (outer membrane factor- OMF), pero esta hipótesis se basa más en análisis de secuencias que en evidencia experimental (Paulsen *et al*, 1997a), pues de los miembros de estas familias, sólo se tiene evidencia experimental, que apoya su función en el transporte de compuestos de tres sistemas (**Tabla 2**)(Fath *et al*, 1991).

Los análisis de árboles filogenéticos muestran que los exportadores bacterianos ABC pueden ser divididos en dos ramas principales, una de las cuales contiene a todos los sistemas de transporte donde el dominio ABC se encuentra en el mismo polipéptido que el MSD (grupo A), y el grupo B, al cual pertenecen aquellos que tienen los dos dominios en polipéptidos separados. Los transportadores del grupo A parecen funcionar sólo en la exportación, mientras que las proteínas que pertenecen al grupo B, pueden facilitar tanto la importación como la exportación de moléculas (Fath y Kolter, 1993).

Los transportadores bacterianos ABC pueden transportar una amplia variedad de sustratos que no están relacionados. Probablemente existe una especificidad no muy estricta que permite que una proteína o molécula, pueda ser transportada por diferentes sistemas de transporte ABC (Pugsley, 1993).

La región de nodulación del genoma de *R. leguminosarum* contiene un gen llamado *nodO*, que codifica para una proteína de 284 aa la cual es secretada, y que tiene un sitio de unión a calcio. NodO no tiene una secuencia señal y no es procesada en su extremo amino. La secuencia tiene una alta similitud a HlyA, CyaA y LktA en la región de glicina repetida RTX. La secreción de NodO en *E. coli* puede ser efectuado por HlyBD y TolC, o por PrtDEF (Finnie *et al*, 1997). Los tres genes de secreción deben estar presentes para la secreción de NodO a través de cualquier sistema heterólogo, dando evidencia de que un exportador ABC es requerido para la secreción de NodO. Hay dos genes unidos a *nodO* en el cromosoma de *R. leguminosarum*, los cuales son *nodI* y *nodJ*, que codifican para un sistema multicomponente de transporte ABC (Evans y Downie, 1986). Sin embargo, las mutantes en *nodI* aún siguen produciendo y secretando NodO, posiblemente por el producto del gen *ndvA*, el cual está involucrado en la exportación de glucano. Ya que

bacterias con mutaciones en este gen son capaces de seguir secretando a NodO, debe de haber otro gen involucrado en la secreción de esta proteína (Sutton, *et al* 1994).

SECRECION DE LOS FACTORES DE NODULACION:

Se ha postulado que los genes *nodI* y *nodJ* (Higgins *et al*, 1986) participan en la excreción de los factores de nodulación (Vázquez *et al*, 1993). El gen *nodI* codifica para una proteína de 311 aa del tipo ABC, con una predicción en su masa molecular de aproximadamente 34.3 kDa. El gen *nodJ* codifica para una proteína hidrofóbica de 259 aa, con una probable masa molecular de 27.7 kDa. (Evans y Downie, 1986)

Inicialmente, los genes *nodIJ* de *R. leguminosarum* bvs. *trifolii* y *viciae*, fueron hallados formando un operón con los genes *nodABC* (Canter-Cremers H.C.J. *et al*, 1988). En nuestro laboratorio se encontró que inserciones en los genes *nodI* y *nodJ* de *R. etli* presentaban un retraso en la exportación de los FN's al medio, en comparación con la cepa silvestres (Cárdenas *et al*, 1996). Resultados similares fueron reportados en *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Spaink *et al*, 1995).

ANTECEDENTES

Los genes *nodIJ* han sido encontrados en todas las especies rizobianas estudiadas genéticamente, y se ha demostrado que no son indispensables para la nodulación (Evans y Downie, 1986, Scott *et al*, 1996, Vázquez, 1991, Young *et al*, 1990). NodI está relacionada a nivel de secuencia con la familia de proteínas transportadoras tipo ABC. La similitud más significativa la presenta con las proteínas KpsT, BexA y CtrD de *E. coli*, *H. influenzae* y *N. meningitidis* respectivamente, las cuales participan en la secreción de polisacáridos capsulares y conservan los sitios de unión a ATP, característicos de estas proteínas (Vázquez *et al*, 1993)(fig. 4). Usando anticuerpos contra una proteína de fusión *lacZ-nodI*, se demostró que la proteína está asociada con la membrana citoplásmica interna de *R. leguminosarum* (Schlaman, 1990). NodJ es una proteína transmembranal muy hidrofóbica que no tiene una similitud significativa con proteínas transmembranales dedicadas al transporte de polisacáridos; sin embargo, su perfil hidropático es muy similar al de las proteínas transmembranales KpsM, BexB y CtrC que participan junto con KpsT, BexA y CtrD respectivamente, en la secreción de compuestos. El gen *nodJ* en su extremo amino, tiene una secuencia similar al motivo de cierre de leucina que podría estar involucrado en la multimerización de NodJ o en la interacción con otras proteínas (Vázquez *et al*, 1993).

En *R.l. bv.trifolii*, la excreción de los FN's es dependiente de *NodI* y *NodJ*. Las mutantes *nodIJ* no acumulan FN's en el medio externo, en la membrana externa, o en el espacio periplásmico, y nodulan pobremente al trébol (McKay y Djordjevic, 1993). En otras especies tales como *R. leguminosarum* *bv.viciae*, las mutaciones en *nodIJ* tienen efectos moderados tanto en la excreción como en el fenotipo simbiótico (Spaink *et al*, 1992) lo cual sugiere la existencia de sistemas de transporte alternos. Los genes *nodIJ* han mostrado tener un papel en la secreción al medio de los FN's a tiempos cortos (1 a 5 h) después de la inducción de los genes *nod* con naringenina (Spaink *et al*, 1992).

En nuestro laboratorio, hemos detectado factores de nodulación en el medio de cultivo en un fondo genético de *R. etli* curada del plásmido simbiótico y complementada con un cósmido que lleva los genes de nodulación silvestres (fig. 5A) necesarios para producir y excretar factor de nodulación, después de 1 h de inducción. Esto no se observa si el cósmido lleva a los genes *nodI* o *nodJ* mutados. En estas mutantes, los FN's secretados al medio se observan después de 4 h de inducción, pero en menor cantidad que cuando se compara con la cepa que lleva los genes silvestres (fig. 5B) (Cárdenas *et al*, 1996).

Usando una bacteria *E. coli* DH5- α que llevaba una construcción con los

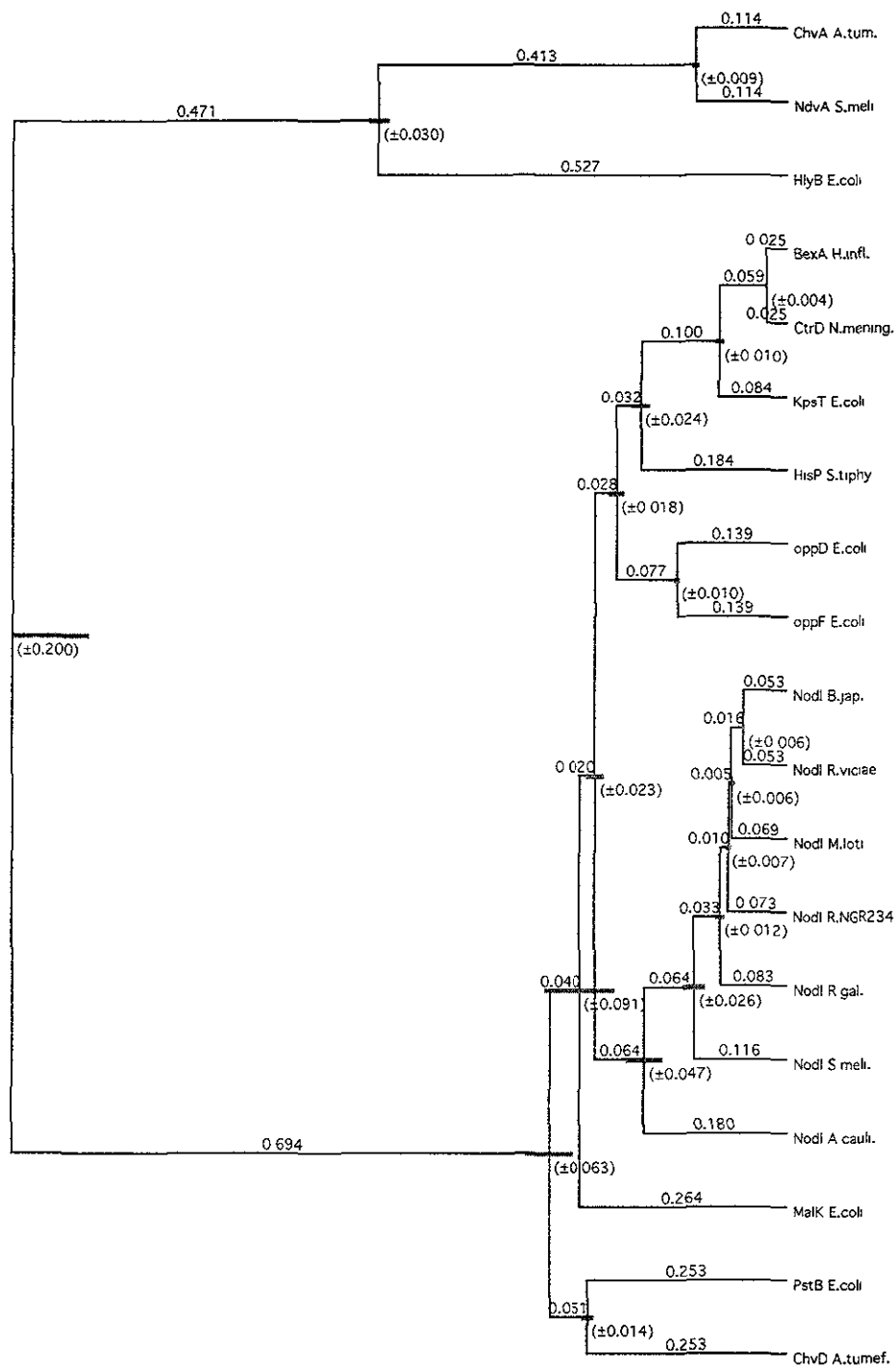
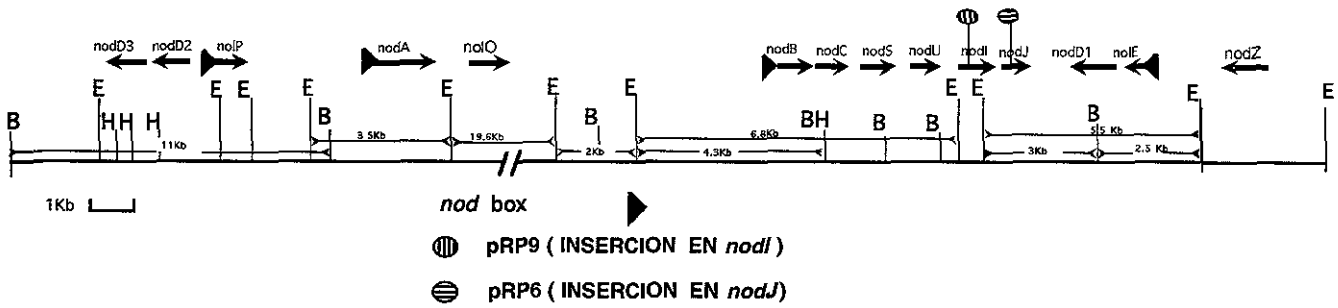


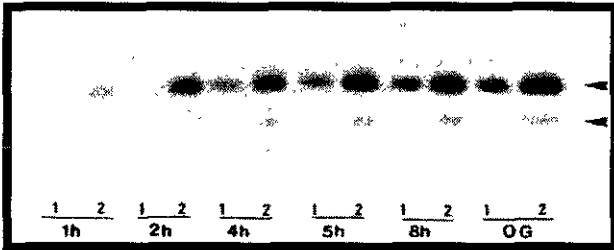
FIG. 4.-Dendrograma que muestra las relaciones de similitud entre las diferentes secuencias de NodI y las que existen entre los miembros de la familia de transportadores bacterianos tipo ABC.

A) REGION SIMBIOTICA DE *R. etli* CE3

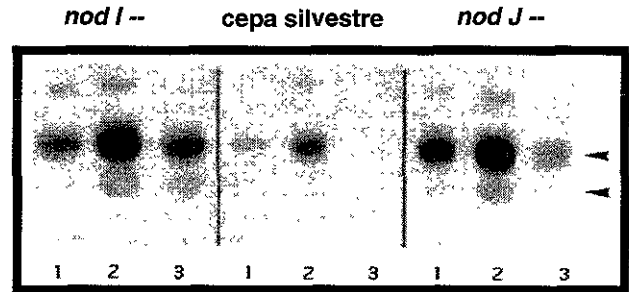
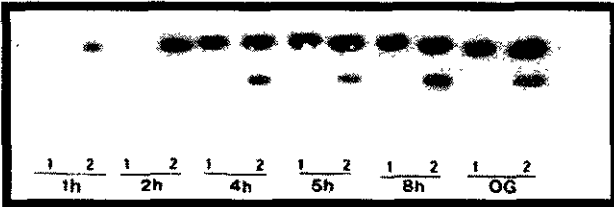


B)

1.- *nodI*-vs silvestre



2.- *nodJ*-vs silvestre



3.- ANALISIS CINETICOS POR TLC DE LCO's EXTRAIDOS DE PASTILLAS CELULARES DE CEPAS DE *Rhizobium etli*

- 1).- EXTRACTOS OBTENIDOS A LAS 2 H,
- 2).- A LAS 4 H,
- 3).- A LAS 8 H,

ANALISIS CINETICOS POR TLC DE SECRECIÓN DE LCO's, AL MEDIO, PRODUCIDOS CON GLUCOSAMINA MARCADA CON C₁₄, POR MUTANTES EN *nodI* (1) Y *nodJ* (2) COMPARANDOLOS CON LA CEPA SILVESTRE A LOS TIEMPOS INDICADOS.
O.G., CULTIVOS SOBRECRECIDOS.
PUNTAS DE FLECHAS: BANDAS DE MIGRACION RAPIDA (FLECHA SUPERIOR) Y DE MIGRACION LENTA (FLECHA INFERIOR).

FIG. 5.- A).-Mapa genético de la región simbiótica de *Rhizobium etli* cepaCE3, con la ubicación de las inserciones en *nodI* Y *nodJ*.

B).- Efectos de las inserciones en esos genes en el transporte de los factores de nodulación.

1).- Mutación en *nodI*; 2).- Mutación en *nodJ*. 3).- Factores Nod acumulados en las pastillas celulares de las diferentes cepas analizadas.

genes necesarios para generar factores de nodulación, y con los genes *nodI* y *nodJ* de *Azorhizobium caulinodans* en *trans*, fué posible secretar los factores al medio. En ausencia de *nodIJ*, o en presencia de uno solo de estos genes, no hubo excreción (Fernández-López *et al*, 1996).

El gen *nodT* fué identificado inicialmente en *R.leg. bv.viciae* y en *R. leg. bv.trifolii*, y se encontró formando parte del operon *nodABCIJ* (Surin *et al*, 1990) (fig. 6). En *R. leg. bv. trifolii* se localizó aproximadamente a 125 nucleótidos después del gen *nodJ*, sin que se observara alguna región de regulación en esa secuencia. En *R.leg. bv.viciae*, un ORF con una similitud a nivel de aminoácidos del 60% con el producto del gen *nodT* se localizó a 168 nucleótidos del codón de termino del gen *nodN* , aunque en lugar de iniciar con el codón ATG iniciaba con TTG, el cual ha sido observado como codón de inicio en aproximadamente el 1% de los genes bacterianos. Tampoco en esta zona se localizó alguna caja de nodulación u otro tipo de regulador transcripcional descrito para este gen. En cambio, sí se observó una región que podría servir como sitio de unión a ribosomas. Además, *nodT* es inducido por los mismos flavonoides que inducen la transcripción de los genes de nodulación que le preceden, sugiriendo que forma parte de un operón con genes de nodulación.

Los genes *nodT* aislados, codifican para un producto de 50.3 a 51.4 kD con una región amino terminal con características típicas de los péptidos de tránsito que pueden ser secretados a través de la membrana bacteriana interna (Surin *et al*, 1990). Contienen dos dominios conservados en el extremo carboxilo terminal que se ha propuesto que les permiten interactuar con otras proteínas involucradas en el transporte, ya que éstas regiones también se han localizado en otras proteínas de membrana externa involucradas en el transporte de compuestos (fig. 7). Al usar un anticuerpo hecho contra la proteína NodT, se observó reacción cruzada en células de *Rhizobium* que eran pSym- (que les falta el plásmido simbiótico) y que se suponían NodT-. En la cepa 8002, que es *R. leguminosarum* *bv. phaseoli* (pSym-), se localizó un ORF con una similitud a nivel de aminoácidos del 64% con *nodT* de *R.l. viciae* y *R.l. trifolii*. Este gen está localizado fuera del plásmido simbiótico, pero no se ha determinado si está en algún otro plásmido o en el cromosoma. Tampoco se ha reportado que esté formando parte de un operón con genes de nodulación o de transporte (Rivilla y Downie, 1994).

A la fecha no se ha logrado explicar la participación del gen *nodT* en la nodulación. Las mutantes de *nodT* que se han obtenido en las diferentes biovariedades de *R. leguminosarum* no presentan un fenotipo claro en este proceso y esto puede ser debido a la presencia de copias homólogas, que se han localizado en todas las bacterias estudiadas, las cuales podrían estar

complementando las mutaciones. Hasta ahora no se han publicado datos en donde se obtengan dobles mutantes (Rivilla y Downie, 1994). En el caso de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, una mutación en este gen no provoca un efecto en la nodulación, pero en *R. l.* bv. *trifolii* cepa TA1, que nodula a una variedad de tréboles, pero que es incapaz de nodular un cultivo de trébol subterráneo llamado Woogenellup, este fenotipo es revertido con sólo complementar a dicha cepa con el gen *nodT*, el cual falta de forma natural en su genoma, indicando que es un determinante de la especificidad del hospedero a nodular (Lewis-Henderson y Djordjevic, 1991a,b).

Los análisis de secuencia de las proteínas *nodT* han dado como resultado el clasificarlos dentro de la familia de proteínas OMA (outer membrane accesories) (fig. 8, Tabla 2), la cual está formada por genes se han localizado formando parte de operones que producen complejos proteicos encargados de la secreción de diversos compuestos como lipopolisacáridos (LPSs) de procariontes Gram-negativos; ácidos teicoicos (TCAs) que están asociados con las membranas y las paredes de bacterias Gram-positivas; polisacáridos capsulares (CPSs) y exopolisacáridos (EPSs) de bacterias Gram-positivas y negativas, y los lipooligosacáridos (LOSs) secretados como moléculas señalizadoras, por bacterias que forman nódulos en plantas leguminosas. La ubicación de NodT dentro de esta familia se realizó en base al análisis de las secuencias (Paulsen *et al*, 1997 a y b)

Se ha tratado de observar una participación de este gen en la secreción de factor de nodulación pues una hipótesis sostiene que NodT, junto con NodI y NodJ, podrían constituir un sistema de transporte que permite a los FN's ser secretados directamente a través de las membranas interna y externa sin intermediarios periplásmicos (fig. 9). Esto se ha propuesto debido a que existen dos dominios conservados de NodT en el extremo carboxilo terminal y a que, al realizar una comparación de todas las secuencias que se han reportado para *nodT*, se observó que tienen una similitud significativa con las secuencias de TolC de *E. coli*, CyaE de *B. pertussis*, PrtF de *Erwinia chrysanthemi* y AprF de *P. aeruginosa*. Todas esas proteínas se localizan en la membrana externa y están involucradas en la secreción de proteínas que tienen una señal de secreción en el extremo carboxilo terminal (Rivilla *et al* 1995).

Spaink y colaboradores reportaron que al usar acetato radioactivo como precursor de los metabolitos Nod, estos son secretados al medio en forma "normal" por mutantes en *nod I*, *nodJ*, *nodM*, *nodT* y *nodO* en *R. leguminosarum* bv. *viciae*, aunque la extracción de los metabolitos Nod del medio se realizó en cultivos sobrecrecidos (Spaink *et al* 1992).

En *Rhizobium etli* se ha demostrado que *nodIJ* participan en la excreción

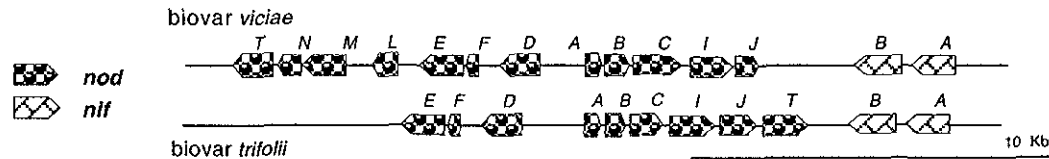


FIG. 6.- Mapa físico de las regiones donde está el gen *nodT* en *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* y *trifolii*

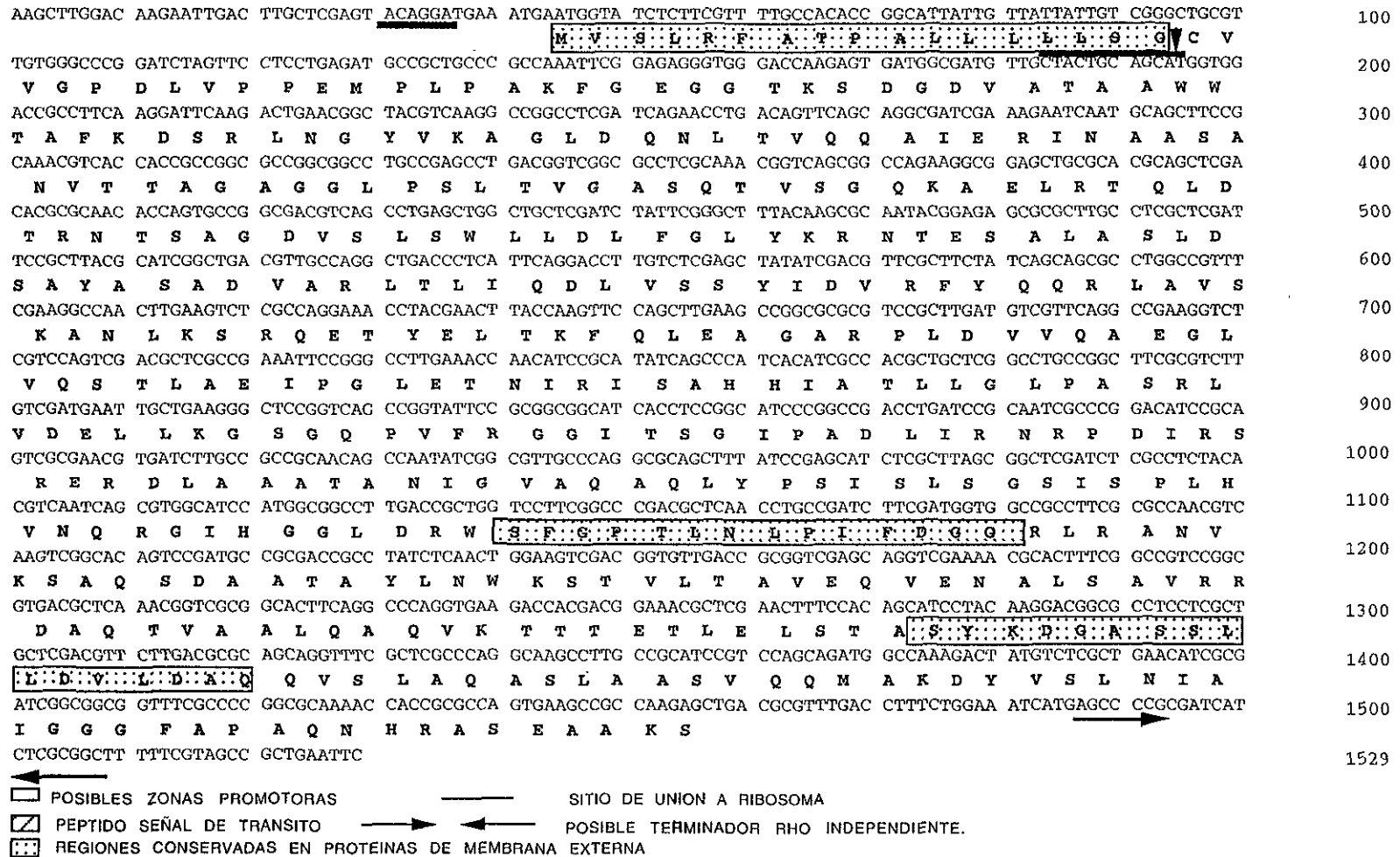


FIG. 7.- Secuencia nucleotídica y de aminoácidos del fragmento de 1.5 kb del pIJ1984, donde se observa el ORF que codifica para el gen *nodT* de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*.

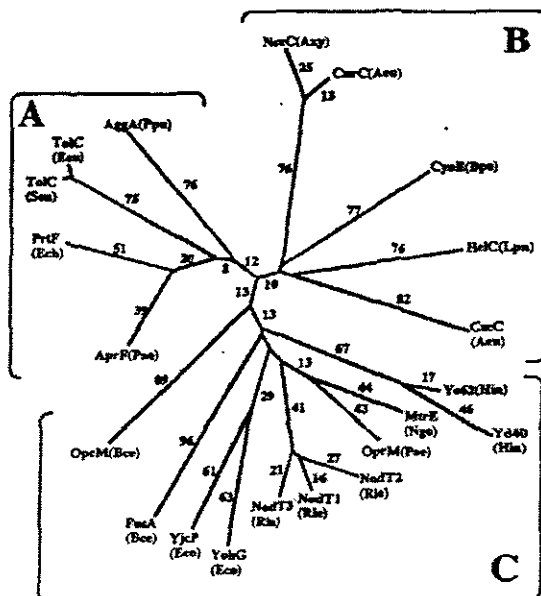


FIG. 8.- Arbol filogenético que muestra a las proteínas de la familia de Factores de Membrana Externa, en la que se involucra a NodT y las relaciones evolutivas entre ellas

TABLA 2.- Proteínas de la Familia de Factores de Membrana Externa y sus posibles interacciones con sistemas transportadores

PROTEINA FME	PFM	TRANSPORTADOR	FUNCION	ORIGEN	#AA
TolC (Sen)	?	?	Virulencia	<i>Salmonella enteritidis</i>	492
TolC (Eco)	CvaA	CvaB (ABC)	Exporte de colicina V	<i>Escherichia coli</i>	495
	EmrA	EmrB (MFS)	Exporte de drogas		
	HlyD	HlyB (ABC)	Exporte de hemolisina		
AprF (Pae)	AprE	AprD (ABC)	Exporte de proteasa alcalina	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	481
PrtF (Ech)	PrtE	PrtD (ABC)	Exporte de proteasas	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	462
AggA (Ppu)	?	?	Involucrada en aglutinación/adherencia	<i>Pseudomonas putida</i>	452
CnrC (Aeu)	CnrB	CnrA (RND)	Exporte de níquel /cobalto	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	481
NccC (Axy)	NccB	NccA (RND)	Exporte de níquel/cobalto/cadmio	<i>Alcaligenes xyloisidans</i>	438
CyaE (Bpe)	CyaD	CyaAB (ABC)	Exporte de ciclolisina	<i>Bordetella pertussis</i>	474
CzcC (Aeu)	CzcB	CzcA (RND)	Exporte de Cobalto/cadmio/zinc	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	345
HelC (Lpn)	HelB	HelA (RND)	Virulencia?	<i>Legionella pneumophila</i>	415
NodT1 (Rle)	?	?	Exporte de lipooligosacáridos ?	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	471
NodT2 (Rle)	?	?	Exporte de lipooligosacáridos ?	<i>R. leg.</i> bv. <i>trifolii</i>	467
NodT3 (Rle)	?	?	?	<i>R. leg.</i> bv. <i>viciae</i>	482
MtrE (Ngo)	MtrD	MtrC (RND)	Exporte de múltiples drogas	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	467
OprM (Pac)	MexA	MexB (RND)	Exporte de múltiples drogas	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	477
YjcP (Eco)	YjcR	YjcQ	?	<i>Escherichia coli</i>	488
YohG (Eco)	?	?	?	<i>Escherichia coli</i>	398
FusA (Bce)	FusE	FusB/C/D (?)	Resistencia a ácido fusarico	<i>Burkholderia cepacia</i>	433
Yeh62 (Hin)	?	?	?	<i>Haemophilus influenzae</i>	454
Yd40 (Hin)	?	?	?	<i>Haemophilus influenzae</i>	441
OpcM (Bce)	?	?	Exporte de drogas múltiples	<i>Burkholderia cepacia</i>	512

del factor de nodulación, aunque no es el único sistema de transporte que existe. Debido a que en nuestro laboratorio detectamos por hibridación southern la presencia del gen *nodT* en el fondo genético de *Rhizobium etli* cepa CE3, quisimos estudiar la participación de este gen en la nodulación y observar su papel en la secreción de los FN's.

OBJETIVOS:

- Aislar y caracterizar al gen *nodT* en *Rhizobium etli* cepa CE3
- Analizar su papel en la secreción del factor de nodulación

MATERIALES Y METODOS

Las cepas y plásmidos utilizados se enlistan en la **tabla 3**

EXTRACCION DE DNA DE PLASMIDO POR MEDIO DE LISIS ALCALINA

Las cepas que contenian el plásmido de interés fueron crecidas en 3 ml de medio de cultivo con su antibiótico correspondiente por 12 h. Se pasó el cultivo a tubos eppendorf de 1.5 ml de capacidad y se centrifugaron a 14 000 revoluciones por minuto (rpm) por dos min. Se eliminó el medio por aspiración, dejando la pastilla de células tan seca como fue posible. Se resuspendio la pastilla usando un agitador tipo vortex en 100 µl de solución I* fría

- * 50 mM de glucosa
- 10 mM de EDTA
- 25 mM de Tris. HCl (pH 8.0)

Se almacenó por 5 min a temperatura ambiente manteniendo la boca del tubo cerrada. Posteriormente se adicionó 200 µl de solución II** de reciente preparación.

- ** NaOH 0.2 N
- SDS 1 %

Se mezcló el contenido invirtiendo el tubo rápidamente 2 o 3 veces evitando la formación de burbujas. El tubo se mantuvo en hielo por 5 min. Se adicionaron 150 µl de una solución fría de acetato de potasio (pH 4.8) o solución III**

- ** Acetato de potasio 5 M 60 ml
- Acido acético glacial 11.5 ml
- Agua estéril 28.5 ml

Esta solución es 3 M con respecto al potasio y 5 M con respecto al acetato.

Se agitó el tubo vigorosamente por 10 segundos. Se mantuvo al tubo en hielo por 5 min y se centrifugó a 14 000 rpm durante 7-15 min a 4^o C. Se pasó el sobrenadante a un tubo fresco y se le adicionaron 10 µl de RNAsa 1% libre de DNAsa, se incubó durante 15-30 min a 37^oC y se le adicionó un volumen igual de una mezcla de Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamílico (25:24:1 en proporción). Se mezcló en un vortex todo y se centrifugó por 2 min a 14 000 rpm. Posteriormente se pasó el sobrenadante a un nuevo tubo. Esta operación se repitió dos o tres veces más. Se adicionaron dos volúmenes de etanol a temperatura ambiente y se mezcló en vortex. Se puso a enfriar a -20^oC por 30 min o sólo 2 min y se precipitó a 14 000 rpm por 5-15 min. Se removio el sobrenadante y se seco la pastilla a T.A. Se adicionó 1 ml de etanol

Tabla 3

CEPAS, VECTORES Y COSMIDOS UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO.

CEPAS	CARACTERISTICAS	
<i>Rhizobium etli</i>		
CFN42	Cepa silvestre Nod+, Fix-	
CE3	Cepa SmR derivada de la silvestreCFN 42, Nod+, Fix+	
CFN2001	<i>R. etli</i> curada del plásmido simbiótico, Nod-, Fix-, Rif ^R	
CFNX182	(CFN42 curada del plásmido a, Nod+, Fix+)	} Brom <i>et al</i> , 1992
CFNX183	(CFN42 curada del plásmido b, Nod+/-, Fix +/-)	
CFNX184	(CFN42 curada del plásmido c, Nod+, Fix+)	
CFNX89	(CFN42 curada del plásmido d [pSym], Nod-, Fix-)	
CFNX185	(CFN42 deletada del plásmido e . Nod+.Fix+)	
CFNX186	(CFN42 curada del plásmido f , Nod+,Fix+)	
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α:	<i>supE44ΔlacU169 [φ80lacZΔM15]hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thy-1,relA1</i>	
HB101	<i>supE44 hsdS20[rmB]recA13 ara-14, proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1</i>	
CMK	Δ [<i>lac, pro</i>], <i>thr, leu, thi, tonA, hsdR, [F' traD36, proAB, lacZΔM15], supE</i>	
XL1-Blue	Δ (<i>mcrA</i>) 183 Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>) 173 <i>endA1 Pe44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI ΔM15 Tn10(Tet^r)]^C</i>	
VECTORES Y PLASMIDOS		
pLAFR-1	<i>IncP, Tcr, mob+, Tra-, cos</i> amplio rango de hospederos	Friedman <i>et al</i> 1982
pBluescript KS/SKII	Sitio de clonación múltiple (SCM), flanqueado por los promotores T3/T7, Amp ^r	Stratagene Catalog 1995
pMP2750	Promotor <i>nodA</i> , SCM, Sp ^r	Spaink <i>et al</i> 1996
pMP2750-38	Producto de PCR con <i>nodT</i> de plásmido c en pMP2750	Este trabajo
pMP2750-2.2	Fragmento de 2.2 kb en pMP2750	Este trabajo
pMP2750-4	Fragmento de 4 kb en pMP2750	Este trabajo
pHME22	Fragmento de 2.2 kb <i>Eco</i> RI- <i>Bam</i> HI con <i>nodT</i> cromosomal en pSK	Este trabajo
pHME18	Fragmento de 1.8 kb <i>Hin</i> dIII- <i>Bam</i> HI con <i>nodT</i> cromosomal en pSK	Este trabajo
pHME40-7 ó 3	Fragmento de 4 kb <i>Eco</i> RI con <i>nodT</i> de plásmido c, en pSK, en las dos orientaciones	Este trabajo
pHME40-1	Fragmento de 1 kb <i>Eco</i> RI- <i>Hin</i> dII en pSK derivado del pHME40-3	Este trabajo
pHME40-1.2	Fragmento de 1.2 kb <i>Hin</i> dII- <i>Hin</i> dII en pSK derivado del pHME40-7	Este trabajo
pHME40-1.6	Fragmento de 1.6 kb <i>Eco</i> RI- <i>Hin</i> dII en pSK derivado del pHME40-7	Este trabajo
pLARF 3-55	Cósmido con 20 kb del genoma de <i>Rhizobium</i> , del que se obtuvo el fragmento de 7.7 kb con <i>nodT</i> de cromosoma	Este trabajo
pLARF 7-100	Cósmido con 20 kb del genoma de <i>Rhizobium etli</i> , del que se obtuvo el fragmento de 4 kb del plásmido c donde va <i>nodT</i>	Este trabajo
pHME22 T-CAT19	pHME22 con una inserción CAT19 en <i>nodT</i>	Este trabajo
Clona17	<i>nodT</i> con inserción CAT19 en pJQ200SK	Este trabajo
pIJ1984	<i>nodT</i> de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> en pUC19	Rivilla <i>et al</i> 1994
pJQ200SK	Vector suicida. SCM, <i>sacB</i> , Gm ^r , <i>mob</i> , <i>cos</i> .	Quant y Hynes, 1993
pCAT19	MCS, CAT, Cm ^r	Claiborne, 1992
pRK2013	Nm ^r , plásmido cooperador	Figurski y Helinski, 1979

70% y se resuspendió la pastilla. Se centrifugó a 14 000 rpm por 2-5 min (se repitió el proceso 2 veces). Se eliminó el sobrenadante y se secó la pastilla en un desecador al vacío. Se agregaron 50 μ l de TE (Tris-EDTA pH 8) y se resuspendió la pastilla. De esta muestra se tomó 1 μ l y se analizó en un gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio.

PURIFICACION DE DNA TOTAL DE *Rhizobium* sp.

Para obtener el DNA genómico de *Rhizobium* y sus derivadas, se siguió este protocolo. Se inoculó una asada de bacterias en 3-5 ml de medio de cultivo PY e incubó a 30°C y 250 rpm hasta saturar. Se pasó el cultivo a tubos eppendorf de 1.5 ml de capacidad que se centrifugaron a 14 000 rpm por dos min. Se desechó el sobrenadante y se le agregaron a las células 1 ml de TE 50:20, se agitaron los tubos en un vortex hasta que no quedaron partículas visibles y que se hubieran separado lo mejor posible las células. Se centrifugaron a 14,000 rpm por 2 min y se eliminó el sobrenadante. Se añadieron 400 μ l de TE 50:20 y se le agregaron 50 μ l de una solución de Pronasa* y 50 μ l de SDS 10%, se resuspendió lentamente y se mantuvo 1 h a 37°C.

* Disolver 5 mg de Pronasa en 1 ml de TE 50:20 y predigerir 30 min a 37°C.

Se pasó el lisado 3 veces por una aguja de insulina y se le agregaron 500 μ l de Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (25:24:1). Se agitó en vortex hasta emulsificar. Se centrifugó durante 3 min. Se tomó la fase acuosa para transferirla a un tubo nuevo. Este paso se repitió las veces que fueran necesarias para obtener una fase acuosa libre de impurezas.

se adicionaron 500 μ l de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se agitó en vortex y centrifugó por 3 min. Se tomó la fase acuosa y se transfirió a otro tubo. Se adicionaron 15 μ l de NaCl 5 M y 800 μ l de etanol absoluto. Se agitó en vortex y se dejó 10-15 min a -70°C. Se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 min a 4°C y se desechó el sobrenadante. Se lavó la pastilla con 1 ml de etanol 70%. Se centrifugaron a 14 000 rpm por 2 min y se repitió este paso dos veces. Se desechó el líquido y se secó en un evaporador al vacío. Se resuspendió la pastilla en 50-100 μ l de agua estéril o de TE 10:1. Se tomó 1 μ l de esta muestra y se analizó en un gel de agarosa al 1%.

IDENTIFICACION DE DNA DE PLASMIDO DE *Rhizobium* EN GEL DE AGAROSA (Método de Eckhardt, 1978)

Se creció a *Rhizobium* a 30°C y se tomó 1 ml de cultivo a una D.O. de 0.2. Se preparó un gel horizontal a 0.75 de agarosa en TB 1X (0.75 g de agarosa en 100 ml de TBE 1X)

Se centrifugaron las células 3 min a 14000 rpm en tubos eppendorf de 1.5 ml. Se extrajo el sobrenadante con una jeringa. Todo esto se realizó en hielo. Se sacó el peine del gel y se le agregó TBE 1X hasta que llegó al gel sin cubrir los pozos. Se adicionó a cada pozo 25 μ l de SDS 10%-Xylen Cyanol. Se recorrió el gel a 100V durante 15 min con el polo negativo al contrario de un gel de electroforesis normal.

En otra serie de tubos, se agregó 1 ml de N-lauryl sarcosine 0.3 %. Se resuspendió el pellet usando una pipetman en 500 μ l de H₂O fría y se pasó suavemente al tubo con el N-lauryl sarcosine 0.3 %. Se centrifugó 3 min a 14000 rpm. Se extrajo el sobrenadante con jeringa. La pastilla se resuspendió en 40 μ l de ficoll 20% en TE con pipetman y se dejaron las muestras en hielo 15 min o menos. Se agregó TBE 1X a la cámara hasta cubrir completamente el gel. Toda la corrida del gel se llevó a cabo a 40° C. Se adicionaron 40 μ l de la solución de lisozima a la solución de lisis* (1 mg de lisozima por 100 μ l de H₂O) y azul de bromofenol.

* 0.4 mg/ml de RNAsa A hervida (10 min) y 1 mg/ml de azul de bromofenol. Alicuotar y conservar a -20°C.

Se adicionaron 10 μ l de la solución de lisis a cada muestra celular. Se pusieron 25 μ l de la muestra en cada pozo. Se llevó a cabo la electroforesis con los cables en posición normal 60 min a 40 V y toda la noche (+/- 16 h) a 120 V. El gel se analizó bajo luz ultravioleta.

PREPARACION DE CELULAS ELECTROCOMPETENTES

Las células de *E. coli* que se utilizaron para las subclonaciones y transformaciones, fueron preparadas por el siguiente método. Se inoculó 1 litro de LB con 1/100 de volumen de un cultivo fresco incubado toda la noche. Se mantuvo en crecimiento el cultivo a 37°C a 250 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 a 0.8 usando una longitud de onda de 600 nm (los mejores resultados se obtienen con células que han llegado a una fase log temprana o media, sin embargo la densidad celular apropiada depende de la cepa y de las condiciones de crecimiento).

Para cosechar a las células, se mantuvieron de 15 a 30 min en hielo y se centrifugaron a 4000 X g/max por 15 min. Se eliminó lo más posible del sobrenadante (medio). Lo mejor es sacrificar el rendimiento perdiendo algunas células que dejar cualquier cuerpo que exista del sobrenadante. Se resuspendió la pastilla en un total de 1 litro de agua estéril helada teniendo cuidado de no lisar las células. Se centrifugaron nuevamente. Se resuspendieron en 500 ml de agua helada y se centrifugaron. Se resuspendieron en 20 ml de glicerol 10% helado. Se centrifugaron y se resuspendieron en un

volumen final de 2 a 3 ml de glicerol 10% helado. La concentración celular debe ser de aproximadamente $1-3 \times 10^{10}$ células/ml

Esta suspensión se congeló en alícuotas sobre hielo seco o nitrógeno líquido y se mantuvieron a -70°C . Las células pueden ser usadas por lo menos durante 6 meses con este procedimiento.

* Mantenga las células lo más cercanas a 0°C durante la preparación, por ejemplo, dejar las células el mayor tiempo posible dentro de un baño de agua helada.

ELECTROPORACION Y PLAQUEO:

Para pasar las construcciones y los plásmidos que se obtuvieron por ingeniería genética, se transformaron las células que se prepararon anteriormente. Cuidadosamente se sacaron las células a temperatura ambiente y entonces se colocaron en hielo. Se sacaron las cubetas estériles de su empaque y se colocaron en hielo. En un tubo de polipropileno frío de 1.5 ml se mezclaron 40 μl de las células en suspensión con 1 a 2 μl de DNA (El DNA debe estar en un buffer de baja fuerza iónica como el TE*). Se mezclaron bien y se mantuvo al tubo en hielo de 0.5 a 1 min.

* El DNA que contiene mucha sal puede hacer a la muestra demasiado conductiva y causar un arco eléctrico a alto voltaje.

El aparato Gene Pulser se ajustó a 25 μF . Se ajustó el controlador de pulso a 200 Ω y a 2.50 kV cuando se usaron cubetas de 0.2 cm. Se ajustó a 1.50-1.80 kV cuando se usaron cubetas de 0.1 cm. La mezcla de células y de DNA se transfirió a una cubeta de electroporación, y agitó la suspensión en el fondo de la cubeta. Se colocó la cubeta en una cámara de deslizamiento segura. Se empujó la cámara hasta que quedó asentada con los contactos en la base de la cámara y se dió un pulso de corriente. Se quitó la cubeta de la cámara e inmediatamente se adicionó 1 ml de medio de cultivo fresco a la cubeta y se resuspendió rápidamente las células con las pipetas (ésta rápida adición de medio después del pulso es muy importante para la recuperación de transformantes). Se transfirió la suspensión de células a un tubo de polipropileno de 17 X100 mm y se incubaron a 37°C por 1 h (el agitar los tubos a 225 rpm durante esta incubación puede incrementar la recuperación de transformantes). Se corroboraron y grabaron los parámetros del pulso eléctrico (el tiempo constante debe ser de entre 4 y 5 mseg). La fuerza del campo eléctrico puede ser calculado como volts actuales (V)/espacio de la cubeta (cm). Se plaquearon las células en un medio selectivo.

CONJUGACION:

Para pasar las construcciones genéticas y los vectores, a *Rhizobium*, se realizaron cruza triparentales para aprovechar el proceso de conjugación que se realiza en bacterias. Se colocaron 3 ml de medio de cultivo selectivo y se

inoculó con la bacteria de interés. Se creció por separado a la bacteria donadora (*E. coli*), la receptora (*Rhizobium*) y la que lleva el plásmido cooperador. Se creció hasta una absorbancia óptica de 0.3 a 0.6 a una longitud de onda de 600 nm. Se centrifugó 1.5 a 3 ml de los medios de cultivo en tubos eppendorf de 1.5 ml de capacidad, a 14 000 rpm por 2 min. Se quitó el medio de cultivo. Se resuspendió la pastilla celular en 1 ml de MgSO₄ 10 mM y se centrifugó nuevamente. Se eliminó el sobrenadante y volvió a resuspender la pastilla celular en 20 µl de MgSO₄ 10 mM. Esta gota se colocó en medio de cultivo sólido sin antibiótico. Sobre ella se añadió las gotas de las células con las que se llevará a cabo la conjugación. Se trató de poner las células en una proporción de 1:1:1. y se incubaron de 24 a 48 h a la temperatura de crecimiento de la célula receptora*

**Rhizobium* crece a 30°C.

Se tomó el parche de células y se resuspendió en 1 ml de MgSO₄ 10 mM con Tween 0.1%, se agitó en vortex lo mejor posible, procurando no dejar grumos formados**. Centrifugar 15-30 seg.

** En el caso de *Rhizobium*, al parecer tiene una gran cantidad de polisacáridos capsulares, lo que fomenta la formación de agregados. Es por eso conveniente que este paso se repita dos o tres veces más.

Se decantó el sobrenadante y resuspendió en 350 µl de MgSO₄ 10 mM con Tween 0.1%. Se sometió a vortex para eliminar cualquier formación de grumos o células agrupadas. Se plaqueó en tres cajas de medio selectivo 200 µl, 100 µl y 50 µl de estas células en suspensión, para obtener las células aisladas. Se colocaron los controles en cajas separadas para evitar contaminaciones. Se tomaron las candidatas a transconjugantes y analizó si eran positivas

ESTRATEGIAS PARA CLONACION EN PLASMIDOS VECTORES LIGACION DE FRAGMENTOS CON EXTREMOS COHESIVOS:

Se digirió el plásmido y el DNA a insertar con las enzimas de restricción apropiadas. En casos necesarios, se aislaron los fragmentos deseados por gel de electroforesis y/o con tratamiento del plásmido con fosfatasa. Se purificaron los plásmidos extrayendolos con fenol:cloroformo y con precipitación con etanol. Se redisolviéron los DNA's en TE (pH 7.6) a una concentración de 100 µg/ml.

Se hicieron las mezclas de ligación como sigue:

- a).- Se transfirió 0.1 µg del DNA del vector a un tubo eppendorf de 1.5 ml estéril. se adicionó una cantidad de DNA a insertar en una concentración equimolar.
- b).- Se adicionó agua hasta 7.5 µl y se calentó la solución a 65° C por 5 min

para separar cualquier extremo cohesivo que se haya realineado. Se colocó la muestra en hielo.

c).-Se adicionó:

- Solución amortiguadora 10X para bacteriofago T4 DNA ligasa* 1 μ l
- Ligasa de bacteriofago T4 1 μ l (0.1 unidades) Weiss
- ATP a 5 mM 1 μ l

Se incubaron las reacciones por 1 a 4 h a 16^o C

* Solución amortiguadora 10X para Ligasa T4

200 mM de Tris.Cl (pH 7.6)

50 mM de MgCl₂

50 mM de Dithiothreitol

500 μ g/ml de albumina de suero de bovino (opcional)

Se colocaron además dos reacciones control, una con el plásmido vector solo y otra con el DNA del inserto y el vector sin ligar. Se utilizó de 1 a 2 μ l de cada una de las reacciones de la ligación para transformar células competentes de *E. coli*.

LIGACION DE FRAGMENTOS CON EXTREMOS ROMOS:

En los casos en que se realizó la ligación con extremos romos o rasurados, se necesitaron las siguientes condiciones:

- Concentraciones bajas de ATP (0.5 mM)
- La ausencia de poliaminas como la espermidina
- Concentraciones muy altas de ligasa (50 unidades Weiss/ml)
- Altas concentraciones de extremos rasurados

En algunos casos se utilizaron agentes condensantes de DNA para que éste formara agregados, como el Poli-etilén glicol o el cloruro de hexaminocobalto, las cuales aceleraron la relación de ligación de extremos de DNA rasurados de 1 a 3 órdenes de magnitud, lo que permitió que se llevaran a cabo las reacciones a bajas concentraciones de DNA y de enzima. Otra de sus funciones fué la de alterar la distribución de los productos de ligación. Así se suprimió la ligación intramolecular, y los eventos de ligación se redujeron a los de unión intermolecular.

BUSQUEDA EN COLONIA DE FRAGMENTOS DE DNA DE INTERES EN UN BANCO GENOMICO.

Para aislar las diversas clonas del banco genómico, se ocupó un banco genómico de *Rhizobium etli*, construido con el vector pLAFR1, que puede contener fragmentos de alrededor de 20 kb, y que se calcula que tiene representado el genoma de *Rhizobium* aproximadamente 3 veces. Se colocó un

filtro de nitrocelulosa (Hybond N+™ Amershan) sobre una caja petri con agar con el antibiótico de selección (Tc 10). Se utilizaron las puntas de palillos estériles, y se transfirió cada colonia de bacterias a los filtros que estaban sobre el agar de las cajas y la misma punta se pasó sobre el agar de una caja con antibiótico de selección, pero sin filtro, la cual se consideró como la caja principal. Por último se colocó una colonia que sólo tenía el vector sin inserto, el cual fué el control negativo, puesto que fué necesario para discriminar entre un alineamiento específico de la sonda radioactiva a un plásmido recombinante y una hibridación no específica que se considera como fondo. Se invirtió las cajas y se incubaron a 37° C hasta que la bacteria alcanzó un diámetro de entre 0.5 a 1.0 mm.

Se marcó el filtro de nitrocelulosa en tres o más posiciones asimétricas y éstas marcas se hicieron también en la caja principal. En el caso del filtro se realizó un corte en las orillas, o se utilizó algún lápiz para hacer las señales. Otra forma de marcarlos fué con un sello con el número de colonias a picar. Este sello fué mojado con tinta indeleble y se colocó sobre los filtros, por lo que se marcó el número de colonia, así como su localización en la caja. Se selló la caja principal con parafilm y se almacenó a 4° C en una posición invertida hasta que se tuvieron los resultados de la reacción de hibridación. Se lisaron las bacterias y unió el DNA liberado al filtro de nitrocelulosa. La lisis celular y el fijado del DNA se realizó con un solo paso utilizando NaOH 0.4 N.

HIBRIDACION SOUTHERN

SEPARACION DE LOS FRAGMENTOS DE DNA GENOMICO O DE PLASMIDO:

Se digirió una cantidad apropiada de DNA genómico de la bacteria sobre la que se realizó la hibridación (se deben cargar aprox. 10 µg de DNA por carril), o del plásmido de interés. Al final de la digestión, se preparó un gel de agarosa con solución amortiguadora (TAE o TBE) y se colocó en una cámara de electroforésis llena de esta solución, generalmente a una concentración de 1X. (Este gel puede llevar bromuro de etidio a 0.5 µg/ml). Se encendió la cámara y se corrió a un voltaje de 60-100 V. Se evitó la salida del colorante azul de bromofenol. Después de terminar la electroforésis, se tomó una fotografía del gel, colocando una regla transparente de color rojo a anaranjado y sometiendo ambos a luz ultravioleta. Otra opción fué la de colocar una película transparente y marcar con un plumón tanto los pozos del gel como la disposición de las bandas.

TRANSFERENCIA DEL DNA DEL GEL DE AGAROSA A UN SOPORTE SOLIDO (MEMBRANA DE NYLON) POR TRANSFERENCIA CAPILAR:

Se colocó el gel encima de un soporte de vidrio con un papel Whatman 3MM encima, en contacto por ambos lados con un depósito que contenía una solución de NaOH 0.4 N. Encima del gel se puso la membrana de nylon al cual se transfirió el DNA evitando la formación de burbujas, las cuales evitaron la transferencia de algún o alguno de los fragmentos. Encima se colocaron unas tres capas de papel Whatman 3 MM y finalmente varias capas de toallas de papel absorbente. Finalmente un peso aplicado encima de todo fomentó la transferencia por capilaridad.

Posteriormente se lavó la membrana en una solución de SSC 2X para quitar el exceso de NaOH. Se observó en una lampara de luz ultravioleta para ver si se transfirió y de esta manera esta luz ayudó a fijar el DNA en forma covalente en la membrana de nylon (Hybond N+™ Amershan). Otro método para fijar el DNA a la membrana fué la de hacer un secado al vacío en una estufa a 80⁰ C.

MARCAJE RADIOACTIVO DE LA SONDA DE DNA UTILIZANDO EL SISTEMA DE MARCAJE DE DNA CON MULTIPLES CEBADORES

Para esta tesis se siguió el siguiente protocolo de marcaje radioactivo:

- 1.- Se disolvió el DNA a marcar a una concentración de 2-25 µg ya sea en agua destilada o en 10 mM de Tris-HCl (pH 8) y 1 mM de EDTA.
- 2.- Se desnaturalizó la muestra de DNA calentando de 95-100⁰ C por 2 min en un baño de agua hirviendo, despues se puso la muestra en hielo.
- 3.- La reacción en hielo se preparó de la siguiente manera:

Solución de DNA (25 ng)	1-10 µl
dNTP's no marcados *	4 µl de cada uno omitiendo el que va a estar marcado
Solución amortiguadora 10X**	5 µl
Cebador***	5 µl
[α- ³² P]dNTP	5 µl
Enzima	2 µl
Agua a un volumen final de	50 µl

4.- Se mezcló suavemente utilizando una pipeta y se centrifugó brevemente en una microcentrífuga.

5.- Se incubó a 37⁰ C por 30 min, 4 a 5 h a temperatura ambiente o toda la noche a 14-16⁰ C. Para su uso en reacciones de hibridación la muestra se calentó a 95-100⁰ C por 2 min y despues se colocó en hielo y directamente se utilizó para reacciones de hibridación. La marca no incorporada se puede

remover usando filtración en gel o con precipitación selectiva, antes de desnaturalizar. Si se usa la precipitación puede resuspender la sonda marcada en NaOH 0.1 N y de esa forma se evita el calentar la muestra. La reacción se puede usar directamente o guardarla a -20° C una vez que se le ha agregado EDTA a 20 mM.

HIBRIDACION DE SONDAS MARCADAS RADIOACTIVAMENTE A ACIDOS NUCLEICOS INMOBILIZADOS

La membrana de nylon con el DNA transferido se colocó en una solución de SSC 2X, y después se introdujo en un tubo de acrílico al cual se le agregaron 10 ml de una solución que lleva:

Formamida	5.0 ml
SDS 20%	3.5 ml
NaH ₂ PO ₄ 2M(pH 7.2)	1.5 ml
EDTA 500 mM pH: 8	0.02 ml

Se metió el tubo a un horno de hibridación a 42° C. durante 4 h. Posteriormente se le adicionó la sonda marcada radioactivamente a la solución y al filtro, y se dejó incubando durante 12-48 h dependiendo de la actividad específica de la sonda. Posteriormente se extrajo la solución y el filtro se sumergió en una solución de SSC 0.5 X y SDS 0.1 % a 55° C y se mantuvo en agitación durante 30 min. Posteriormente se detectó con un contador Geiger la señal de radioactividad en la zona de hibridación con respecto al resto de la membrana para deducir si el fondo radioactivo puede interferir con la señal. Cuando así ocurría se lavó la membrana con una solución de SSC 0.1 X y SDS 0.1 % a 55° C por 30 min. Si la señal de fondo aún persistía se incrementaba la temperatura hasta 65° C y se lavaba más tiempo.

Si la señal de fondo había disminuído, entonces se lavaba con una solución de SSC 2 X, durante 4 veces y se metía el filtro dentro de una bolsa de plástico o se cubría con una película de plástico. Se expuso el filtro a una Película para RayosX OMAT, o directamente en una pantalla de Phosphorimager™.

SECUENCIACION DE DNA DE PLASMIDO POR EL METODO DE TERMINACION DE CADENA

Para realizar las lecturas de secuencia en el laboratorio, se procedió a usar el método de terminación de cadena, tal y como está descrito en el protocolo de Amershan Life science para su paquete de secuenciación con Sequenase T7. Los cebadores que se ocuparon en el caso del pBluescript con sus insertos, fueron los cebadores comerciales T3 y T7. El pHME22, el pHME16 y el pHME1, fueron cortados con enzimas que dejaran extremos salientes 3'

que se usaron como protectoras, y posteriormente se usó la actividad de exonucleasa de la enzima ExoIII que usa como templado extremos terminales salientes 5' y genera deleciones de los fragmentos de interés. Posteriormente se usó la actividad exonucleasa de cadena sencilla de la enzima nucleasa SI para generar extremos romos en los fragmentos deletados. Los fragmentos de 2.2 y 4 kb que se secuenciaron, fueron deletados unidireccionalmente con las enzimas ExoII y Nucleasa S1, para obtener clonas con fragmentos menores y de fácil secuenciación. Las clonas se trataron con la enzima Klenow y la ligasa T4 para ligar las construcciones y se transformaron células de *E. coli* HB-101, DH5 α , o XLIBLue, para obtener los diferentes plásmidos con el inserto deletado en diferentes longitudes. Este método puede ser revisado en Henikoff, 1984, y adaptarse a los diferentes vectores a estudiar.

se desnaturalizaron los templados de doble cadena con cualquiera de los siguientes protocolos descritos abajo:

A).-DESNATURALIZACION DE DNA DE DOBLE CADENA CON GLICOL

En un tubo de polipropileno se mezclaron:

0.5-3 μ g de DNA	X μ l (No más de 7)
Agua	X μ l (ajustar a 7)
Reactivo desnaturalizador de plásmido*	5 μ l
DNA Prímero o cebador	1 μ l
	<hr/>
TOTAL	13 μ l

*10 mM de Tris-HCl(pH 7.5), 1 mM de EDTA,
50% de glicerol y 50% de etilén glicol

Se mezcló e incubó la muestra por 5 min a 90-100^o C. se puso la mezcla en hielo y se le añadió:

Buffer de reacción con plásmido.**	2 μ l
	<hr/>
TOTAL	15 μ l

DESNATURALIZACION DE DNA DE DOBLE CADENA CON ALCALINIDAD

En un tubo de polipropileno se mezcló:

0.5-3 μ g de DNA	X μ l (No más de 8)
Agua	X μ l (Hasta ajusta a 8)
NaOH al 1.0 M	2 μ l
DNA Prímero o cebador	1 μ l
	<hr/>
TOTAL	11 μ l

se mezcló e incubó por 10 min a 37^o C. Se puso la mezcla en hielo y se

le añadió:

HCl al 1.0 M	2 μ l
Buffer de reacción con plásmido.**	2 μ l

TOTAL	15 μ l
-------	------------

** (concentrado) 1.0 M de Tris-HCl (pH 7.5),
100 mM de $MgCl_2$, 250 mM de NaCl

2.- ALINEAMIENTO: se incubó la mezcla de Templado/prímero/buffer a 37°C por 10 min. Se mantuvo en hielo.

3.- Mientras se llevaba a cabo el alineado, se marcaron y se le adicionó a los tubos 2.5 μ l de cada mezcla de terminación*** (ddG, A, T y C). Se mantuvieron en hielo para usarlos en los pasos 5 y 7.

*** La mezcla lleva: dideoxinucleótido (ddG, A, T o C) 8 μ M, 80 μ M de 7-deaza-dGTP, 80 μ M dATP, 80 μ M de dCTP, 80 μ M TTP, 40 mM de Tris-HCl (pH 7.6) y 50 mM de NaCl.

4.- Se diluyó la mezcla de marcaje**** 5 veces para trabajar en esa concentración. Si se quiere hacer una lectura de secuencia lejana al primer, no lo diluya. Retenga para su uso en el paso 6

Mezcla de marcaje	2 μ l
-------------------	-----------

Agua	8 μ l
------	-----------

**** (7-deaza-dGTP) (Concentración de 5X) 7-deaza-GTP a 7.5 μ M, dCTP a 7.5 μ M y dTTP a 7.5 μ M

5.- Se precalentaron los cuatro tubos de terminación del paso 3 (G,A,T y C) a 37°C

6.- Reacción de marcaje:

DNA alineado en hielo:	(15 μ l)
------------------------	----------------

Dithiotreitol al 0.1 M	1 μ l
------------------------	-----------

Mezcla de marcaje diluída	2 μ l
---------------------------	-----------

[α - ³⁵ S],[α - ³³ P] o [α - ³² P] dATP (5 μ Ci)	0.5 μ l
---	-------------

Secuenasa T7 formulada para secuenciar plásmidos*****	2 μ l
---	-----------

TOTAL	20.5 μ l
-------	--------------

7.- REACCIONES DE TERMINACION: se transfirieron 4.5 μ l de la reacción de marcaje a cada tubo de terminación (G,A,T y C). Se mezcló y continuó la incubación de las reacciones de terminación a 37°C por 5 min.

8.- Se detuvieron las reacciones añadiendo 4 μ l de solución de terminación concentrada a 2X (Formamida al 95%, EDTA a 20 mM, azul de bromofenol al 0.05% y xilen cianol FF al 0.05%)

9.- Se calentaron las muestras a 75°C durante 2 min inmediatamente antes de poner de 2 a 3 μ l de las muestras en cada línea del gel de secuencia.

PROTOCOLO PARA EXTRACCION DE METABOLITOS NOD DEL MEDIO DE CULTIVO

Para el caso de las cinéticas de secreción de FN's por parte de las bacterias analizadas, el paso 4 de este protocolo se llevó a cabo en el momento señalado para cada muestra, y éstas se mantuvieron a 40°C hasta esperar que la última muestra fuera retirada.

- 1.- Se creció la cepa a estudiar en medio B- hasta que alcanzó una D.O. de 0.2 a 600 nm de longitud de onda (λ)
- 2.- se diluyeron 50 μ l de este cultivo hasta una D.O. de 0.01 o 0.02 a 600 nm de λ para inocularlo en 1 ml de medio B- con antibiótico e inductor (Naringenina a 1.5-2 μ M)
- 3.- Se añadieron 25 μ Ci de glucosamina marcada con ¹⁴C. (actividad específica 45-60 μ Ci/ μ mol)
- 4.- Se creció en tubo de 10 ml a 28°C agitando a 250-300 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.2-0.4 en una λ de 600 nm
- 5.- Se pasó el cultivo a tubos eppendorf y se centrifugaron 15 min a 14000 rpm.
- 7.- se añadió 1/2 volumen (0.5 ml) de n-butanol saturado con agua
- 8.- Los tubos se agitaron vigorosamente durante mínimo 1 h o toda la noche
- 9.- Se centrifugaron los tubos 1 min a 3000 rpm, o se dejaron reposar hasta que se separaron dos fases.
- 10.- Con una punta amarilla se retiró la mayor cantidad posible de sobrenadante (\approx 300 μ l), que se transfirió a otro tubo eppendorf. Esta fase butanólica se secó en un evaporador al vacío.
- 11.- Se resuspendió el material en 20 μ l de n-butanol saturado. En caso de no lograr la resuspensión, se añadieron otros 20 μ l.
- 12.- Se agitaron los tubos vigorosamente en un mezclador para tubos eppendorf durante 1 h o toda la noche.
- 13.- Se marcaron las placas donde se corrieron las muestras y se añadió de 1.5-5 μ l de muestra a la placa.

Para Cromatografía en Capa Fina de Fase Reversa se usó como solvente acetonitrilo:agua en una proporción de 1:1 (v/v). El líquido subió por capilaridad hasta que faltaron \approx 0.5 cm para alcanzar el borde de la placa. Se dejó secar perfectamente y se expuso en una placa de Phosphorimager™.

EXTRACCION DE PROTEINAS DE *Rhizobium etli* cepa CE3

Después de inducir los cultivos en medio PY por diferentes períodos de tiempo con naringenina, o en estado de estrés calorico (42°C), las células fueron colectadas por centrifugación y se pasaron a tubos eppendorf. A los

tubos se les agregó solución de Laemmli (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 5% 2-mercaptoetanol, 0.1% azul de bromofenol) después de lo cual se incubaron por 5 min a 95-100°C, se dejaron enfriar en hielo, se eliminó el material insoluble por centrifugación, y se colectó el sobrenadante el cual contenía las proteínas listas para analizarse. En otro caso, se resuspendieron en 400 ml de agua y se sometieron a sonicación para romper las células y se recupero la fracción membranal que se resuspendio en el buffer de lisis que se utiliza en el IEF.

ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURALIZANTE (SDS-PAGE) Y NATIVO:

Las muestras fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (Laemmli, 1970). Cada muestra de proteína fué resuspendida en una solución de 100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4 % [p/v] dodecil sulfato de sodio (SDS), 20 % [v/v] glicerol, 10 mM β -mercaptoetanol, 0.2 % [p/v] azul de bromofenol (Laemmli 2X) (Laemmli, 1970) e incubadas 5 min a 95°C. Las proteínas fueron separadas en un gel discontinuo de 15 % acrilamida (9.73 % [p/v] acrilamida, 0.27 % [p/v] bis-acrilamida, 390 mM Tris pH 8.8, 0.1 % [p/v] SDS, 0.1 % [p/v] persulfato de amonio (APS), 0.04 % [v/v] TEMED. La parte concentradora del gel consistió de 4.96 % [p/v] acrilamida, 0.14 % [p/v] bis-acrilamida, 130 mM Tris pH 6.8, 0.1 % [p/v] SDS , 0.1 % [p/v] APS, 0.1 % [v/v] TEMED (Laemmli, 1970).

La solución de electroforesis fué: 25 mM Tris-HCl, 250 mM glicina, 0.1% [p/v] SDS. Se cargaron en los pozos las muestras de proteínas y marcador de peso molecular comercial y se corrieron a 20 mA durante 2 h.

Algunos grupos o iones cargados pueden migrar cuando se encuentran en un campo eléctrico. Puesto que las proteínas tienen una carga neta a cierto pH correspondiente a su punto isoeléctrico también pueden migrar, la proporción de la migración depende de la densidad de carga que tenga la proteína. La aplicación de un campo eléctrico a una mezcla de proteínas resulta en la migración gradual de las proteínas a diferentes distancias de uno de los electrodos. El compuesto utilizado para electroforesis es un polímero sintético de monómeros de acrilamida y bis-acrilamida (poliacrilamida), los cuales permiten la migración de proteínas dependiendo de la apertura formada por la red de poliacrilamida. De esta manera, un gel con una concentración de 10% permite la separación de proteínas con un peso de 10 a 200 kDa. En la electroforesis desnaturalizante el agente químico que permite una desnaturalización parcial es el detergente aniónico dodecil sulfato de sodio (SDS). La mezcla de proteínas es completamente desnaturalizada con calor (95°C) en presencia de β -mercaptoetanol que rompe los enlaces

disulfuro, el SDS desnatura a las proteínas y aporta cargas negativas a las proteínas lo que permite su migración hacia el cátodo (+), por lo que en éste tipo de geles el pH no es tan crítico (entre 3 y 10) como en geles nativos donde las proteínas se separan en base a su forma, carga y peso molecular.

ELECTROTRANSFERENCIA:

Después de que las proteínas fueron separadas, el gel se colocó en el cartucho de una cámara de transferencia en semi-seco y se le colocó una membrana de nitrocelulosa (Hybond-C extra; Amersham) con papel filtro entre la membrana y el gel. Posteriormente, se humedeció la cámara con solución de transferencia (39 mM glicina, 48 mM Tris, 20 % [v/v] de metanol); generalmente éste buffer tiene una baja fuerza iónica lo que permite la gran diferencia de potencial, además el metanol contenido en la solución promueve las interacciones hidrofóbicas y evita que el gel cambie de tamaño. Se le aplicó una corriente constante de 0.80 mA/cm² que se aplicó través de 1-3 h (Sambrook *et al*, 1989; Ausubel *et al*, 1989).

Se sugiere que la proteína se une a la nitrocelulosa por interacciones hidrofóbicas, aunque el mecanismo exacto de unión no está muy claro.

INMUNODETECCION:

A los filtros de nitrocelulosa donde se transfirieron las proteínas se les adicionó la solución de bloqueo que consiste en 5 % [p/v] leche descremada (CarnationTM) en 140 mM NaCl, 2.8 mM NaH₂PO₄, 7.2 mM Na₂HPO₄, pH 7.4 (PBS), 0.1 % [v/v] Triton X-100, y se incubaron 1 h a 50° C. Este proceso de bloqueo se realizó para evitar uniones inespecíficas de otras moléculas a las membranas, ya que la albúmina ocupa los sitios activos libres de las membranas. Posteriormente, se les adicionó el antisuero policlonal anti-NodT (Rivilla and Downie, 1994) diluído 1:1000 en 5 % [p/v] leche descremada (CarnationTM), 0.1 % [v/v] Triton X-100 en PBS (PBS-T) y se incubaron 2 h a temperatura ambiente. Se hicieron tres lavados de 15 min cada uno con PBS-T. Después se les adicionó el anticuerpo contra inmunoglobulina de conejo asociado a fosfatasa alcalina, diluído 1:5000 en PBS-T y se incubaron 1 h a temperatura ambiente. Se lavaron tres veces con PBS-T y se revelaron en un buffer de 0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 2 mM MgCl₂, pH 9.5 con 0.6 mM Nitro azul de tetrazolio (NBT) y 0.07 mM 5-bromo-4 cloro-3-indolil fosfato (BCIP), los cuales son los sustratos de la fosfatasa alcalina de manera que se produce una señal dada por la reacción química de la enzima y sus sustratos (Bio-Rad, 1994).

El proceso de electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección también es llamado Western blot.

TINCION CON AZUL DE COOMASSIE:

Una solución de azul de coomassie R-250 (0.1%) en agua:metanol:ácido acético glacial (5:5:2) fué adicionada al gel y se incubó 2 h. mínimo con agitación. Se destiñó 1 h con una solución de 50 % metanol, 10% ácido acético [v/v].

Este tipo de tinción permite visualizar proteínas con una concentración de \approx 0.5 μ g en el gel. Este es un colorante principalmente no polar que en un medio ácido reacciona con NH_3 y grupos de proteína no polar, a través de fuerzas electrostáticas y de van der Waals.

ELECTROFORESIS DE DOS DIMENSIONES:

Para realizar la electroforesis de dos dimensiones se utilizó el sistema desarrollado por O'Farrell (1975), en donde las proteínas se separan primero por punto isoeléctrico (pI) en condiciones desnaturizantes y posteriormente por tamaño molecular con el sistema de Laemmli (O'Farrell, 1975). Este sistema también se adaptó al formato pequeño (Hoefler, 1989).

Los geles para realizar el isoelectroenfoque (IEF) se hicieron en tubos de vidrio de 7 cm con capacidad para 500 μ l. Los tubos se lavaron con mezcla crómica durante 1 h y se enjuagaron bien con agua tridestilada, se lavaron unos minutos con 100 mM KOH y se enjuagaron nuevamente con agua, se lavaron con etanol absoluto y se dejaron secar. La solución del gel constó de 3.8 % acrilamida, 0.18 % bis-acrilamida (3.3 % T, 5.6 % C) 9.5 M urea, 0.36 % anfolinas de pH 3-10, 0.64 % anfolinas de pH 4-8, 2 % Nonidet P40, 0.02 % persulfato de amonio y 0.1 % TEMED. La solución del cátodo fué de 20 mM NaOH y la del ánodo de 0.085 % ácido fosfórico (Hoefler, 1989). Los geles se pre-corrieron a 200 v durante 15 min , después a 300 v 30 min y se cargaron las muestras en cada tubo. Las muestras se resuspendieron en una solución amortiguadora de lisis que constó de 2 % anfolinas de pH 4-6.5, 2 % Nonidet P40, 1 % DTT, 9.5 M urea. Se cargaron en la parte catódica del gel, y se electroenfocaron durante toda la noche (\oplus 16 h) a 400 V. Después se aumentó el voltaje a 500 V durante 60 min.

El gel se sacó del tubo con ayuda de una jeringa con agua, se marcó el extremo ácido y se equilibró en solución amortiguadora de Laemmli durante 25 min. Después se cargó en un gel de poli-acrilamida desnaturizante con el extremo ácido junto al inicio del gel. Paralelamente, se cargó un carril adyacente al cilindro del gel electroenfocado, con fracción membranal de *Rhizobium* para utilizarla como estándar interno. La electroforesis e inmunodetección se realizaron de la misma forma mencionada anteriormente.

MEDIOS DE CULTIVO**MEDIO LB (LURIA-BERTANI)**

Para un litro.

a 950 ml de H₂O desionizada agregue

Bacto-triptona	10 g
Bacto-extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g

Agite hasta que se disuelvan los solutos. Ajuste el pH a 7.0 con NaOH 5N (+/- 0.2 ml). Ajuste el volumen de la solución a 1 lt. con H₂O desionizada. Esterilice por autoclave durante 20 min a 15 lb/pulgada cuadrada.

MEDIO PY

Para 1 litro

A 950 ml de H₂O desionizada agregue:

5 gr. Peptona de caseína
 3 gr Extracto de levadura
 7-10 mM de CaCl₂
 Afore a 1 l desionizada

MEDIO B-

Manitol	10	g/lt
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.55	g/l
KNO ₃	0.55	g/l
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	1.3	g/l
Fe(III)NaEDTA	33	mg/l
Biotina	0.2	mg/l
Thiamina.HCl	5	mg/l
Elementos Traza	25	ml

Esterilizar a 120 °C

Agregar:

1 mM de K₂HPO₄ / KH₂PO₄ para ajustar el pH a 7.2

Trazas:

MnSO ₄ .H ₂ O	0.609	gr/lt
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.1	gr/lt
H ₃ BO ₃	1.27	gr/lt
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.4	gr/lt
CuSO ₄	0.04	gr/lt

RESULTADOS

1.- IDENTIFICACION Y AISLAMIENTO DE LOS GENES *nodT* EN *R. etli* CEPA CE3

El DNA total de *R. etli* cepa CE3 se extrajo por medio de lisis celular y se digirió con la enzima de restricción *Eco* RI. Con este este DNA digerido se realizó una hibridación tipo Southern, para detectar al gen *nodT*, usando como sonda un fragmento de 1.5 kb, el cual contiene el gen *nodT* completo de *R. leguminosarum* *bv. phaseoli* (pIJ1984). Se observaron dos bandas de hibridación: una de las cuales pesa aproximadamente 7.7 kb y la otra alrededor de 4 kb. (fig. 10), lo que indica que o bien el gen presenta un sitio de restricción interno *Eco* RI o que existe una segunda copia de este gen.

Con el fin de aislar estas regiones, se hizo una hibridación en colonia sobre un banco de *R. etli*, construido en el vector pLAFR1.

La sonda que se usó para realizar la hibridación tipo Southern sobre las 1,200 colonias que representan el banco, fué nuevamente el fragmento de 1.5 kb, que lleva el gen *nodT* completo de *R. leguminosarum* *bv. phaseoli* marcado con ³²P. Se seleccionaron todas las clonas que dieron una señal positiva por encima del fondo radioactivo, sin importar si esta era fuerte o tenue, ya que las bandas que se observan en el Southern genómico también presentan intensidades diferentes. Se aislaron 30 colonias que daban señal, y se procedió a hacerles una extracción de plásmido a cada una. El DNA plasmídico fué digerido con la enzima *Eco* RI y las digestiones de ellas se corrieron en un gel de agarosa al 1%. El DNA presente en este gel se transfirió a una membrana de nylon y también se hibridó con el fragmento de 1.5 kb. De las clonas analizadas, nueve llevaban el fragmento de 7.7 kb y cinco el de 4 kb. Las intensidades de la señal mostrada por los fragmentos que llevaban estas colonias tenían la misma diferencia que las que se observaron en las bandas de hibridación del DNA genómico. En ninguna de las clonas se observó la presencia de las dos bandas (fig. 11).

2.- LOCALIZACION DE LOS GENES *nodT* EN *R. etli* CEPA CE3

Con el objeto de determinar la localización de los fragmento que hibridaron con el gen *nodT*, utilizamos las cepas curadas de cada uno de los seis plásmidos que tiene *R. etli* CE3 (Brom *et al.*, 1992).

R. etli tiene 6 plásmidos, los cuales son nombrados de "a" hasta "f", siendo el plásmido "d" el simbiótico. Las cepas usadas fueron:

- CFN42 (*R. etli* cepa silvestre)
- CFNX182 (CFN42 curada del plásmido a)
- CFNX183 (CFN42 curada del plásmido b)

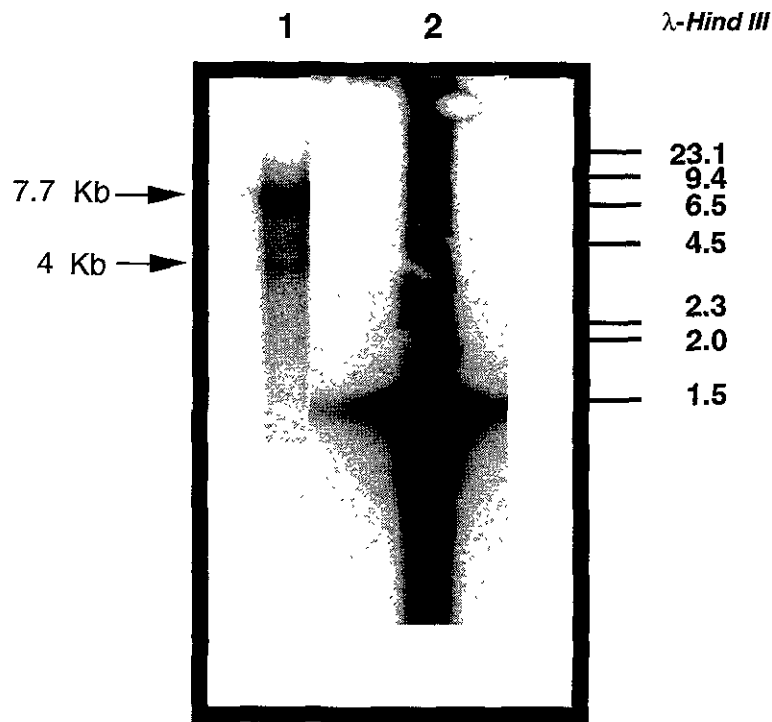


FIG. 10.- Hibridación Southern sobre DNA genómico de *Rhizobium etli* CE3, usando como sonda un fragmento de 1.5 Kb que lleva el gen *nodT* DE *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*

1.-DNA genómico de *Rhizobium etli* CE3 digerido con la enzima de restricción *Eco* RI.
 2.- pLJ1984 digerido con *Eco* RI (control)

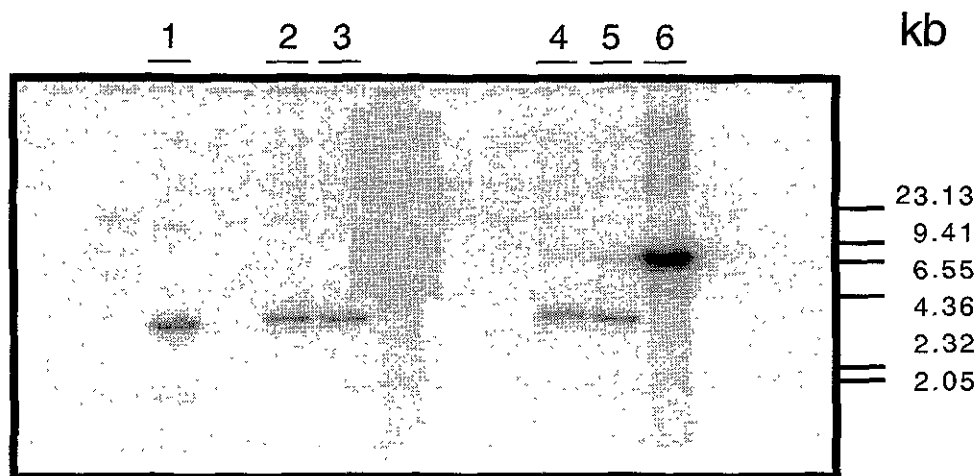


Fig. 11.- Hibridación tipo Southern de DNA de algunos de los cósmidos aislados de un banco genómico de *R. etli* CE3 y digeridos con *Eco* RI usando como sonda el gen *nodT* de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*.

Clonas: 1) 12-39, 2) 11-58, 3) 11-56, 4) 4-3, 5) 3-61 y 6) 1-100

Los números iniciales indican la caja del banco, y los siguientes al guión, el número de colonia.

CFNX184 (CFN42 curada del plásmido c)
 CFNX89 (CFN42 curada del plásmido d [pSym])
 CFNX185 (CFN42 deletada del plásmido e)
 CFNX186 (CFN42 curada del plásmido f)

Las cepas fueron crecidas a saturación y se les extrajo el DNA total que digirió con *Eco* RI, y se realizó una hibridación tipo Southern con la sonda de 1.5 kb (gen *nodT* de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*). Los resultados (fig. 12) mostraron que la banda de 4 kb está ausente en el DNA de la derivada que carece del plásmido c. La banda de 7.7 kb se encontró en todas las cepas, sugiriendo que esta copia es cromosomal o bien, podría estar localizada en alguna zona del plásmido "e", del cual todavía hay aproximadamente 200 kb. Para eliminar esta última posibilidad, se obtuvo un perfil de plásmidos y se realizó una hibridación Southern usando como sonda un fragmento de 1.8 kb *Eco* RI-*Bam* HI que se obtuvo del fragmento de 7.7 kb, y que se sabía que era el fragmento mínimo que daba señal de hibridación con el gen *nodT*. Se observó una señal de hibridación sobre el plásmido c y que aparecía en todas las cepas que llevan este plásmido. Cuando este plásmido faltaba no se observó señal alguna. sin embargo, en la zona donde se concentran fragmentos de DNA cromosomal roto, se observan manchas, lo que indicaba que la copia que esta en el fragmento de 7.7 kb muy probablemente es cromosómica y la que está en el fragmento de 4 kb se localiza en el plásmido c (fig. 13).

3.- ANALISIS POR MEDIO DE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE LA SECRECION DE LOS FACTORES DE NODULACION AL MEDIO DE CULTIVO, DE LAS CEPAS CURADAS DE LOS DIFERENTES PLASMIDOS DE *R. etli* CE3.

Se realizaron ensayos de exportación de factor de nodulación, utilizando glucosamina marcada con ¹⁴C como precursor de los FN's, para comparar la cantidad de factor secretado por las diferentes cepas curadas. Los resultados obtenidos indican que en cultivos inducidos toda la noche, hay diferencias entre las cepas. El análisis de Cromatografía en capa fina de fase reversa (TLC), indica que las cepas curadas del plásmido "a" y "b" secretan el factor de nodulación casi en la misma cantidad que la cepa silvestre (80 a 92%). Se observa una disminución de la cantidad de factor de nodulación secretado por la cepa CFNX184 que es la curada del plásmido "c". Esta cepa secreta aproximadamente un 8% de factor, con respecto a lo que secreta la cepa silvestre. La curada del plásmido "d" no presenta factor en el medio y este resultado se explica porque en este plásmido se localizan los genes de nodulación que sintetizan el factor. La cepa deletada del plásmido "e" secreta

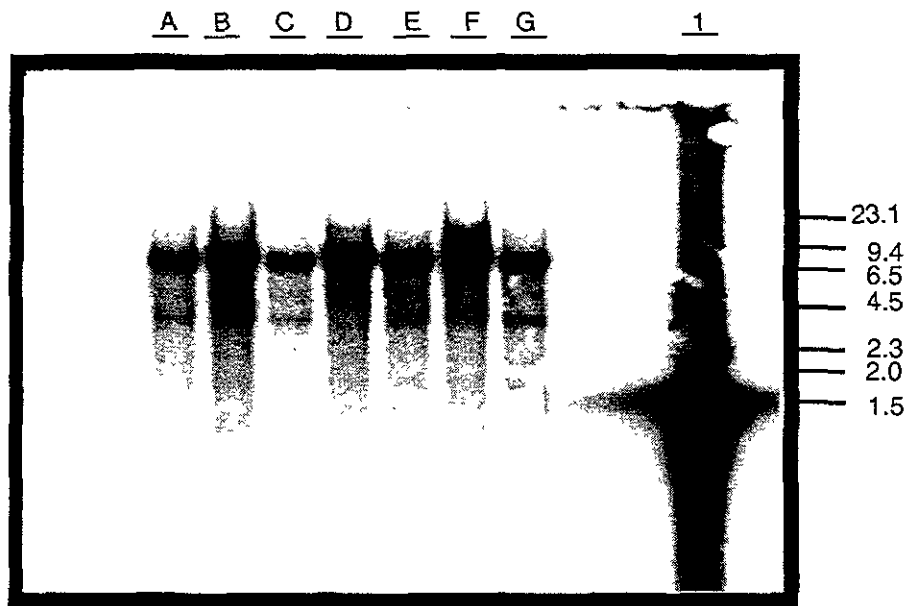


Fig. 12.- Hibridación Southern usando como sonda el gen *nodT* de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* contra el DNA genómico de cepas de *R. etli* curadas de los diferentes plásmidos y digerido con *Eco* RI.

A.- CFNX 42 (cepa silvestre); B.- CFNX 182 (a^-); C.- CFNX 183 (b^-); D.- CFN X184(c^-); E.- CFNX 89 (d^-); F.- CFNX185 ($e\Delta$); G.- CFNX 186 (f^-) 1.- *nodT* de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (control)

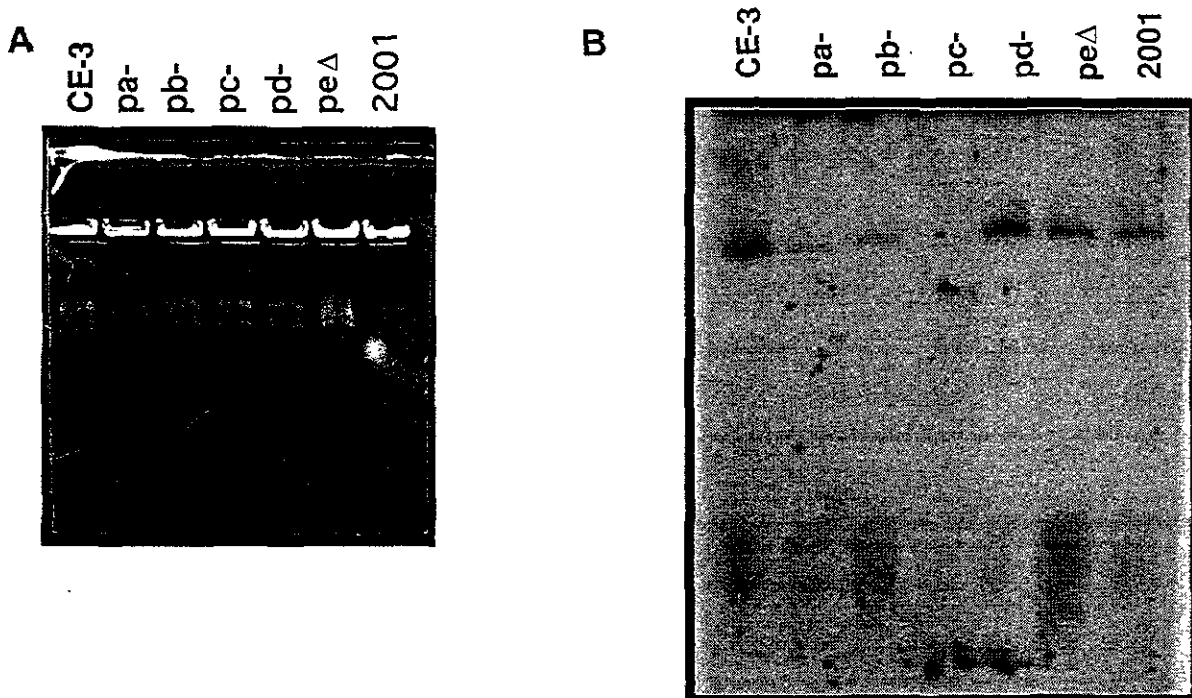


Fig. 13.- A) Perfil de plásmidos de *Rhizobium etli* y de las diferentes cepas curadas ó deletadas de los plásmidos que ella presenta. B) Hibridación tipo Southern usando una copia del gen *nodT* de *Rhizobium etli* como sonda, sobre un perfil de plásmidos de *Rhizobium etli* y diferentes curadas ó deletada de los plásmidos.

aproximadamente un 50% del factor, en comparación con la cepa silvestre (**fig. 14**). No hay reportes de que en este plásmido existan genes de nodulación, y el crecimiento de esta cepa en medio mínimo es casi igual que el que se presenta en la cepa silvestre. Finalmente, a la cepa curada del plásmido "f" no se le hizo un análisis de secreción de factor, porque está reportado (Brom *et al*, 1992), y comprobamos, que no crece en medio mínimo.

Dado que la cepa curada del plásmido "c" secretaba menos cantidad de factor de nodulación una vez que era inducido toda la noche, se procedió a analizar si existía también un retardamiento de este fenómeno a tiempos cortos, ya que Cárdenas y colaboradores (Cárdenas *et al*, 1996) habían reportado que al usar mutantes de *nodI* o *nodJ* en *Rhizobium etli* CE3 a tiempos cortos, la cantidad de factor secretado al medio era menor que cuando se tenían los genes silvestres. Realizamos un análisis comparativo de la secreción de FN's entre la cepa silvestre y la curada del plásmido "c" (CFNX184) a tiempos cortos, observándose que la cepa silvestre comienza a secretar factor a las 4 h y alcanza un máximo a las 12 h, mientras que la cepa CFNX184 secreta factor a partir de las 7-8 h, y en mucho menor cantidad que la cepa silvestre (**fig. 15**).

4.- COMPLEMENTACION DE LA CEPA CFNX184 CON EL GEN *nodT* DEL PLASMIDO c O CON EL DE CROMOSOMA.

Si el efecto que se observa en la cepa CFNX184, de disminución y retardo en la secreción de factor, es causado por la ausencia de la copia del gen *nodT* del plásmido c, al complementar a la cepa curada del plásmido "c" con el fragmento de 4 kb que tiene el gen *nodT* faltante, debería observarse un aumento en la cantidad de factor que esta cepa secreta.

Para analizar esto, se procedió a subclonar el fragmento de 4 kb en el vector de expresión pMP2750, el cual lleva un sitio de clonación múltiple y además el promotor del gen *nodA* que se induce con naringenina, formandose la construcción denominada pMP2750-4. En este mismo vector también se subclonó el fragmento de 2.2 kb *Bam* HI-*Hin* dIII que lleva la copia del gen *nodT* de cromosoma, para formar la construcción pMP2750-2.2 (**fig. 16**). La orientación de los fragmentos fué la adecuada para que el promotor de *nodA* influyera en la transcripción de los genes.

Tanto el vector solo, como el que llevaba las dos construcciones, se introdujeron en la cepa CFNX184 por medio de una crucea triparental. A las transconjugantes seleccionadas se les extrajo DNA total para corroborar si llevaban dentro las construcciones de interés mediante una hibridación tipo Southern, usando como sonda el mismo vector de expresión. Una vez que se

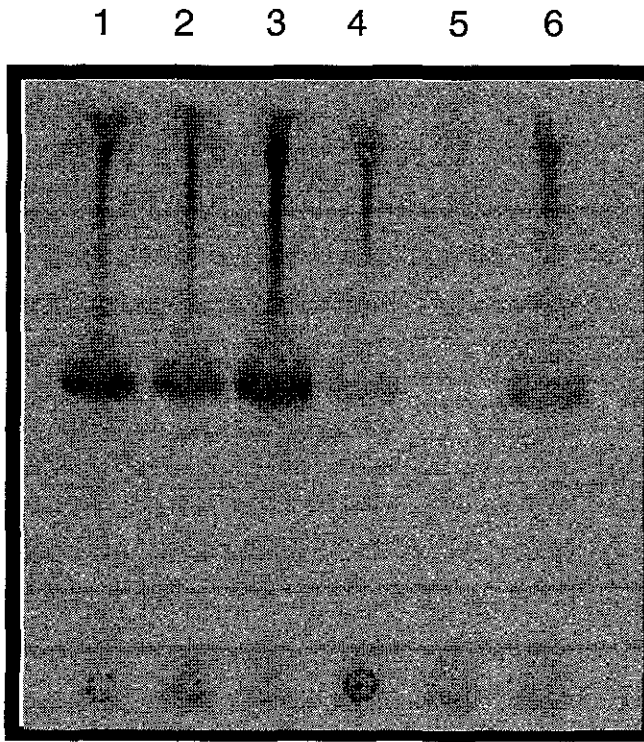


FIG. 14.- Excreción de factores de nodulación, producidos con glucosamina marcada con ^{14}C , al medio de cultivo y analizados por Cromatografía en Capa Fina. 1) *R. etli* CEPA CE3; 2) CFNX182(pa-); 3) CFNX183(pb-); 4.-CFNX184(pc-), 5.- CFNX89(pd-) y 6.- CFNX185 (pe Δ)

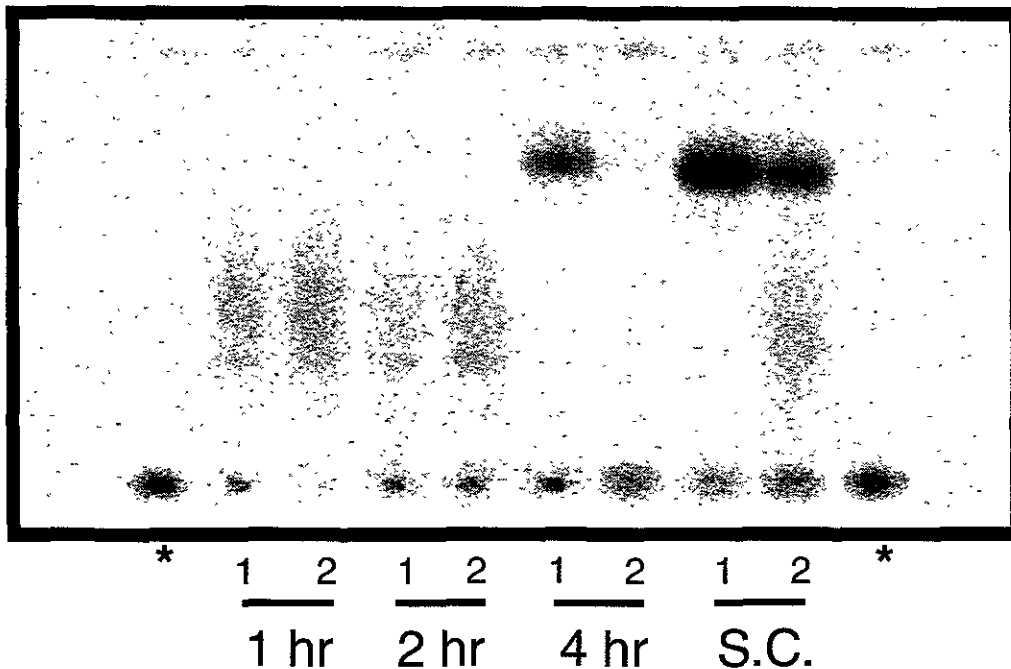


FIG. 15.- Cromatografía en Capa Fina de Factores Nod producidos con glucosamina marcada con ^{14}C y secretados al medio de cultivo a tiempos cortos. 1).- *R. etli* CEPA CE3; 2).- *R. etli* CEPA CFNX184(pa-); *- *R. etli* CFN2001(pa- y pSym-); S.C.)- Sobrecrecido

seleccionaron las cepas, estas se crecieron en medio B- a una densidad óptica de 0.3 a 600 nm de λ , para después diluir a todas a la misma densidad óptica en medio B- con inductor (naringenina), y glucosamina marcada con ^{14}C como precursor de los FN's. Al hacer una extracción de FN's en el medio, se vió que no hubo complementación, ya que las cepas secretaban la misma cantidad de factor (datos no mostrados).

Para eliminar la posibilidad de que existieran elementos en la secuencia que se localiza corriente arriba del gen *nodT* de plásmido c, que interfirieran en la expresión, se subclonó un producto de PCR de 1625 pb conteniendo a *nodT* del plásmido c, utilizando la siguiente estrategia: se mandaron a hacer dos oligonucleótidos con las siguientes secuencias:

PRIMERO *nodT*GTG-*Eco* RI: 5' CGATCCGAATTCAGAAGGCTTGCCCGTG 3'

PRIMERO pc lower-*Bam* HI: 5' AGGTGGGATCCCCCTTTGCCGCCAGTCCCG 3'

Ambos primeros incluyen una secuencia para un sitio de restricción, en el caso del primero A, ésta es *Eco* RI y el B *Bam* HI, los cuales no están en la secuencia del templado. Además el primero A está diseñado para eliminar el promotor σE y sólo abarca al sitio de unión a ribosoma y el GTG con que inicia el *nodT* de plásmido c. Usando la reacción en cadena de la polimerasa, se amplificó un producto de 1652 pb que llevaba el gen *nodT* del plásmido c. Este producto, digerido con las enzimas *Eco* RI y *Bam* HI, fué subclonado en el pMP2750, que había sido digerido con las mismas enzimas. Con la reacción de ligación se realizó una transformación de células competentes y se aislaron las transformantes con el marcador de resistencia espectinomomicina y posteriormente se realizó una hibridación en colonia para aislar una sola clona a la que se denominó pMP2750-38 (fig. 17). Para corroborar la fidelidad del producto de PCR, se aisló DNA plasmídico de esta transformante y se realizaron reacciones de secuencia con los primeros. Sin embargo, estas no dieron reacciones de secuencias definidas, por lo que el plásmido fue digerido con *Pst* I, ya que hay tres sitios en el fragmento esperado, y estos se encontraban efectivamente presentes. Este análisis de restricción también nos permitió definir que el producto se había clonado en la orientación adecuada. Con esta clona realizamos una complementación de la cepa CFNX184 (CFNX184-38). Un análisis comparativo de secreción del factor Nod entre la cepa silvestre, la CFNX184 y la complementada, no mostró ningún cambio entre la curada del plásmido c y la complementada con el producto de PCR (fig. 18).

5.- MUTAGENESIS DEL GEN *nodT* DE CROMOSOMA

Otra estrategia que nos planteamos para definir el papel de los genes *nodT* en la secreción del factor de nodulación, fue la de mutagenizar la copia

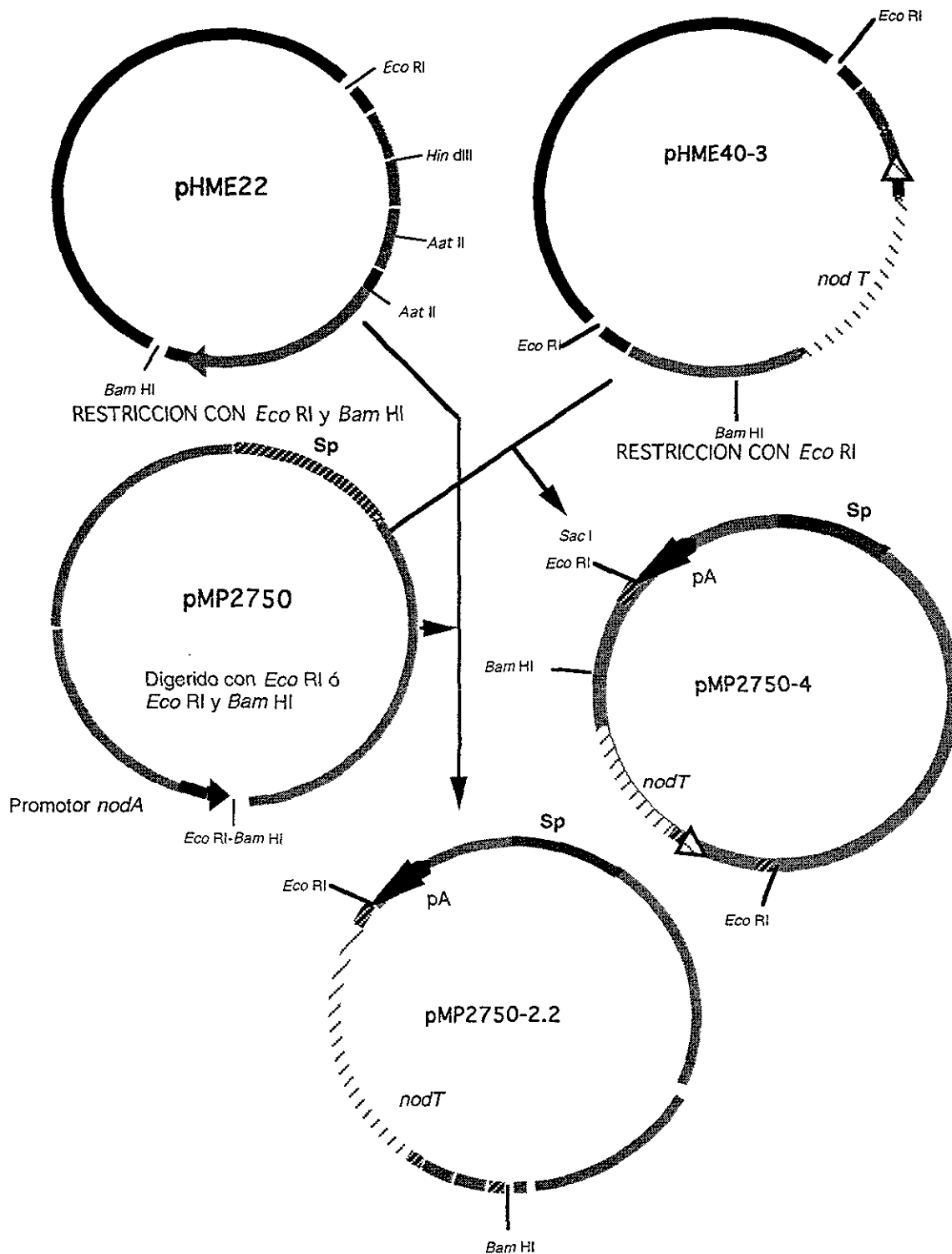


Fig. 16.- Esquema que representa las subclonaciones del *nodT* de plásmido c y de cromosoma en el plásmido pMP2750.

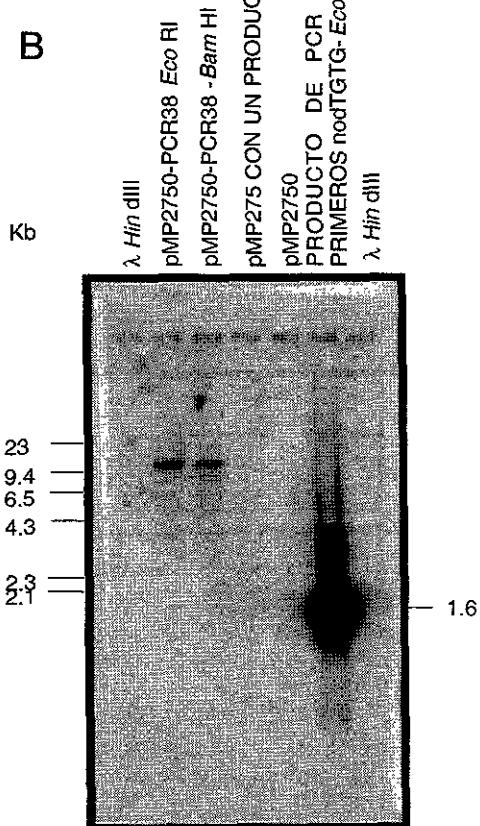
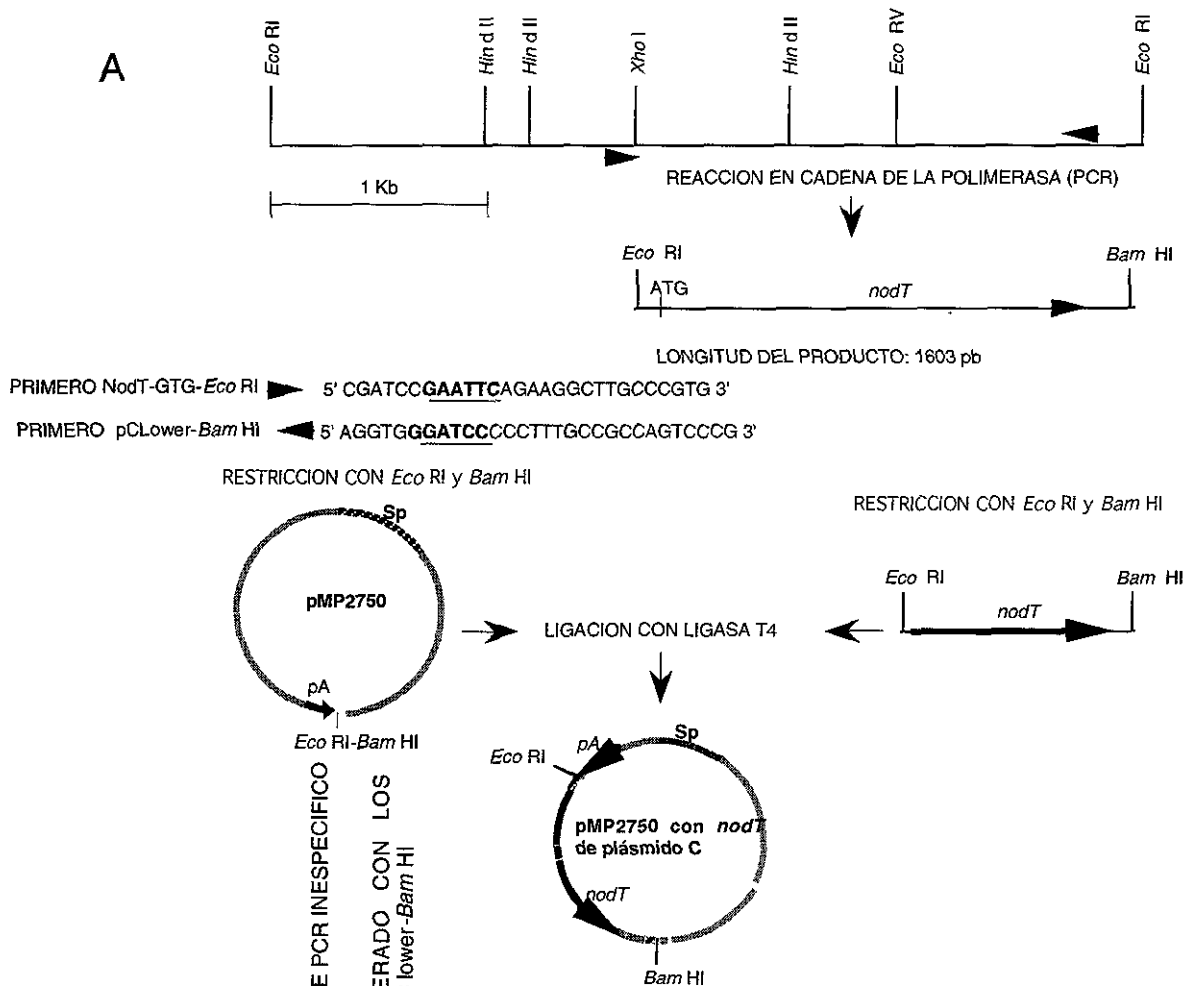


FIG. 17.- A) Esquema que representa la estrategia para obtener el gen *nodT* aislado del plásmido *c* por PCR y su posterior subclonación en el vector de expresión pMP2750 que lleva el promotor del gen *nodA* de *R. leguminosarum* bv. *viciae*.

B) Hibridación tipo Southern sobre DNA de diferentes clonas que se obtuvieron de la estrategia desarrollada en A, usando como sonda un fragmento de 1.8 kb *Eco* RI-*Hin* dIII, que lleva el gen *nodT* de cromosoma de *R. etli*.

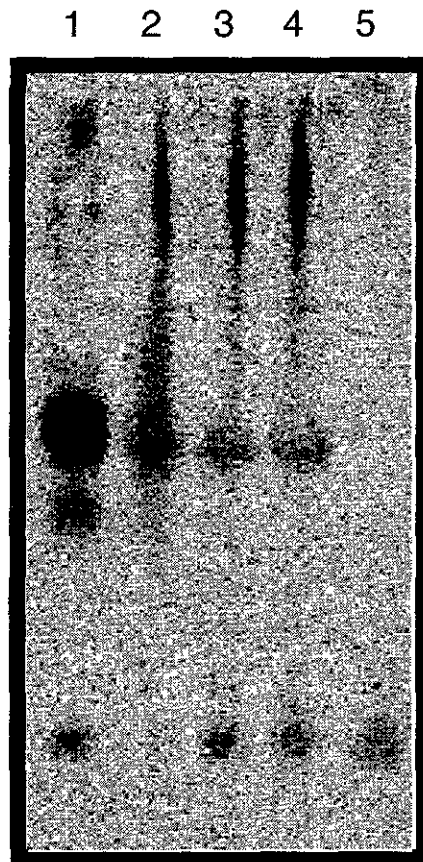


Fig. 18.- Análisis por cromatografía en capa fina de secreción de LCO's al medio de cultivo, producidos con glucosamina marcada con ^{14}C .
LINEA 1.- *R. etli* CEPA CE3; 2.- CFNX184 (pc-); 3.- CFNX184-pMP2750/38 (PCR *nodT* en pc) Y 4.- CFNX184-pMP2750
5.- CFN2001 (pa-, pSym-)

presente en el cromosoma, esquematizado en la fig. 19. Para lograr esto se buscó encontrar un sitio de restricción apropiado que nos permitiera insertar un cassette de resistencia a un antibiótico. El pHME22 presenta dos sitios para la enzima *Aat* II, separados por ± 300 pb dentro del gen *nodT*. Para generar un gen *nodT* mutado, el pHME22 digerido con *Aat* II se ligó con cassette de Cm^{R} obtenido del pCAT19, como se describe en materiales y métodos. El *nodT* interrumpido por el cassette Cm^{R} , se subclonó en pJQ200SK. Este vector lleva además un sitio de movilización *mob*, un gen de resistencia a gentamicina y el gen *sacB*, el cual se induce en presencia de sacarosa, expresando la proteína Levan sacarosa, la cual es tóxica en bacterias Gram negativas. Con esta clona se realizó una cruce triparental usando como vector de ayuda el pRK2013, para meter este plásmido en *R. etli* cepa CE3 y en la cepa CFNX184 y se seleccionaron dobles recombinantes donde el gen *nodT* silvestre fuera reemplazado por el que lleva la inserción. Estas clonas fueron sometidas a una extracción de DNA total, el cual se digirió con *Eco* RI y este DNA fue sometido a una hibridación Southern para checar que efectivamente el cassette se había insertado en *Rhizobium*. Para evitar una morfología excesivamente mucosa que normalmente observamos en la presencia de sacarosa, este compuesto se retiró después de inducir el evento de doble recombinación. Sin embargo, hasta el momento no ha sido posible detectar algún cambio en la altura de los fragmentos, por lo que no se puede determinar si se logró la mutagénesis. Este proceso ha sido reportado anteriormente como un buen sistema de mutagénesis sitio dirigida.

6.- EXPRESION DE LA PROTEINA NodT EN *Rhizobium etli* CE3, CFNX184 Y CFNX184 COMPLEMENTADA CON *nodT* DEL PLASMIDO c

Con el objeto de determinar si la proteína NodT se está expresando en *Rhizobium etli*, se utilizó un antisuero anti-NodT cortesía del laboratorio del Dr. Downie. *Rhizobium etli* CE3, CFNX184, y CFNX184-38 fueron crecidas por 24 h en 3 ml de medio PY con o sin el inductor naringenina a $4 \mu\text{M}$. Las células se centrifugaron a 14,000 rpm en tubos eppendorf de 1.5 ml de volumen, se lavaron con MgSO_4 10 mM, se resuspendieron en 400 μl de TE 50:20 y se sonicaron a 20 V. Las muestras se centrifugaron nuevamente para separar la fase citosólica de la transmembranal y ambas se mezclaron con una solución de Laemmli 2X, se hirvieron a 95°C por 5 min y se corrieron en un SDS-PAGE al 10% a 20 mA de corriente constante. Una parte se tiñó con azul de Comassie y la otra se transfirió a una membrana de nitrocelulosa Hybond C para realizar una reacción de tipo Western con el antisuero anti-NodT (fig. 20). Observamos que NodT se conserva en la parte membranal y no en la

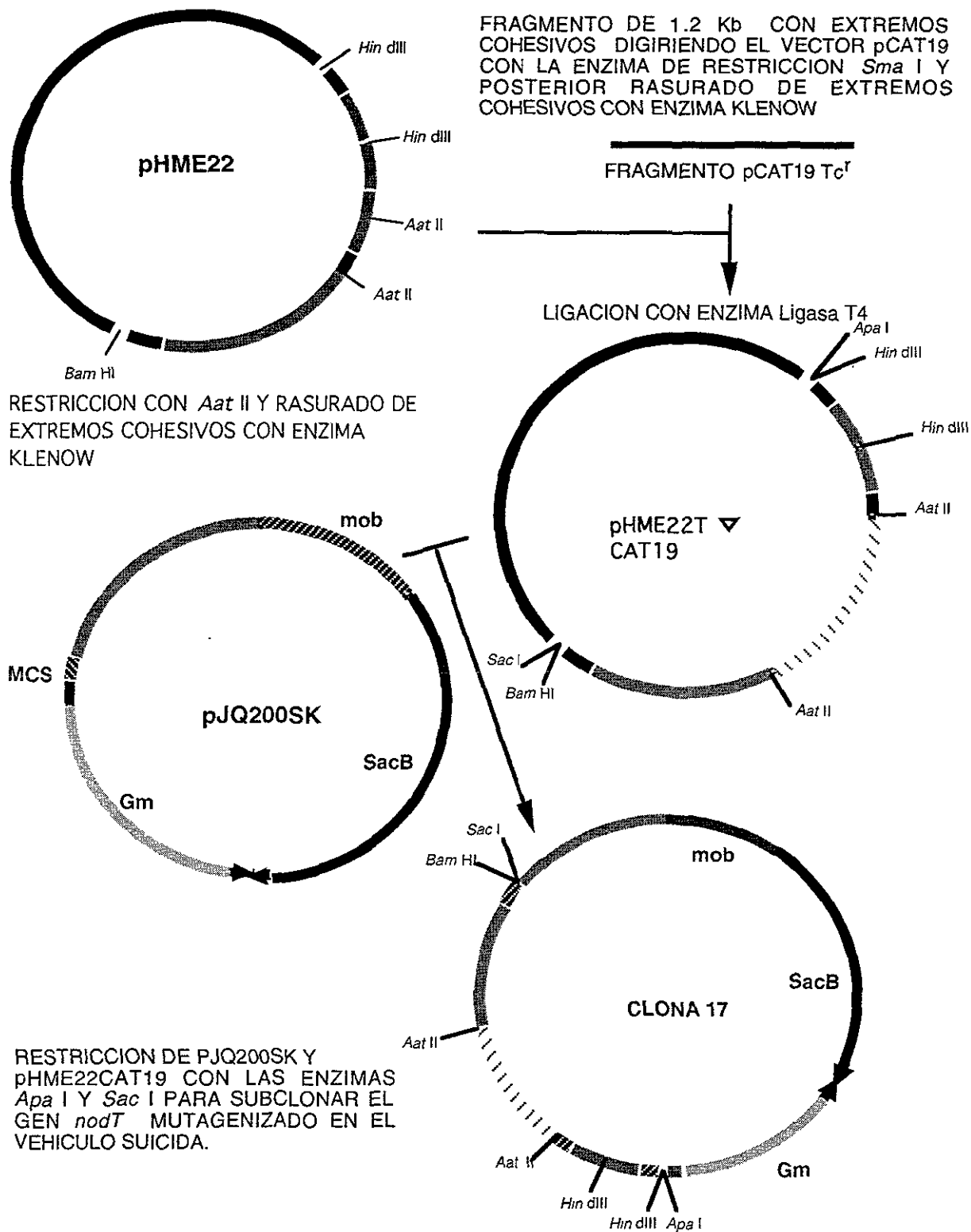


Fig. 19.- Esquema representando los diferentes pasos de subclonación para poder insertar el frgamento de CAT19 con el cassette de resistencia a cloranfenicol en el gen *nodT*, y la subclonación de esta construcción en el vehículo suicida pJQ200SK, para obtener la construcción Clona17

citósica, y además sólo se observó una sola banda, indicando que sólo se está expresando una sola copia, que no es posible detectar diferencias entre las dos proteínas en una sola dimensión, que el anticuerpo sólo reconozca un apteína, o que se esté expresando una de las copias en las condiciones de laboratorio en las que trabajamos.

Con el propósito de detectar las dos presuntas isoformas de NodT, se realizó un gel de doble dimensión usando anfolinas con un espectro de pH de 4.0 a 6.5, o de 4.0-8.0. Se detectó una sola isoforma con un pI de 5.9-6 que comigra con la banda de 50 kb que reacciona con el antisuero anti-NodT en la cepa silvestre y en la cepa CFNX184 (fig. 21 A y B) lo que indica que esa isoforma corresponde al producto del gen *nodT* de cromosoma, o que las dos isoformas comparten tanto el peso como el punto isoelectrico, por lo que aún no se puede determinar si esa isoforma corresponde al producto del gen *nodT* del plásmido *c* o al que muy probablemente esté en cromosoma.

Para saber si el producto de PCR subclonado en el pMP2750 se está expresando, se analizó la cepa CFNX184-38, pero sólo se observa la misma isoforma, por lo que no se puede demostrar que el producto de PCR este produciendo a la proteína deseada. (fig. 21 C)

7.- SECUENCIACION DE LOS GENES *nodT* *R. etli* CEPA CE3

Secuenciamos las dos copias de *nodT* de *Rhizobium etli*. Para secuenciar el *nodT* de cromosoma, se subclonó un fragmento de 2.2 kb del pLAFR 3-55 en pSK+ generando el pHEM22 (fig. 22) La secuenciación se realizó por el método de Sanger *et al* (Sanger *et al*, 1977) como se describe en materiales y métodos. Las lecturas de secuencia que se obtuvieron de este fragmento (aprox. 200 pb de cada lado) fueron comparadas con las secuencias del banco de datos del GeneBank, sin que se encontrara similitud con secuencias reportadas que tuvieran identidad con *nodT*, a pesar de que la señal de hibridación era intensa. Esto hizo suponer que el fragmento era demasiado grande y que la secuencia que tenia similitud con el gen *nodT* debiera encontrarse hacia el interior del fragmento. Se obtuvo una delección de 400 pb del pHEM22 al escindir un fragmento *Hin* dIII, generando el pHEM18. (fig. 22). Esta construcción se uso para hacer reacciones de delecciones y de secuencia. Las lecturas obtenidos se complementaron para dar finalmente la secuencia completa del fragmento de 1.8 kb. En la secuencia obtenida se observó un marco de lectura abierto con una identidad de 60 a 86 % con los genes *nodT* reportados.

El fragmento de 4 kb *Eco* RI, se subclonó en pSK+. Las construcciones resultante se denominaron pHEM40-3 y pHEM40-7. La diferencia entre ambas era su orientación, la cual se determinó al hacer un mapa de restricción

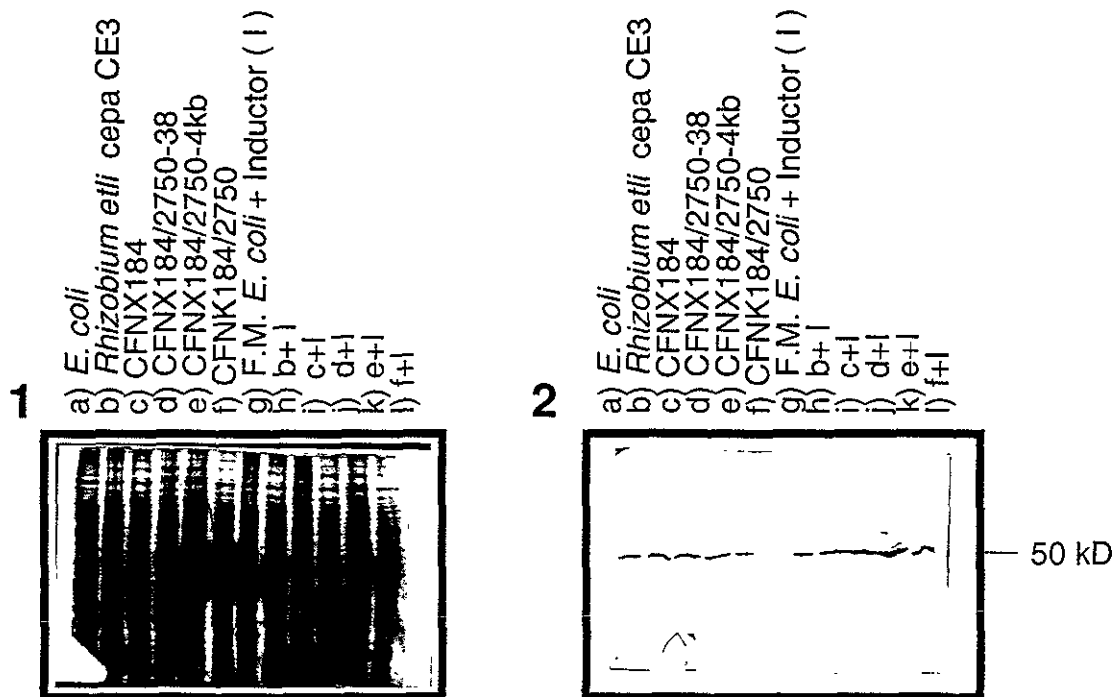


Fig. 20.- Análisis de las proteínas que se localizan en la fracción membranal de *Rhizobium etli* y de *E. coli* para localizar a la proteína NodT.

1) Gel de SDS-PAGE al 10% teñido con azul de comassie.

2) inmunodetección con un antisuero anti-NodT de las mismas muestras del panel 1.

Inductor (I).- naringenina

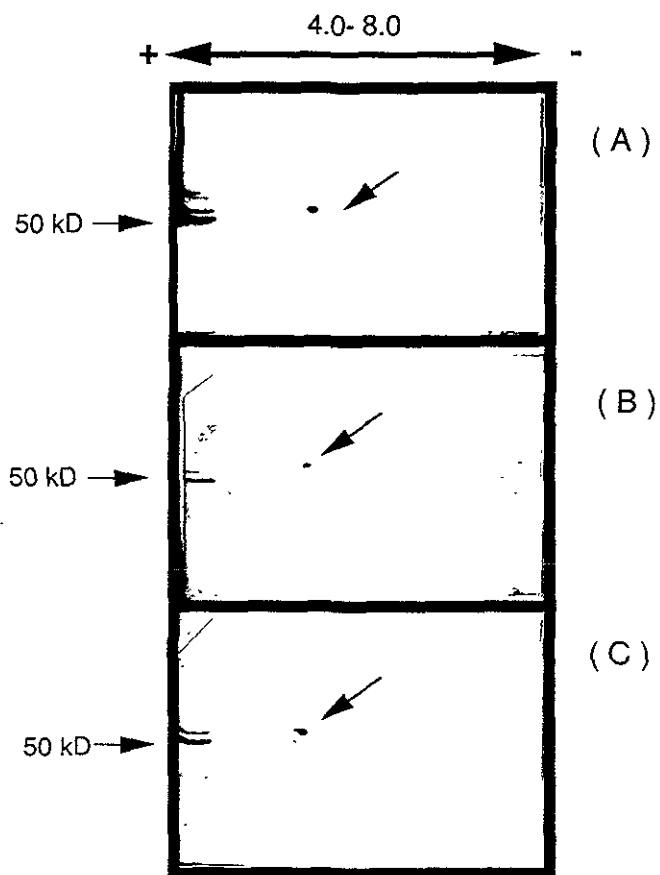


Fig. 21.- Inmunodetección con un antisuero anti-NodT en geles de doble dimensión con la fracción membranal de diferentes cepas de *Rhizobium*:

(A).- *Rhizobium etli* CE3

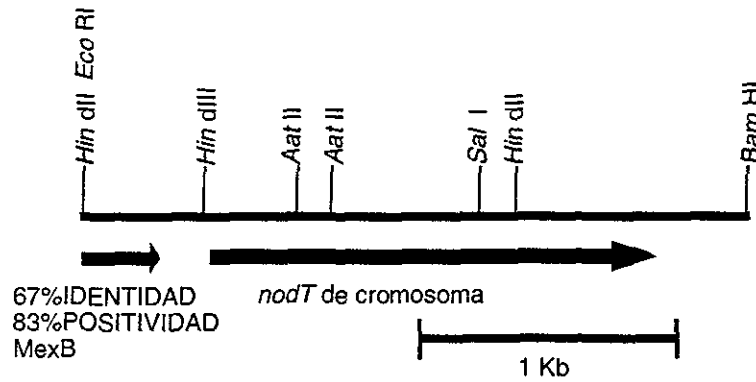
(B).- *Rhizobium etli* CFNX184

(C).- CFNX184/2750-38 + Inductor.

donde se observó que el fragmento presenta 3 sitios para la enzima *Hin* dII. El pHME40-3 fue cortado con *Hin* dII, lo que dejó unido al pSK+ el fragmento de 1.6 kb *Eco* RI-*Hin* dII, y al religarse se formó la construcción pHME40-1.6. El fragmento *Hin* dII-*Hin* dII de 1.2 kb fue purificado y subclonado en el pSK para formar el plásmido pHME40-1.2(Fig. 23). Al comparar la secuencia total obtenida de estos dos fragmentos con las reportadas en el GeneBank, se observó una identidad del 60 al 65% con otros genes *nodT* reportados, así como un muy probable sitio de unión a ribosomas, separado por siete pares de base de un triplete GTG, el cual se ha observado que puede ser usado, con menor frecuencia que ATG, como el sitio de inicio de un gen en procariontes, y codificando para una metionina cuando realiza esta función.

Un fragmento de 1 kb obtenido del fragmento de 4 kb original, fue clonado en pSK y se mandó a secuenciar a una casa comercial, que utilizó el método de la Thermosequenasa en una máquina de PCR y con la utilización de nucleótidos marcados con fluorescencia. La secuencia se leyó en un cromatograma y para hacer las reacciones se utilizaron análogos de los primeros T3 y T7 que se usan normalmente con el pBluescriptII/SK. Aproximadamente las primeras 400 pb de cada lado son confiables, pero después comienzan a aparecer inespecificidades y errores en la lectura, por lo que no se tiene una secuencia confiable de esa zona. Este fragmento no da señal con una hibridación Southern con el gen *nodT* usado como sonda, por lo que no se realizaron reacciones de delecciones y secuencia en nuestro laboratorio para corregir las inespecificidades, sin embargo se observa que un extremo presenta una alta identidad con el extremo carboxilo terminal de *cpxR* y con corriente abajo existe identidad significativa con el extremo amino terminal del gen *cpxA* de *E. coli*, y ambos genes forman un sistema de transducción de señales de dos componentes que responde a condiciones de estrés calórico y osmótico. En el inicio de la secuencia del fragmento de 2.6 kb que reportamos, se observa una alta identidad con el final de *cpxA*, por lo que parece ser que este sistema de dos componentes se halla corriente arriba de la copia de *nodT* de plásmido c (fig. 23 B).

A



B

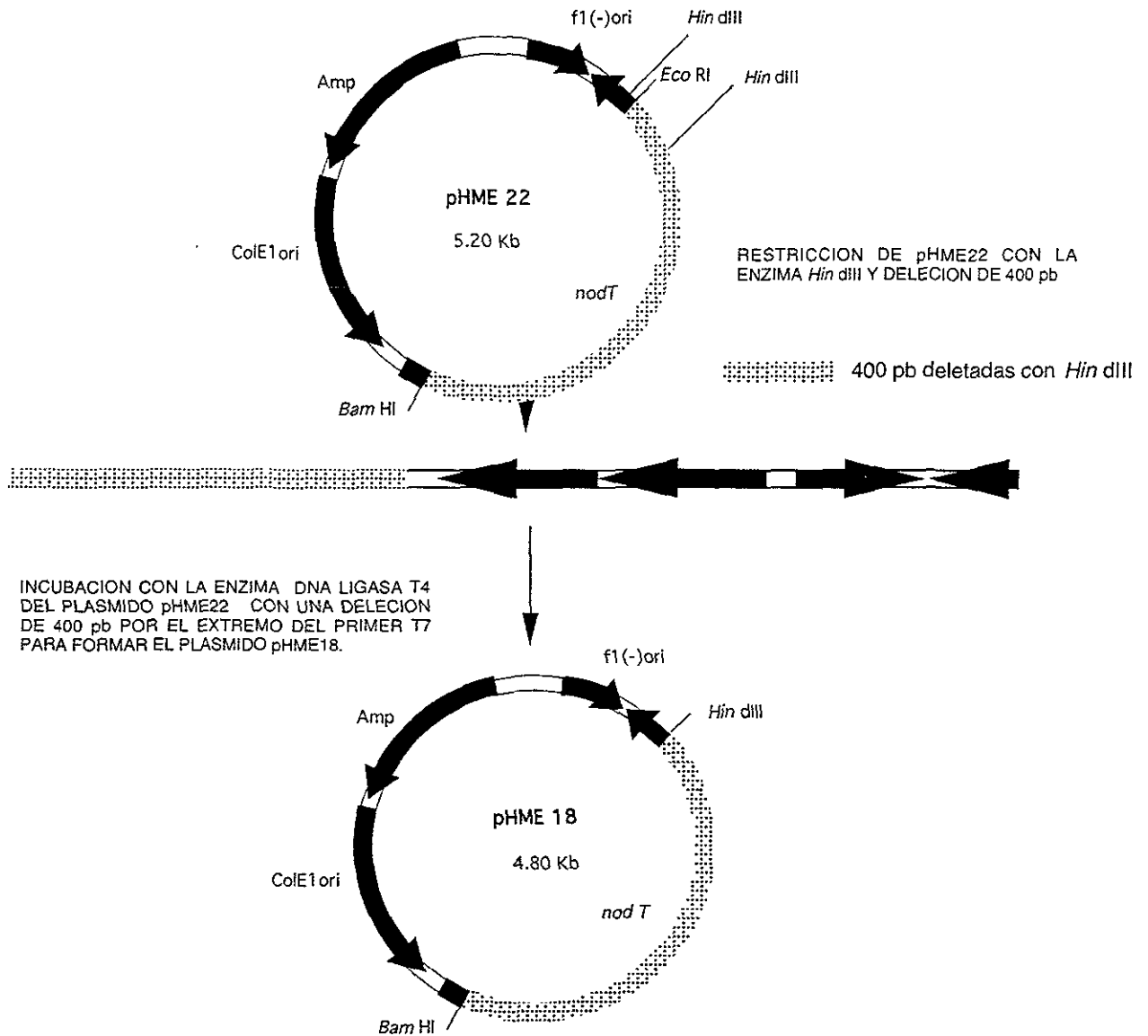


Fig. 22.- Ubicación física y clonación del gen *nodT* de cromosoma.

A).-Mapa físico del fragmento de 2.2 Kb, donde se ubican la disposición de los genes y de los sitios de restricción.

B) Esquema que representa los diferentes eventos que se requirieron para crear el pHME22 y el PHME18 donde va el gen *nodT* de cromosoma.

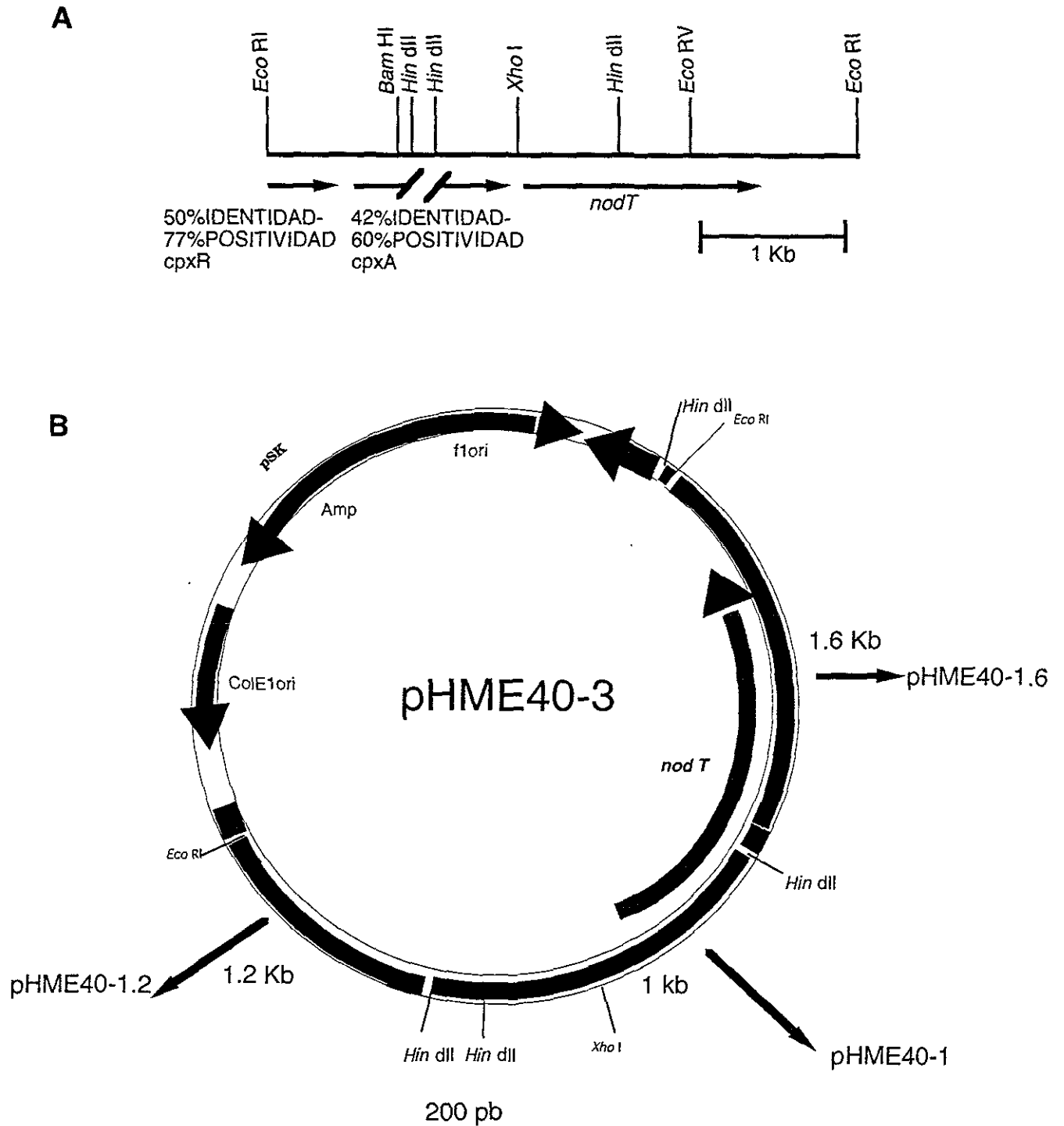


Fig. 23.- Ubicación física y clonación del gen *nodT* del plásmido **c**

A).- Mapa físico del fragmento de 4 Kb donde se muestran la disposición de los genes que se localizaron por secuencia.

B) Esquema donde se observa el pHME40-3, y donde se señalan los fragmentos de restricción que se obtuvieron al digerir con *Hin dII*, los cuales se subclonaron en pSK para dar lugar a la formación de pHME40-1, pHME40-1.2 y pHME40-1.6

Tabla 4
 PORCENTAJE DE IDENTIDAD DE LOS GENES *nodT* DE *Rhizobium etli* CEPA CE3 Y DE LAS BIOVARIEDADES DE *R. leguminosarum* EN ALINEAMIENTOS POR SEPARADO

<i>nodT</i>	<i>trifolii</i>	<i>viciae</i>	<i>phaseoli</i>	<i>nodT</i> Crom	<i>nodT</i> pIC
<i>trifolii</i>	100	59	58	62	56
<i>viciae</i>	59	100	61	62	61
<i>phaseoli</i>	58	61	100	80	65
<i>nodT</i> Crom	62	62	80	100	64
<i>nodT</i> pIC	56	61	65	64	100

Tabla 5
 PORCENTAJES DE IDENTIDAD DE LAS PROTEINAS NodT DE *Rhizobium etli* CE-3 Y DE LAS BIOVARIEDADES DE *R. leguminosarum* EN ALINEAMIENTOS POR SEPARADO

NodT	<i>trifolii</i>	<i>viciae</i>	<i>phaseoli</i>	<i>etli</i> Crom	<i>etli</i> pIC
<i>trifolii</i>	100	53	61	64	56
<i>viciae</i>	53	100	60	61	57
<i>phaseoli</i>	61	60	100	86	63
<i>etli</i> Crom	64	61	86	100	61
<i>etli</i> pIC	56	57	63	61	100

8.- ANALISIS DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS DE LOS FRAGMENTOS SUBCLONADOS

El alineamiento múltiple (Fig. 24) y las tablas 4 y 5 muestran el alto grado de identidad que se observa entre los diferentes genes *nodT* reportados y los obtenidos en el presente trabajo.

Además de secuenciar la región que lleva el gen *nodT* de cromosoma, la secuencia completa del fragmento de 2.2 kb *Eco* RI-*Bam* HI, presenta las siguientes características en su secuencia nucleotídica y de aminoácidos que se resumen en la figura 25: usando el programa BLASTX que provee el programa computacional GCG, y que automáticamente traduce un fragmento de DNA en sus seis marcos de lectura para posteriormente buscar similitud de esos fragmentos traducidos en la base de datos Swiss-Prot, reportó que del nucleótido 1 al 289, se observa un marco de lectura abierto cuya identidad es del 67% (se alinean los mismos aminoácidos) y similitud del 83% (aminoácidos que no modifican las características de la proteína) con el extremo carboxilo terminal del gen *mexB* de *Pseudomonas aeruginosa*, el cual es un homólogo del gen *envD* de *E. coli*, involucrado en la regulación por hierro y posiblemente en la secreción de sideróforo pioverdina. MexB al parecer está participando en un complejo con otras proteínas que transportan múltiples drogas al exterior de la célula (Pool *et al*, 1996 a y b). Debajo de este ORF no se localiza ninguna región terminadora al utilizar el programa computacional TERMINATOR que también se encuentra en el paquete computacional GCG. Sin embargo, al usar un programa de análisis de secuencias promotoras (Rosenblueth *et al*, 1996), se localizó una secuencia que presentaba un sitio consenso -35 y otro -10, seguida por un nucleótido separado 10 pares de bases que muy probablemente sea inicio de la transcripción, localizada a 47 pb de un codon ATG que esta precedido 8 pb corriente arriba por la secuencia CAGGA que podría ser usado como un sitio de unión a ribosomas. El ATG marcaría el inicio de un marco de lectura abierto cuya secuencia, traducida a aminoácidos, presenta una similitud del 86 % con el gen *nodT* de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (fig. 24, tablas 4 y 5). La secuencia de aminoácidos presentaba el característico péptido señal de tránsito con una longitud de 17 aa (MVSLRFATPALLLLSGC) que presentan las lipoproteínas de membrana externa, según reportaron Wu *et al* en 1986, el cual tiene como características principales una secuencia rica en aminoácidos no polares, y al menos una Lys (K) o una Arg (R) entre los primeros 7 aminoácidos. Posteriormente tiene un sitio de procesamiento con una secuencia consenso L-(A,S, o V)-(G o A)-C que es reconocida por una peptidasa que es la SPAsa II (Prolipoproteína señal peptidasa II). En el sitio de corte -3 invariablemente se conserva una leucina, y en el sitio +1 se

	M-----VS -IRFETPAII LLLSGCVVGP ELVPPPMPLP AKRSGGKTKS	42
nodT vicia CDS1	M-----HS -FRLAADVLP LLLSGCVVGP DHAPPETPLP AKRSGGKTKS	42
Trans of nodT plasmC	VSTSLRFRIS SLRYAASALT LLLAGCVTGP DHVPPQMLP ANREBGGKKS	50
nodT trifo CDS1	M-----RFT -RYTTPFFFS LLLSGCVVGP NYAPPMMPLP AKRSGGKTKS	42
Consensus	M-----S -IRLAPPAL LLLSGCVVGP DHAPPETPLP AKRSGGKTKS	50
<hr/>		
Trans of nodT cromo	VGDVETAAAW EAFNDPKLNG YVQAEIDQNL SYQALAEIN AASANTVTEG	92
RLORF471 CDS1	DGDVETAAAW EAFKDSKNG YVQAEIDQNL SYQALAEIN AASANTVTEG	92
nodT vicia CDS1	AGDVAVSAW DSFSDRLTNG YVASELDEML SYQALAEIN AASANTVTEG	92
Trans of nodT plasmC	NGDVVTAAW FAYRDKPLDG LYTHGIRENL SYQALAEIN AASANTVTEG	100
nodT trifo CDS1	NGDVVVAW EAFNDPMLTS YVQAEISQNL SYQALAEIN AASANTVTEG	92
Consensus	GVATAAW EAF...LNG YV...EIDQNL SYQALAEIN AASANTVTEG	100
<hr/>		
Trans of nodT cromo	EGLEPLTVG GGRMVSGOR GELRTQFDTR NTAGDVQIS WLLDFPQVW	142
RLORF471 CDS1	EGLEPLTVG -AEQTVSGK AELRTQFDTR NTAGDVQIS WLLDFPQVW	141
nodT vicia CDS1	EGLEPK---- -AEHTTSGEI GKGGITSTQ NISSVQLSHT WLLDFPQVW	137
Trans of nodT plasmC	EGLEPLTVG A-EHTLSEK GRLRTVGT NTAGGEPSS WLLDFPQVW	149
nodT trifo CDS1	EGLEPLTVS G-SHTVSGK GKLRKQTYT NISGELSS WLLDFPQVW	140
Consensus	EGLEPLTVG ..SHTVSGK G.LRTQ... NIS.G..S WLLDFPQVW	150
<hr/>		
Trans of nodT cromo	RFTESALASL DSAYASADVA KLTLVQDEVS SYIDARYYQ RIAVSRANLK	192
RLORF471 CDS1	RFTESALASL DSAYASADVA KLTLVQDEVS SYIDARYYQ RIAVSRANLK	191
nodT vicia CDS1	RFTESALASL DSAYASADVA KLTLVQDEVS SYIDARYYQ RIAVSRANLK	187
Trans of nodT plasmC	RSRESALASL DSAYASADVA KLTLVQDEVS SYIDARYYQ RIAVSRANLK	199
nodT trifo CDS1	RFTESALASL DSAYASADVA KLTLVQDEVS SYIDARYYQ RIAVSRANLK	190
Consensus	RFTESALASL DSAYASADVA KLTLVQDEVS SYIDARYYQ RIAVSRANLK	200
<hr/>		
Trans of nodT cromo	SRQETVELK FQLEAGASR LDVVOAEGLY GSTLAIPQL RNTNIRVSAH	242
RLORF471 CDS1	SRQETVELK FQLEAGASR LDVVOAEGLY GSTLAIPQL RNTNIRVSAH	240
nodT vicia CDS1	SRQETVELK FQLEAGASR LDVVOAEGLY GSTLAIPQL RNTNIRVSAH	237
Trans of nodT plasmC	SRQETVELK FQLEAGASR LDVVOAEGLY GSTLAIPQL RNTNIRVSAH	249
nodT trifo CDS1	SRQETVELK FQLEAGASR LDVVOAEGLY GSTLAIPQL RNTNIRVSAH	240
Consensus	SRQETVELK .QLEAGASR .LDVVOAEGLY GSTLAIPQL R.NFR.SAH	250
<hr/>		
Trans of nodT cromo	IAELGLPAS ALVDELLKGS GQVFRGGIN SCIPADLRN RPIRIRARD	292
RLORF471 CDS1	IAELGLPAS ALVDELLKGS GQVFRGGIN SCIPADLRN RPIRIRARD	290
nodT vicia CDS1	IAELGLPAS ALVDELLKGS GQVFRGGIN SCIPADLRN RPIRIRARD	287
Trans of nodT plasmC	IAELGLPAS ALVDELLKGS GQVFRGGIN SCIPADLRN RPIRIRARD	299
nodT trifo CDS1	IAELGLPAS ALVDELLKGS GQVFRGGIN SCIPADLRN RPIRIRARD	296
Consensus	IAELGLPAS .LV..EL..G. GQVFRG.IN .CIPADLRN RPIRIRARD	300
<hr/>		
Trans of nodT cromo	LAAATANIGV AEAQLYPSIT LSGSISPSYI N-QRGHGL TPWSFGPTN	341
RLORF471 CDS1	LAAATANIGV AEAQLYPSIT LSGSISPSYI N-QRGHGL TPWSFGPTN	339
nodT vicia CDS1	LAAATANIGV AEAQLYPSIT LSGSISPSYI N-QRGHGL TPWSFGPTN	336
Trans of nodT plasmC	LAAATANIGV AEAQLYPSIT LSGSISPSYI N-QRGHGL TPWSFGPTN	349
nodT trifo CDS1	LAAATANIGV AEAQLYPSIT LSGSISPSYI N-QRGHGL TPWSFGPTN	340
Consensus	LAAATANIGV AEAQLYPSIT LSGSISPSYI N-QRGHGL TPWSFGPTN	350
<hr/>		
Trans of nodT cromo	LPIFDGGLR ANVSAQSDA ATALLNKST VLTAVEQVEN ALAVRRDAR	391
RLORF471 CDS1	LPIFDGGLR ANVSAQSDA ATALLNKST VLTAVEQVEN ALAVRRDAR	389
nodT vicia CDS1	LPIFDGGLR ANVSAQSDA ATALLNKST VLTAVEQVEN ALAVRRDAR	386
Trans of nodT plasmC	LPIFDGGLR ANVSAQSDA ATALLNKST VLTAVEQVEN ALAVRRDAR	399
nodT trifo CDS1	LPIFDGGLR ANVSAQSDA ATALLNKST VLTAVEQVEN ALAVRRDAR	390
Consensus	LPIFDGGLR ANVSAQSDA ATALLNKST VLTAVEQVEN ALAVRRDAR	400
<hr/>		
Trans of nodT cromo	TVAAALQAVK TTQETLELST ASYKDGASSL LDVLAQOVV SIAQASLAA	441
RLORF471 CDS1	TVAAALQAVK TTQETLELST ASYKDGASSL LDVLAQOVV SIAQASLAA	438
nodT vicia CDS1	TENSRRRQVE TIEEALKLST ASYKDGASSL LDVLAQOVV SIAQASLAA	436
Trans of nodT plasmC	TACAAAPAGA DCAIVALST ASYKDGASSL LDVLAQOVV SIAQASLAA	449
nodT trifo CDS1	TVRAKREVE IAQETLELST ASYKDGASSL LDVLAQOVV SIAQASLAA	440
Consensus	TV..AL..QV. T..ETL..LST ASYKDGASSL LDVLAQOVV SIAQASLAA	450
<hr/>		
Trans of nodT cromo	VQVAKDYVS LVAIGGSY - - - - -RP-GG KTTAPVTPAP AKAKS-	479
RLORF471 CDS1	VQVAKDYVS LVAIGGSY - - - - -AP-AQ N-----HRAS EAAKS-	471
nodT vicia CDS1	VQVAKDYVS LVAIGGSY - - - - -AP-AQ N-----HRAS EAAKS-	482
Trans of nodT plasmC	VQVAKDYVS LVAIGGSY - - - - -AP-AQ N-----HRAS EAAKS-	483
nodT trifo CDS1	VQVAKDYVS LVAIGGSY - - - - -AP-AQ N-----HRAS EAAKS-	467
Consensus	VQVAKDYVS LVAIGGSY - - - - -AP-AQ N-----HRAS EAAKS-	496

Fig. 24.- Alineamiento de las secuencias de proteínas NodT reportadas. El péptido señal, el tránsito característico de las lipoproteínas de membrana externa, la cisteína conservada en el de corte +1, y los dos motivos conservados en la región carboxilo terminal, están subrayados.

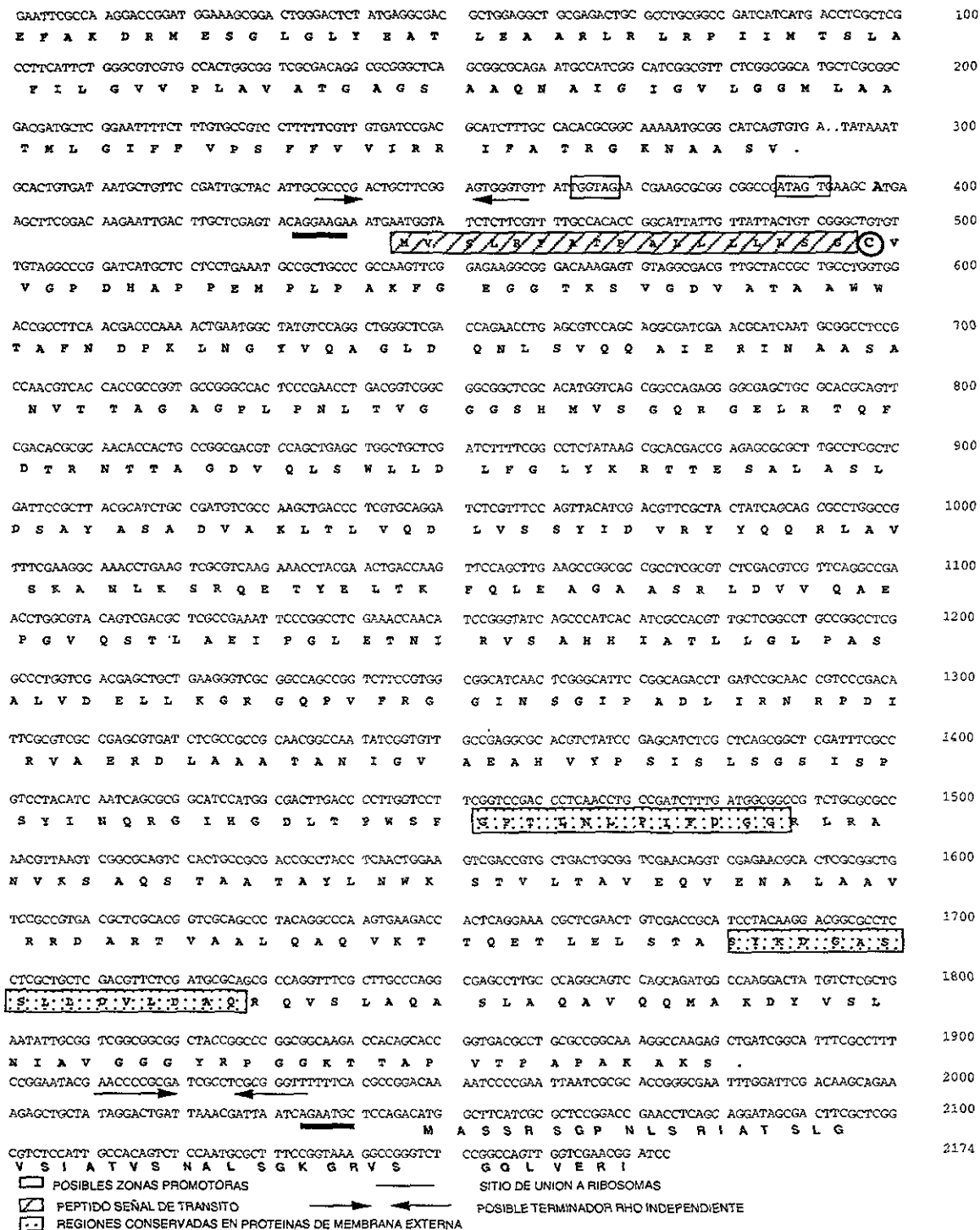


Fig. 25.- Secuencia nucleotídica y de aminoácidos del fragmento de 2.2 kb en el pHME22. Se observa el ORF que codifica para el gen *nodT* de cromosoma. Río arriba se observa el ORF codificando para el extremo carboxilo terminal del gen homólogo a *mexB*, y río abajo se encuentra el ORF que codificaría para el homólogo del *gemA*.

conserva siempre una cisteína a la que se le pega fosfatidilglicerol para formar una proteína con una glicerilcisteína en el extremo amino terminal. Posteriormente, en presencia de fosfolípidos, este residuo se vuelve a modificar para dar una glicerido-cisteína-lipoproteína, lo que se ha propuesto como una modificación que permite el anclado de estas proteínas a la membrana, además de permitir el reconocimiento de la prolipoproteína por la SPAsa II. Hacia el extremo carboxilo terminal se localizan dos regiones consenso muy conservadas entre proteínas membranales encargadas de funcionar en sistemas de transporte, y que se han propuesto como sitios de unión a proteínas transmembranales, ya que estos sitios también se han observado en este tipo de proteínas. Estos dominios serían:

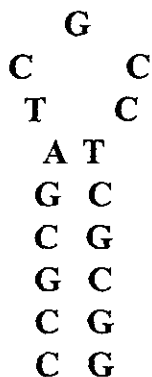
337-GPTLNLPFDGG-349 y 412-SYKDGASSLLDVLDAQ-429

(los números representan a los residuos que flanquean la secuencia). corriente abajo se observa un codón de termino, TGA, que codifica para la terminación OPALO, y posteriormente, a 17 pb, se localiza la secuencia:

CCGGAATACGAACCCCGCGATCGCCTCGCGGGTTTTTCACG

que tiene muchas características de un terminador de la transcripción Rho independiente, tomando en cuenta los parámetros del programa Terminator (fig. 26). El marco de lectura abierto presenta una longitud de 479 aminoácidos (1,437 pb), y lo proponemos como una de las copias homólogas de *nodT* en *R. etli*, con una localización cromosómica (Fig. 25).

Usando el programa BLASTX encontramos otro posible marco de lectura abierto corriente abajo de este ORF. Este nuevo ORF alcanza a codificar para 42 aa, pues posteriormente sigue la secuencia nucleotídica del sitio de clonación múltiple del vector, iniciando con un ATG que 8 pb hacia arriba presenta la secuencia AGAATG, la cual conserva cuatro de los seis nucleótidos que forman un sitio de unión a ribosomas. La similitud que presenta es de 53% y una similitud del 73% con la proteína Mall. Esta proteína es un activador transcripcional negativo, o represor, de los genes *malX* y *malY* de *E. coli*. Mall además regula su propia transcripción y se une a la maltosa, la cual viene actuando entonces como un inductor (Reidl *et al* 1989). (Fig. 25).



CCGGAATACGAACC GTTTTTTCACG

fig. 26.- Esquema que representa la estructura de tallo y asa que forma un terminador tipo Rho independiente corriente abajo de la copia de *nodT* de cromosoma.

Se hizo el análisis de las secuencias nucleotídicas de la región que lleva el gen *nodT* del plásmido *c* obtenidas a partir de los dos fragmentos provenientes del fragmento de 4 kb que hibrida con la sonda de *nodT* de *R. leg. bv. phaseoli*. Estas secuencias forman un fragmento de 2.6 kb *Eco* RI-*Hin* dII, con un sitio interno *Hin* dII y cuyas características que más adelante se detallan, se resumen en la figura 27. Además se secuenció un fragmento de 1 kb que se localiza 200 pb hacia arriba del frágmento de 2.6 kb. En el fragmento de 2.6 kb se localiza un ORF en los primeros 390 pb (5' a 3'), esto és, 179 aa más el codón de término, los cuales tienen una identidad del 39% y una similitud del 62% con el extremo carboxilo terminal del gen sensor de un sistema de dos componentes conocido como *cpxA*. Después del 16 pb corriente abajo, se localiza un codón GTG precedido por una secuencia Shine-Dalgarno a 7 pb de distancia. Si usamos este codón como un sitio de inicio, se obtiene un marco de lectura abierto de 483 aa más el codon de término, que tiene un nivel de identidad de aproximadamente 60% con los otros genes *nodT* reportados (Fig. 24, tablas 4 y 5). Con la copia que muy probablemente está en el cromosoma tiene una identidad del 61%. El péptido señal de tránsito presenta diferencias con el que reportamos para la copia de cromosoma. Está formado por 25 aa (MSTSLRTRASSLRYAASALTL~~LL~~AGC), ocho más que el *nodT* de cromosoma. Los péptido señal de este tipo no presentan una secuencia consenso, pero como se explicó anteriormente, tienen residuos que son específicos y en su mayoría son no polares, aunque debe de haber al menos una K (Lys) o una R (Arg) en los primeros siete aa. En este caso, el péptido señal conserva tres argininas en los primeros 13 aa, pero después sigue una secuencia de 9 aa que son no polares. También se conservan la Leucina en la posición -3, y la cisteína en la posición +1. Ambos aminácidos

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

BIBLIOTECA VT DE CIENCIAS
FÍSICO QUÍMICO
ESTO ES UN SEÑAL DE
ESTA TESIS DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

son invariables en los péptidos señal de tránsito de las lipoproteínas de membrana externa. Hacia el extremo carboxilo terminal, se localizan los dos dominios que se han reprotado para la familia de transportadores de membrana externa. La secuencia de estos dominios es:

344-GPSLNLPIFDGG-357 y 420-SYKDGASSLLDILDAQ-437

y estos dos dominios sólo varían con los de la copia de cromosoma en 1 aa cada uno. Después del codón 483 se localiza un codón TAA que codifica para una terminación OCRE (fig. 27) Se buscó alguna zona terminadora tipo Rho independiente después de este codon sin encontrarla. Una posible zona Rho dependiente se encuentra debajo de este codon, pero sólo abarca 50 pb, que es la distancia mínima para considerarse terminador Rho dependiente y su relación C=35%G=25% no es muy alta. Se supone que un buen terminador Rho dependiente necesita una relación de C=40% y G=14%.

Corriente abajo de esta zona no se localiza ningún marco de lectura abierto orientado de tal manera que el promotor sigmaE de *nodT* pudiera influir en su transcripción.

Hacia arriba de este ORF no se localizó una señal de término con el programa TERMINATOR, y el programa desarrollado por Rosenblueth y colaboradores (Rosenblueth *et al*, 1996) no localiza ninguna región reguladora. Sin embargo, estos programas fueron desarrollados para localizar secuencias promotoras del factor sigma 70 y terminadores con características muy bien definidas tipo Rho independientes. Al analizar la secuencia en esta región se observa esta lectura:

TGAtccTtatcgtgcCGCTA**gcacgCataCg**GATTTtcccaactttacagttTCTTAACCG
 donde se subrayan los nucleótidos de un posible sitio de término de la transcripción que está unido al codón de término de un posible ORF que codifica para un producto con una similitud del 42% y una identidad del 61% con la parte carboxilo terminal del gen *cpxA* (fig. 27), que es un miembro de un sistema regulatorio de dos componentes con *cpxR*. Si se usa la última base de este codón se forma, junto con los nucleótidos corriente abajo, una estructura de lazo y horquilla que presenta similitud con los terminadores Rho-dependientes (letras minúsculas en negritas y subrayadas). Esta zona se sobrelapa con un posible promotor tipo sigmaE (σ^E), que difiere por un solo nucleótido en la caja -35 con otro promotor σ^E que se localiza arriba de un gen que codifica para una proteína de membrana externa que todavía no ha sido caracterizada (Missiakas y Raina, 1998). Además de presentar el consenso en la caja -35 y -10 (letras itálicas mayúsculas y en negritas), la separación entre ambas cajas es de 16 pb, que es una distancia conservada en todas las cajas σ^E (fig. 28, Tabla 5). La actividad del factor σ^E es inducible por calor y su expresión se modula por la sobreexpresión de proteínas de membrana

son invariables en los péptidos señal de tránsito de las lipoproteínas de membrana externa. Hacia el extremo carboxilo terminal, se localizan los dos dominios que se han reprotado para la familia de transportadores de membrana externa. La secuencia de estos dominios es:

344-GPSLNLPIFDGG-357 y 420-SYKDGASSLLDILDAQ-437

y estos dos dominios sólo varían con los de la copia de cromosoma en 1 a cada uno. Después del codón 483 se localiza un codón TAA que codifica para una terminación OCRE (fig. 27) Se buscó alguna zona terminadora tipo Rho independiente después de este codon sin encontrarla. Una posible zona Rho dependiente se encuentra debajo de este codon, pero sólo abarca 50 pb, que es la distancia mínima para considerarse terminador Rho dependiente y su relación C=35%G=25% no es muy alta. Se supone que un buen terminador Rho dependiente necesita una relación de C=40% y G=14%.

Corriente abajo de esta zona no se localiza ningún marco de lectura abierto orientado de tal manera que el promotor sigmaE de *nodT* pudiera influir en su transcripción.

Hacia arriba de este ORF no se localizó una señal de término con el programa TERMINATOR, y el programa desarrollado por Rosenblueth y colaboradores (Rosenblueth *et al*, 1996) no localiza ninguna región reguladora. Sin embargo, estos programas fueron desarrollados para localizar secuencias promotoras del factor sigma 70 y terminadores con características muy bien definidas tipo Rho independientes. Al analizar la secuencia en esta región se observa esta lectura:

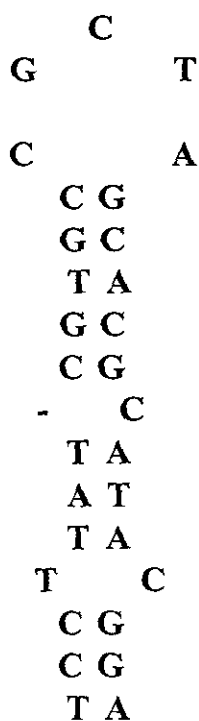
TGAtccTtategtgcCGCTAgcacgCataCgGATTTtccaactttacagttTCTTAACCG
 donde se subrayan los nucleótidos de un posible sitio de término de la transcripción que está unido al codón de término de un posible ORF que codifica para un producto con una similitud del 42% y una identidad del 61% con la parte carboxilo terminal del gen *cpxA* (fig. 27), que es un miembro de un sistema regulatorio de dos componentes con *cpxR*. Si se usa la última base de este codón se forma, junto con los nucleótidos corriente abajo, una estructura de lazo y horquilla que presenta similitud con los terminadores Rho-dependientes (letras minúsculas en negritas y subrayadas). Esta zona se sobrelapa con un posible promotor tipo sigmaE (σ^E), que difiere por un solo nucleótido en la caja -35 con otro promotor σ^E que se localiza arriba de un gen que codifica para una proteína de membrana externa que todavía no ha sido caracterizada (Missiakas y Raina, 1998). Además de presentar el consenso en la caja -35 y -10 (letras itálicas mayúsculas y en negritas), la separación entre ambas cajas es de 16 pb, que es una distancia conservada en todas las cajas σ^E (fig. 28, Tabla 5). La actividad del factor σ^E es inducible por calor y su expresión se modula por la sobreexpresión de proteínas de membrana

externa (Meccas *et al*, 1993), y se ha demostrado además que es un gen esencial. SigmaE es un factor sigma alternativo que controla la respuesta a estrés extracitoplásmico en *E. coli*. SigmaE es esencial a altas temperaturas, pero se pensaba que a temperaturas por abajo de 37°C no era requerido. Se ha demostrado que las células con ausencia del factor SigmaE que pueden crecer a bajas temperaturas, lo hacen debido a la presencia de una mutación supresora en *trans*, que se obtiene frecuentemente (De las Peñas *et al*, 1997).

Del fragmento de 4 kb, también subclonamos un fragmento de 1 kb *Eco* RI-*Hin* dII en pSKII (pHME40.1) que se localiza arriba de los fragmentos de 1.6 y 1.2 donde está el gen *nodT* de plásmido c (Fig. 23). Como se menciona anteriormente, el fragmento de 1.2 kb presenta un ORF que tiene similitud con el extremo carboxilo terminal de *cpxA*, por lo que se analizó la lectura de la secuencia comercial. Estas lecturas de secuencia son largas (+/- 650 pb), pero no son confiables, pues en los 300 pb que se sobrelapan en las lecturas de los dos lados, se observa que la similitud no es del 100%, sino que existen muchos sitios que no alinean. La lectura es confiable aproximadamente en las primeras 300 pb, por lo que esta secuencia se analizó con el programa BLASTX. Uno de los extremos presenta una identidad del 40% y una similitud de 55% con la parte central del gen *cpxA* en aproximadamente 600 pb. En el otro extremo se localiza otro ORF que tiene una identidad del 50% y una similitud del 60% con 400 pb del extremo carboxilo terminal del gen *cpxR*, que es el otro miembro del sistema regulatorio de dos componentes, y que además se encuentra en la misma orientación que el posible *cpxA* localizado más abajo (Fig. 27). Debido a los problemas con las lecturas en la parte central de este fragmento, no se localizó el inicio del marco de lectura abierto de *cpxA*, aunque todo indica que es muy probable encontrar este gen completo. Además existe un fragmento de 200 pb *Hin* dII-*Hin* dII que se ubica entre los fragmentos de 1 kb y de 1.2 kb que no se a subclonado y tampoco se ha secuenciado, y donde pensamos que se localiza una zona intragénica de *cpxA* (fig. 27).

TABLA 5.- SECUENCIA CONSENSO DEL POSIBLE PROMOTORE DE *nodT* DEL PLASMIDO C, COMPARADA CON LA DE *ompKP2* DE *E. coli*

GEN	CAJA -35	ESPACIO DE NUCLEOTIDOS	CAJA -10
<i>nodT</i>	GATTTT	16 pb	TCTTA
<i>ompKP2</i>	GAATTT	16 pb	TCTTA



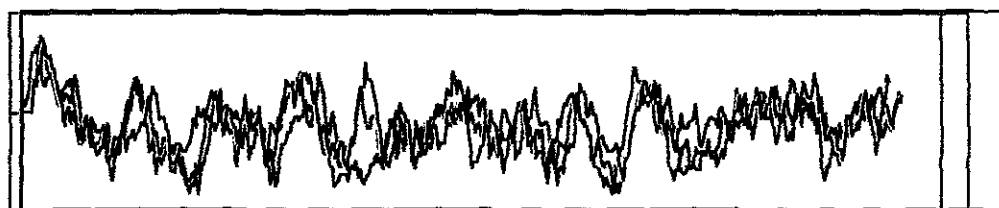
TGA TTTTCCCAACTTTACAGTTTCTTAACCG

Fig. 28.- Esquema que representa la estructura terminadora Rho independiente en la región intergénica *cpxA-nodT*

Se realizaron análisis de perfiles hidrópaticos, los cuales muestran los sitios hidrofóbicos e hidrofílicos a lo largo de la secuencia, usando el algoritmo de Kite y Doolittle (1982) y de perfiles anfipáticos (Eisenberg *et al*, 1982, a y b) de las diferentes secuencias de NodT. Se observa que los perfiles son prácticamente iguales entre todas las proteínas NodT reportadas. Además, esos perfiles se asemejan mucho al de proteínas de membrana externa con funciones de transporte de diversos compuestos, como TolC (α -hemolisina, colicinaV), PrtF (proteasas), AprF (proteasa alcalina), CyaE (ciclolisina), OprM y OprJ (exporte de drogas múltiples) (**fig 29**), y difieren con los de proteínas transmembranales que pertenecen a los sistemas de transporte con los que se relacionan las proteínas arriba mencionadas.

Se hicieron análisis filogenéticos con el programa Phylip, el cual desarrolló un árbol filogenético de acuerdo a los niveles de identidad entre secuencias y con valores que se les dan a cada cambio de aminoácido para determinar cuales son los más conservados y los que probablemente cambiaron por variaciones de nucleótidos (**fig. 30**), obteniéndose dos árboles, uno de tipo cladista y el otro sin pie, los cuales sugieren que las proteínas NodT evolucionaron como un grupo aparte en *Rhizobium*, pero que conserva algunas de las características de las proteínas de membrana externa.

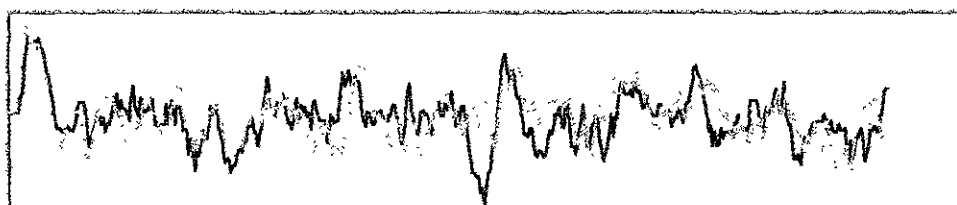
A



AprF PrtF TolC



NodT Trifolia NodT viciae NodT cromosoma NodT Plásmido C

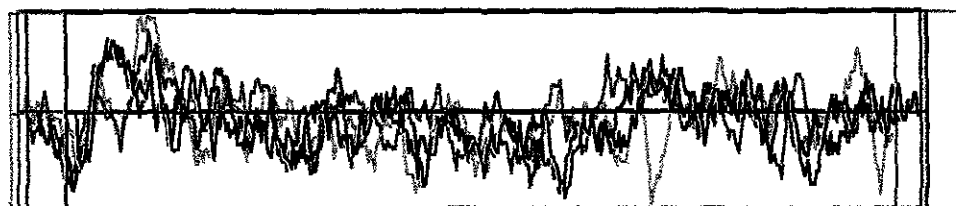


OprJ OprM



CyaE

B



HlyD CyaD PrtE AprE

FIG. 29.- A).-Análisis de los perfiles hidropáticos de las diferentes proteínas NodT reportadas, y las del presente trabajo, comparandolas entre ellas. Se esquematizan también los perfiles de los transportadores de membrana externa con los que NodT presenta similitud a nivel de secuencia.

B).- Sobreposición de los perfiles hidropáticos de las proteínas transmembranales con los que se ha propuesto que participan las proteínas de membrana externa.

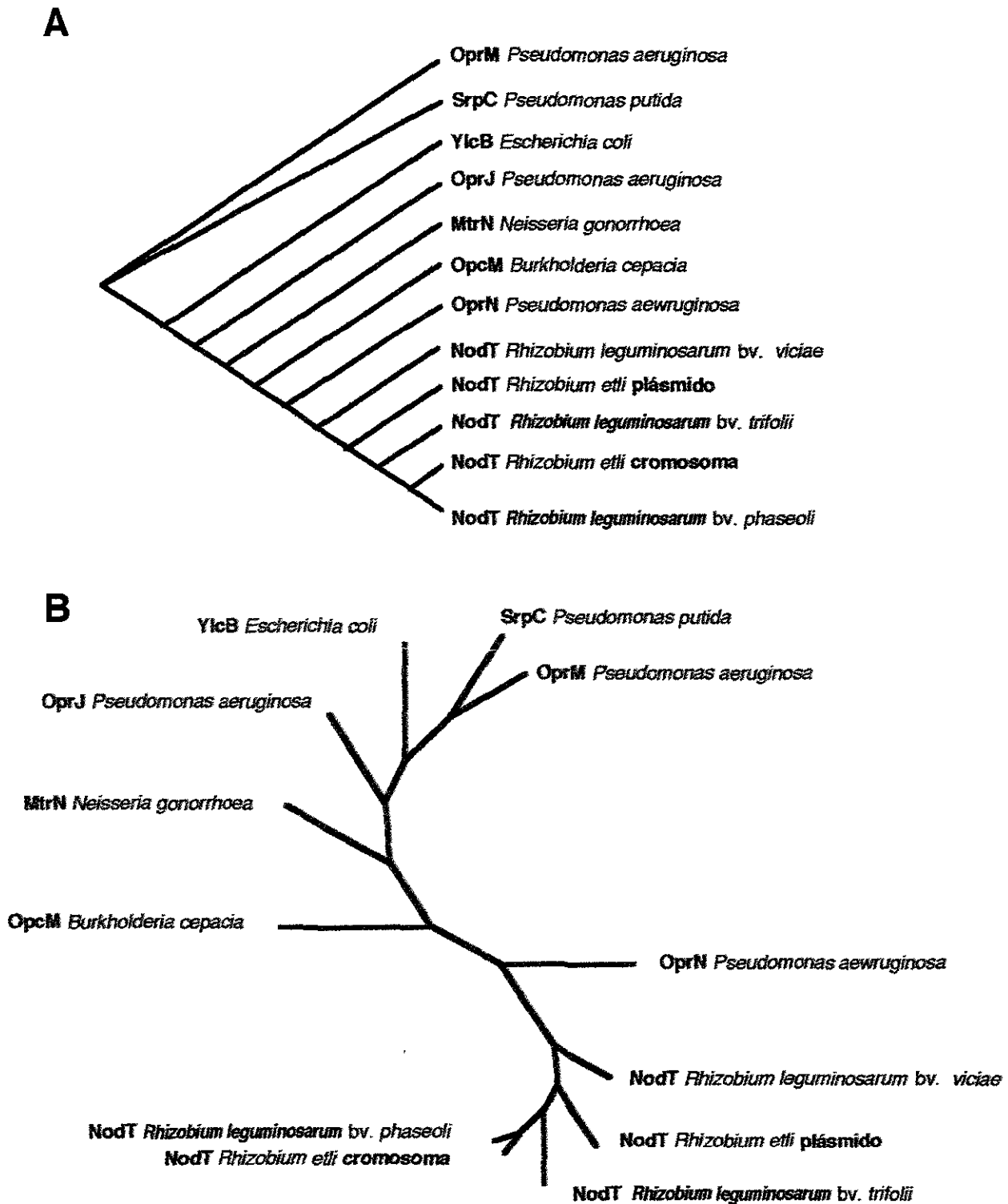


Fig. 30.- A) Cladograma que agrupa a los NodT reportados y las proteínas de membrana externa con los que se relaciona, por sus similitudes a nivel de secuencia
 B) Arbol sin pie, mostrando las relaciones evolutivas que existen entre NodT y las proteínas de membrana externa.

DISCUSION

En los estudios que se han realizado sobre *nodT* en *Rhizobium*, no se ha esclarecido el papel que este gen presenta en la nodulación o en algún otro proceso. Originalmente se le ha considerado gen de nodulación porque se localizó formando parte de operones con los genes de nodulación *nodABCDEFGHIJ* en *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, y con *nodMN* en *R. leguminosarum* bv. *viciae*. La inducción de la transcripción de estos dos operones es dependiente de NodD (Surin *et al* 1990).

Se sabe que los genes *nodIJ* participan en la secreción de los FN's (Cárdenas *et al*, 1996; Spaink *et al*, 1995), y se han propuesto como miembros de una familia de transportadores tipo ABC, donde NodI sería una proteína de membrana interna con un sitio de unión a ATP, y NodJ sería la proteína transmembranal que formaría un poro para la secreción de los FN's (Vázquez *et al*, 1993). En esta familia se ha observado en ocasiones la participación de proteínas accesorias de membrana externa (Fath y Kolter, 1993; Paulse *et al*, 1997a).

En *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, se localizó un *nodT* fuera del plásmido simbiótico, pero no se reportó su localización. Además se reportó la presencia de otras bandas de hibridación que podrían ser copias de *nodT* en el fondo genómico de las bacterias estudiadas pero no han sido aisladas ni caracterizadas (Rivilla y Downie, 1994). La expresión de NodT en *E. coli* mutado en *TolC*, cuyo producto participa en la secreción de diversos compuestos como la hemolisina y la colicina, es tóxica. Pero es importante señalar que el péptido señal es funcional, ya que si se fusiona a PhoA, se observa actividad de fosfatasa alcalina, cosa que sólo se logra si PhoA es translocado a través de la membrana (Rivilla *et al*, 1995). NodT es una proteína de membrana externa, con un péptido señal de tránsito característico de las lipoproteínas de membrana externa (Rivilla *et al*, 1994, Wu y Tokunaga, 1986). En su extremo carboxilo todas presentan dos dominios conservados que se ha observado en proteínas de membrana externa que participan en el transporte de compuestos (Rivilla y Downie, 1994, Rivilla *et al* 1995). En base a esto, se había propuesto que podría participar en la secreción del factor de nodulación (Rivilla *et al*, 1995, Paulsen *et al*, 1997a y el presente trabajo). Mutaciones en *nodT* no tienen un fenotipo claro en la nodulación o en la secreción de los FN's. Hasta la fecha no se han obtenido dobles mutantes que puedan evitar una posible complementación de la mutación en una sola copia. El único efecto que se ha observado en cuanto a nodulación relacionado con *nodT* es que parece influir en la especificidad para nodular el cultivar Woogenellup de *Trifolium subterraneum*, en el caso de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, pero no se ha propuesto el mecanismo que lleva a

cabo este efecto (Lewis-Henderson y Djordjevic, 1991b).

En el presente trabajo analizamos la participación de NodT en la secreción del factor de nodulación en *Rhizobium etli* cepa CE3. Para esto procedimos a realizar la identificación y el aislamiento de *nodT*, localizando dos copias, una en plásmido c y la otra muy probablemente en cromosoma. Ninguna se encuentra en el plásmido simbiótico, que es donde se localizan la mayoría de los genes de nodulación en *R. etli*, en especial aquellos con los que *nodT* forma un operón en otros rhizobia como *R. leguminosarum* bv. *viciae* y *trifolii*. La participación del plásmido c en la nodulación, es la de permitirle a la bacteria contender contra la cepa silvestre en una coinoculación. La cepa curada de este plásmido induce la formación nódulos normales, es capaz de infectar esos nódulos y fija nitrógeno en cantidades similares a la cepa silvestre, pero si se inoculan a las plantas las dos cepas, los nódulos sólo están presentes dentro a la cepa silvestre (Brom *et al*, 1992).

El nivel de identidad que tienen estas copias entre ellas, es del 64% a nivel de nucleótidos y 61% a nivel de aminoácidos.

La copia de cromosoma revela la más alta identidad con la copia aislada y secuenciada de NodT de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (86%), la cual se localiza fuera del plásmido simbiótico, y la menor con la copia del plásmido c y con la de *R. leguminosarum* bv. *viciae*.

La copia de plásmido c está más relacionada con la de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* y menos con la de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*.

Los perfiles hidropáticos que presentan las proteínas NodT se sobrelapan unos con otros con pocas diferencias a lo largo de la secuencia. Estos perfiles son muy similares a los de proteínas de membrana externa que participan en la secreción de compuestos como la colicina, la α -hemolisina, proteasas y diversas drogas, y se diferencian de los perfiles hidropáticos que presentan las proteínas transmembranales que participan con las de membrana externa en la secreción de compuestos.

Lo que se mantiene en todos los genes *nodT*, es la presencia de un péptido señal de tránsito característico de las lipoproteínas de membrana externa, así como los dominios en el extremo carboxilo. Se ha propuesto que estos podrían participar en la interacción con otras proteínas localizadas en la membrana citoplásmica, ya que las proteínas que también los presentan, participan en sistemas de transporte en conjunto con proteínas transmembranales y de membrana interna, como sería el caso de NodII, para el transporte del factor de nodulación. Los perfiles hidropáticos de estas dos proteínas presentan varios picos hidrofóbicos, los cuales se sobrelapan si se comparan ambas proteínas. Además, este perfil se parece mucho al de otras proteínas de membrana externa que se sabe, actúan como transportadores. Se

ha propuesto que este tipo de perfiles corresponden al de estructuras tipo Barril- β (Paulsen *et al*, 1997a y b); sin embargo, al utilizar programas computacionales con predicción de estructuras a partir de secuencias de aminoácidos, no se reporta ninguna estructura tridimensional para estas proteínas.

Al construir y analizar un árbol filogenético creado a partir de un alineamiento múltiple de secuencias de las proteínas NodT y de proteínas con similitud significativa a ellas, se observa que las proteínas NodT se agrupan entre ellas en una sola rama del árbol, y su semejante más cercano son OprN de *P. aeruginosa* y OpcM de *B. cepacia*. En el otro extremo del árbol se agrupan otras proteínas de membrana externa correspondientes a otros organismos, lo cual indica que, a pesar de compartir ciertas características con proteínas de membrana externa dedicadas al transporte, NodT podría estar formando una familia genética que ha evolucionado aparte, y que se ha conservado durante esta evolución.

Lejos de formar parte de un operón con genes de nodulación, la copia de cromosoma se encuentra abajo de un gen que codifica para una proteína homóloga a MexB, de *Pseudomonas aeruginosa*, la cual participa en un sistema de transporte de drogas múltiples junto con MexA y OprM ú OprJ (proteínas de membrana externa) (Pool *et al*, 1996 a y b). No se observa ningún terminador dependiente o independiente de Rho corriente abajo de ese gen. En la región intergénica se localiza una región promotora tipo $\sigma 70$ que podría no ser funcional, ya que el gen que está corriente arriba no tiene una señal de término, y el programa que se utilizó para realizar la búsqueda de este tipo de secuencias, sólo ha sido descrito para ubicar promotores de *E. coli*. Lo que es más probable es que se transcriba junto con el gen que está corriente arriba. Para demostrar esto, sería necesario hacer un análisis de expresión genética de este posible promotor, fusionándolo a algún gen reportero. Además se necesita, por ejemplo, hacer analisis de expresión del RNAm por si forma un operón con los genes *mexAB*, o si forma una unidad transcripcional independiente.

El hecho de que no hayamos podido mutagenizar esta copia de *nodT* al insertarle un marcador de resistencia a cloranfenicol, indica que probablemente este gen pueda tener un papel importante dentro de la bacteria, o bien que este método de selección no es el adecuado. Esto es porque *nodT* podría estar participando en dar resistencias a drogas múltiples, como lo son el cloranfenicol y la gentamicina, si está formando parte de un operón con *mexAB* y al seleccionar con antibióticos a las mutantes, estas no puedan crecer en forma normal. En *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, se reporta la mutagénesis de la copia que aislaron por medio de una inserción con un

cassette de kanamicina, y no presenta un fenotipo en la nodulación alterado. Sin embargo localizan otra copia que intentan mutar y no logran obtener dobles mutantes. Nosotros intentamos la mutagénesis por medio de un cassette de cloranfenicol y utilizando un vector suicida inducible por sacarosa. Probablemente este sistema de selección por cloranfenicol no sea eficiente en *Rhizobium etli*, aunque nos aseguramos de que esta cepa es sensible a dicho antibiótico. Corriente abajo de *mexB* se localiza el gen *oprM*, en el caso de *P. aeruginosa* y una mutación en este gen vuelve de 4 a 16 veces mas sensible a cierto tipo de antibióticos y de compuestos a la cepa mutada (Zhao *et al*, 1998). Probablemente al realizar la mutagénesis y hacer la selección con cloranfenicol, se dificulta el poder seleccionar a las mutantes en esta cepa.

El gen que está corriente abajo de esta copia cromosómica, es homólogo a *mali*, de *E. coli*, el cual tiene su propio promotor, además de que *nodT* de cromosoma sí tiene una estructura de asa y anillo para terminar la transcripción, por lo que es posible que *mali* se transcriba en forma independiente de *nodT* (Reidl *et al* 1989).

El gen *nodT* del plásmido c se encuentra corriente abajo de un homólogo a *cpxA*, de *E. coli*, el cual tiene un terminador Rho independiente que se traslapa con un promotor tipo σE , que es parecido al de una proteína de membrana externa de *E. coli* que se induce en estados de estrés y que pudiera probablemente regular la expresión de este *nodT*. *cpxA* se encuentra abajo de *cpxR* y ambos actúan en conjunto como un sistema de señalización de dos componentes para expresar proteínas cuando existen estados de estrés. CpxA es una proteína detectora que al momento de detectar la señal se autofosforila y fosforila a *cpxR* el cual, en ese estado, es un activador transcripcional. Este sistema actúa en conjunto con otro activador transcripcional para la expresión de genes en estados de estrés, el cual es σE , por lo que es probable que la transcripción de esta copia de *nodT* se lleve a cabo en esas circunstancias pero que su transcripción no sea regulada por *cpxR*. Se ha propuesto que la señal que activa a estos dos sistemas es la presencia de proteínas de membrana externa que no se encuentren completamente plegadas y se acumulan en el periplasma (Pogliano *et al*, 1997). Otra hipótesis indica que la señal podría ser sensada por las proteínas de membrana externa, que es la naturaleza propuesta para *nodT*, y que ellas transducirían esta señal a los componentes de la membrana interna, como *cpxA*. Por ejemplo, la lipoproteína de membrana externa NlpE, al sobreproducirse, logra eliminar un problema de toxicidad creado por la expresión de una proteína de fusión LamB-LacZ-PhoA que presuntamente se debe a su acumulación en el periplasma, donde se secreta. La sobreproducción de NlpE activa el sistema de transducción de señales de dos componentes Cpx,

lo cual activa a una proteasa que degrada a la proteína de fusión (Snyder *et al*, 1995). Se propone que estos dos tipos de sistemas actuarían de forma independiente uno del otro, aunque su respuesta se debe al mismo estímulo (Jones *et al*, 1997). Se sabe que genes que están bajo el control de σE , si son sobreexpresados en condiciones de estrés calórico en cepas de *E. coli* que les falte σE , son capaces de restaurar el fenotipo de la mutante que no puede crecer en condiciones de estrés calórico o de presencia de solventes (Connolly *et al* 1997). El gen *nodT* del plásmido c puede estar participando en un sistema que responde a condiciones de estrés aunque no es un gen esencial. Probablemente este se active al mismo tiempo que los genes que se encuentran corriente arriba, y que forman un sistema de señalización de dos componentes, aunque su inducción no dependa de ellos. *cpxA* fue descrito inicialmente participando en una transferencia eficiente de los plásmidos F del donador a la célula receptora (conjugative plasmid expression). Análisis posteriores han demostrado que las mutaciones en estos alelos tienen un efecto pleiotrópico: decrecen la estabilidad de las proteínas de membrana externa e interna, como Lpp y OmpF; disminuyen los niveles de resistencia a aminoglucósidos; dañan los sistemas de transporte regulados por iones como los de lactosa y prolina; anulan la capacidad de crecimiento en fuentes de carbono no fermentables como el succinato; inhabilitan la capacidad de utilizar l-serina como fuente de carbono y auxotrofia por isoleucina/valina (Danese *et al* , 1995). También se ha observado que este tipo de sistemas sirven para detectar el mal plegamiento de proteínas que son exportadas y al acumularse en el periplasma, provocan la activación de este tipo de sistemas de dos componentes para activar por medio de fosforilaciones (Missiakas y Raina, 1997) la transcripción de genes cuyos productos van a ayudar al plegamiento de cierto tipo de proteínas de membrana externa (Dartigalongue y Raina 1998). Incluso este sistema responde a condiciones de pH alcalino, induciendo la transcripción de otros genes (Danese y Silhavy, 1998). Pero al mismo tiempo se activa la transcripción de los genes que presentan promotores tipo $\sigma 24$, como es el que presenta esta copia de *nodT*. El activador transcripcional de este gen muy probablemente sea la proteína RpoE. El hecho de que en este plásmido se encuentren este tipo de elementos, de que la cepa secrete menos de la mitad del factor de nodulación y de que tenga dificultades para competir con la cepa sivestre en el proceso de infección del frijol, tomando en cuenta que la simbiosis que se establece inicia como un proceso de estrés, hace interesante el continuar analizando este plásmido para caracterizar los diferentes componentes que en él se localicen.

Corriente abajo de este *nodT* se observa el final de un marco de lectura abierto que codifica para una posible proteína con una identidad del 30-38% y

una similitud del 55-58% con la cadena beta de la citrato liasa de *E. coli*. y que está orientado en la dirección contraria a *nodT*. Es probable que este gen no tenga ninguna influencia en la posible expresión y actividad de *nodT*.

La cepa curada del plásmido c secreta menos factor de nodulación que la cepa silvestre; sin embargo, esta disminución en la secreción de FN's no disminuye la capacidad de esta bacteria para poder formar e infectar nódulos en frijol, ya que como observamos a tiempos largos (12 h), este compuesto se acumula en el medio.

Para observar si *nodT* era capaz de revertir este fenotipo, desarrollamos tres estrategias para complementar a la cepa CFNX184 con *nodT*. La primera estrategia consistió en subclonar el gen *nodT* que muy probablemente se encuentre en el cromosoma, bajo la acción de el promotor de *noda* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* en el vector de expresión pMP2750. La segunda consistió en colocar el fragmento de 4 kb que proviene del plásmido c en el mismo vector de expresión, orientado de tal manera que se influyera la transcripción del gen *nodT* por el promotor mencionado. Por último, un producto de PCR que amplificaba sólo a *nodT* se colocó en el vector de expresión, bajo la influencia del promotor de *noda*. En ninguno de los tres casos se logró observar una complementación del efecto detectado en la secreción del factor de nodulación, sugiriendo que *nodT* no participa en la secreción del factor de nodulación, que se necesitan factores adicionales que se localizan en otro locus o loci del plásmido c para cumplir esa función, o que no se este expresando la proteína.

El gen *nodT* que muy probablemente esté en cromosoma, se está expresando en nuestro sistema, como se observa en los experimentos tipo Western que realizamos sobre la cepa silvestre y la curada del plásmido c, y lo hace en forma independiente del inductor de genes de nodulación, naringenina. Observamos que esta proteína se localiza en la fracción membranal y no en el citoplasma, algo que se esperaba de acuerdo a sus características a nivel de secuencia. La secuencia predice que el producto de *nodT* de cromosoma tendría un pI de 5.6 y la copia del plásmido c tendría un pI de 7.6. Sin embargo, no fue posible detectar la presencia de dos isoformas al hacer experimentos de doble dimensión, por lo cual no es posible decir si el gen que está en plásmido c se está expresando. Se detecta la presencia de dos bandas cuando se observa la fracción de una sola dimensión que se coloca como referencia en el gen. La banda superior comigra con una proteína isoelectroenfocada con un pI de 5.9-6 y que proponemos como el producto de *nodT* que muy probablemente esté en cromosoma. Se observa otra banda abajo, que muy probablemente sea un producto de degradación porque aunque se usaron espectros de anfolina con un pH de 4-8, 4-6.5 o 6-8, no se

observó la presencia de alguna proteína que se isoelectroenfocara y que migrara a la altura de esa banda.

CONCLUSIONES

- Existen dos copias de *nodT* en el genoma de *Rhizobium etli*, pero ambas están fuera del plásmido simbiótico y no forman parte de operones de nodulación. Una copia se encuentra en el plásmido *c* y la otra muy probablemente en el cromosoma.

- La cepa CFNX 184, curada del plásmido *c*, secreta mucho menos factor de nodulación que la cepa silvestre.

- En base a los datos obtenidos por secuencia, la copia de *nodT* del plásmido *c* presenta corriente arriba, dos genes que presentan una similitud significativa con genes de *E. coli* que codifican para un sistema de transducción de señales de dos componentes, y que responde a condiciones de estrés. En la región intergénica arriba de esta copia, se observa una secuencia con alta similitud al promotor σ_{24} (σE) de *ompK* de *E. coli*, que codifica para una proteína de membrana externa involucrada en respuesta a estrés térmico.

- El gen *nodT* de cromosoma presenta, corriente arriba, un gen con una alta similitud con el gen *mexB* de *Pseudomonas aeruginosa* cuyo producto está involucrado en la formación de una bomba de flujo de diversas drogas. En la región intergénica no se observan secuencias terminadoras o promotoras, por lo que se sugiere que esta copia podría estar formando un operón con este gen.

observó la presencia de alguna proteína que se isoelectroenfocara y que migrara a la altura de esa banda.

CONCLUSIONES

- Existen dos copias de *nodT* en el genoma de *Rhizobium etli*, pero ambas están fuera del plásmido simbiótico y no forman parte de operones de nodulación. Una copia se encuentra en el plásmido *c* y la otra muy probablemente en el cromosoma.

- La cepa CFNX 184, curada del plásmido *c*, secreta mucho menos factor de nodulación que la cepa silvestre.

- En base a los datos obtenidos por secuencia, la copia de *nodT* del plásmido *c* presenta corriente arriba, dos genes que presentan una similitud significativa con genes de *E. coli* que codifican para un sistema de transducción de señales de dos componentes, y que responde a condiciones de estrés. En la región intergénica arriba de esta copia, se observa una secuencia con alta similitud al promotor σ_{24} (σE) de *ompK* de *E. coli*, que codifica para una proteína de membrana externa involucrada en respuesta a estrés térmico.

- El gen *nodT* de cromosoma presenta, corriente arriba, un gen con una alta similitud con el gen *mexB* de *Pseudomonas aeruginosa* cuyo producto está involucrado en la formación de una bomba de flujo de diversas drogas. En la región intergénica no se observan secuencias terminadoras o promotoras, por lo que se sugiere que esta copia podría estar formando un operón con este gen.

BIBLIOGRAFIA

- Ausubel F.M.; Brent R.; Kingston R.E.; Moore D.D.; Seidman J.G.; Smith J.A. y Struhl K. Current protocols in molecular Biology. *New York: John Wiley & Sons.* (1989).
- Baev N., Endre G., Petrovics G., Banfalvi Z., Kondorosi A. Six nodulation genes of *nod* box locus 4 in *Rhizobium meliloti* are involved in nodulation signal production: *nodM* codes for D-glucosamine synthetase. *Mol. Gen. Genet.* 228 (1-2):113-124 (1991)
- Binet R. and Wandersman C. Protein secretion by hybrid bacterial ABC-transporters: specific functions of the membrane ATPase and the membrane fusion protein. *EMBO J.* 14 (10):2298-2306. (1995)
- BIO-RAD. Life Science Research Products. *Bio-Rad Laboratories.* 372 (1994)
- BioTechnique catalog, pp. 224 (1994)
- Bloemberg G.V., Thomas -Oates J.E., Lugtenberg B.J.J. and Spaink H.P. Nodulation protein NodL of *Rhizobium leguminosarum* O-acetylates lipo-oligosaccharides, chitin fragments and N-acetylglucosamine *in vitro*. *Mol. Microbiol.* 11 (4):793-804 (1994)
- Brewin N.J. Development of the legume root nodule. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 7:191-226 (1991)
- Brom S., García de los Santos A., Stepkowsky T., Flores M., Dávila G., Romero D. and Palacios R. Diferent plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* are required for optimal symbiotic performance. *J. Bact.* 174 :5183-5189 (1992)
- Canter Cremers H.C.J, Wijffelman C.A., Pees E., Rolfe B.G, Djordjevic M.A. and Lugtenberg B.J.J. Host specific nodulation of plants of the pea cross-inoculation group is influenced by genes in fast growing *Rhizobium* downstream *nodC*. *J. Plant Physiol.* 132:398-404 (1988)
- Cárdenas L., Domínguez J., Quinto C., López-Lara I.M., Lugtenberg B.J.J., Spaink H.P., Rademaker G.J., Haverkamp J. and Thomas-Oates J.E. Isolation, chemical structures and biological activity of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli* *Plant Mol. Biol.* 29:453-464 (1995)
- Cárdenas L., Domínguez J., Santana O and Quinto C. The role of the *nodI* and *nodJ* genes in the transport of Nod metabolites in *Rhizobium etli*. *Gene* 173:183-187 (1996)
- Carlson R.W., Price N.P.J. and Stacey G. The biosynthesis or rhizobial lipo-oligosaccharide nodulation signal molecules. *Mol.Plant-microbe interact.* 7:684-695 (1994)
- Cheng H. and Walker G.C. Succinoglycan production by *Rhizobium meliloti* is regulated through the ExoS-ChvI two component regulatory system. *J. Bact.* 180 (1):20-26 (1998)
- Claiborne F.W. An improved chloramphenicol resistance gene cassette for site-directed marker replacement mutagenesis. *Biotechniques* 12 (2):223-225 (1992)

Connolly L., De las Peñas A., Alba B.M. and Gross C.A. The response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is controlled by partially overlapping pathways. *Genes & Dev* 11 (15): 2012-2021 (1997)

Corvera A., Promé D., Promé J.-C., Martínez-Romero E. and Romero D. The *nolL* gene from *Rhizobium etli* determines nodulation efficiency by mediating the acetylation of the fucosyl residue in the nodulation factor. *Mol. Plant. Microbe Int. In press* 1999.

Cren M., Kondorosi A., and Kondorosi E. NolR controls expression of the *Rhizobium meliloti* nodulation genes involved in the core Nod factor synthesis. *Mol Microbiol* 15 (4):733-747 (1995)

Danese P.N., Snyder W. B., Cosma Ch. L., Davis L.J.B. and Silhavy T.J. The Cpx two-component signal transduction pathway of *Escherichia coli* regulates transcription of the gene specifying the stress-inducible periplasmic protease, DegP. *Genes & Dev.* 9:387-398 (1995)

Danese P.N. and Silhavy T. CxpP, a stress-combative member of the Cpx regulon. *J. Bact.* 180 (4):831-839 (1998).

Dartigalongue C. and Raina S. A new heat-shock gene, *ppiD*, encodes a peptidyl-prolyl isomerase required for folding of outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 17(14):3968-3980 (1998)

Davis E.O., Evans I.J. and Johnston W.B. Identification of *nodX*, a gene that allows *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* strain TOM to nodulate Afghanistan peas. *Mol. Gen. Genet.* 212:531-535 (1988)

Davis E.O. and Johnston, A.W.B. Analysis of the three *nodD* genes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*; *nodDI* is preceded by *nolE*, a gene whose product is secreted from the cytoplasm. *Mol Microbiol* 4 (6) 921-932 (1990 a)

Davis E.O. and Johnston A.W.B., Regulatory functions of the three *nodD* genes of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Mol. Microbiol.* 46 (6):933-941 (1990b).

Dazzo F.B., Orgambide G.G., Philip-Hollingsworth R.I., Ninke K.O. and Salzwedel J.L. Modulation of development, growth dynamics, wall cristallinity and infection sites in white-clover root hairs by membrane chitolipooligosaccharides from *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifoli*. *J. Bact.* 178:3621-3627 (1996)

Debellé F., Plazanet C., Roche P., Pujol C, Savagnac A., Rosenberg Ch., Promé J.C. and Dénarié J. The NodA protein of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium tropici* specify the N-acylation of Nod factors by different fatty acids. *Mol. Microbiol.* 22:303-314 (1996)

de Bruijn F.J. and Downie J.A. Biochemical and molecular studies of symbiotic nitrogen fixation. *Curr. Opin. Biotech.* 2:184-192 (1991)

Demont N., Debelle F., Aurelle H., Denarie J., Prome J.C. Role of the *Rhizobium meliloti* *nodF* and *nodE* genes in the biosynthesis of lipo-oligosaccharidic nodulation factors. *J. Biol. Chem.* 268 (27):20134-20142 (1993)

Dénarié J., Debellé F. and Rosenberg Ch. Signaling and host range variation in nodulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 46:497-531 (1992)

Dénarié J. and Cullimore J. Lipo-Oligosaccharide nodulation factors: A minireview new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Cell* 74:951-954 (1993)

Dénarié J. and Debelle F. *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 65:503-535 (1993)

De Las Peñas A., Connolly L., Gross C.A. SigmaE is an essential sigma factor in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179 (21):6862-6864 (1997)

Díaz C.L., Spink H.P., Wijffelman C.A. and Kine J.W. Genomic Requirements of *Rhizobium* for nodulation of white clover hairy roots transformed with the pea lectin gene. *MPMI* 8(3): 348-356 (1995)

Dinh T., Paulsen I.T. and Saier M.H. Jr. A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of Gram-negative bacteria. *J. Bact.* 176(13):3825-3831 (1994)

Dixon R.A., Lamb Ch. J., Masoud S., Sewalt V.J.H. and Paiva N.L. Metabolic engineering: prospects for crop improvement through the genetic manipulation of phenylpropanoid biosynthesis and defense responses- a review. *Gene* 179:61-71. (1996)

Downie J.A. Signaling strategies for nodulation of legumes by rhizobia. *Trends Microbiol.* 2:318-323 (1994)

Dusha I. and Kondorosi A. Genes at different regulatory levels are required for the ammonia control of nodulation in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* 240:435-444 (1993)

Eckhardt T. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid*, 1:584-588 (1978)

Ehrhardt D.W. Wais R. and Long S. Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell* :673-681 (1996)

Eisenberg D., Weiss R.M. and Terwilliger T.C. The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix. *Nature* 299:371-374 (1982a)

Eisenberg D. Weiss R.M. Terwilliger T.C. and Wilcox W. Hydrophobic moments and protein structure. *Faraday Symposium Chemical Society* 17:109-120. (1982b)

Evans I.J. and Downie J.A. The *nodI* gene product of *Rhizobium leguminosarum* is closely related to ATP-binding bacterial transport proteins; nucleotide sequence analysis of the *nodI* and *nodJ* genes. *Gene* 43 :95-101 (1986)

Fath M.J., Skvirsky R.C. and Kolter R. Functional complementation between bacterial MDR-like export systems: colicin V, alpha-hemolysin, and *Erwinia* protease. 173(23):7549-7556 (1991)

Fath M.J. and Kolter R. ABC transporters: Bacterial exporters. *Microbiological reviews* 57 (4):995-1017 (1993)

Felle H.H., Kondorosi A. and Schultze M. Nod signal-induced plasma membrane potential changes in alfalfa root hairs are differentially sensitive to structural modifications of the lipochitooligosaccharides *Plant. J.* 7:939-947 (1995)

Fernández-López M., D'Haese W., Mergaert P., Verplancke C., Prome J.C., Van Montagu M. and Holsters M. Role of *nodI* and *nodJ* in lipo-chitooligosaccharide secretion in *Azorhizobium caulinodans* and *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 20 (5):993-1000 (1996)

Figurski D.H. and Heinski, D.R. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1648-1652 (1979)

Finnie Ch., Hartley N.M., Findlay K. and Downie J.A. The *Rhizobium leguminosarum prsDE* genes are required for secretion of several proteins, some of which influence nodulation, symbiotic nitrogen fixation and exopolysaccharide modification. *Mol. Microbiol.* 25 (1):135-146 (1997).

Fisher K.F. and Long S.R. *Rhizobium* plant signal exchange. *Nature* 357:655-660(1992)

Fisher R.F. and Long S.R. Interactions of NodD at the nod Box: NodD binds to two distinct sites on the same face of the helix and induces a bend in the DNA. *J. Mol. Biol.* 233 (3) :336-348 (1993)

Folch-Mallol J.L., Marroqui S., Sousa C., Manyani H., López-Lara M., van der Drift K.M.G.M., Haverkamp J., Quinto C., Gil-Serrano A., Thomas-Oates J., Spaink H.P. and Megías M. Characterization of *Rhizobium tropici* CIAT899 nodulation factors: The role of *nodH* and *nodPQ* genes in their sulfation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9:151-163 (1996)

Folch-Mallol J.L., Manyani H., Marroqui S., Sousa C., Vargas C., Nava N., Colmenero-Flores J.M., Quinto C., Megías M. Sulfation of nod factors via nodHPQ is nodD independent in *Rhizobium tropici* CIAT899. *Mol Plant Microbe Interact* 11 (10):979-87 (1998)

Fraberg Ch., Fellay R., Bairoch A., Broughton W.J., Rosenthal A and Perret X. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* 387:394-401 (1997)

Friedman A.M., Long S.R., Brown S.E., Buiekema W.J., and Ausubel F.M. Construction of a broad host range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants. *Gene* 18:289-296 (1982)

Garcia M., Dunlap J., Loh J., Stacey G. Phenotypic characterization and regulation of the *nolA* gene of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9 (7):625-636 (1996)

Göttfert M., Hitz S. and Hennecke H. Identification of *nodS* and *nodU*, two inducible genes inserted between the *Bradyrhizobium japonicum nodYABC* and *nodIJ* genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3:308-316 (1990)

Grob P., Michel P., Hennecke H. and Göttfert M. A novel response-regulator is able to suppress the nodulation defect of a *Bradyrhizobium japonicum nodW* mutant. *Mol. Gen. Genet.* 241:531-541 (1993)

- Hanin M., Jabbouri S., Quesada-Vincens D., Freiberg C., Perret X., Promé J.-C. Broughton W.J. and Fellay R. Sulphation of *Rhizobium* sp. NGR234 Nod factors is dependent on *noeE*, a new host-specificity gene. *Mol. Microbiol* 24 (6): 1119-1129 (1997)
- Henikoff S. Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* 28 (3):351-9 (1984)
- Higgins Ch. F., Hiles I.D., Salmond G.P.C., Gill D.R., Downie J.A., Evans I.J., Holland I.B., Gray L., Buckells S.D., Bell A. W. and Hermodson M.A. A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* 323:448-450 (1986)
- Hirsch A.M. Developmental biology of legume nodulation. *New. Phytol.* 122:211-237 (1992)
- Hirsch A.M. and Fang Y. Plant hormones and nodulation: what's the connection? *Plant Mol. Biol.* 26:5-9 (1994)
- Hirsch A.M. and LaRue T.A. Is the legume nodule a modified root or stem or an organ *sui generis*?. *Critical reviews in plant sciences* 16 (4):361-392 (1997)
- Hoefer Scientific Instruments Catalog pp. 128-176 (1989)
- Jabbouri S., Fellay R., Talmont F., Kamalaprija P., Burger U., Relic B., Prome J.C., and Broughton W.J. Involvement of *nodS* in N-methylation and *nodU* in 6-O-carbamoylation of *Rhizobium* sp. NGR234 nod factors. *J. Biol. Chem.* 270 (39):22968-22973 (1995)
- Jabbouri S., Rêlic B., Hanin M., Kamalaprija P., Burger U., Prome D., Prome J.C. and Broughton W.J. *nolO* and *noeI* (HsnIII) of *Rhizobium* sp. NGR234 are involved in 3-O-carbamoylation and 2-O-methylation of Nod factors. *J Biol Chem* 273 (20):12047-12055 (1998)
- John M., Rohrig H., Schmidt J., Wieneke U., and Schell J. *Rhizobium* NodB protein involved in nodulation signal synthesis is a chitooligosaccharide deacetylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (2):625-629 (1993)
- Jones C.H., Danese P.N., Pinker J.S., Silhavy T.J. and Hultgren S.C. The chaperone-assisted membrane release and folding pathway is sensed by two signal transduction systems. *EMBO J.* 16(21):6394-6406 (1997)
- Koronakis V., Li J., Koronakis E. and Stauffer K. Structure of TolC, the outer membrane component of the bacterial type I efflux system, derived from two-dimensional crystals. *Mol. Microbiol.* 23:617-626 (1997)
- Kyte J. and Doolittle R.F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157:105-132 (1982)
- Laemmli, U.K.. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685 (1970)

Lawson Ch. G.R., Djordjevic M.A., Weinman J.J. and Rolfe B.G. *Rhizobium* inoculation and physical wounding result in the rapid induction of the same chalcone synthase copy in *Trifolium subterraneum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7:498-507 (1994)

Lerouge P., Roche P., Faucher C., Maillet F., Truchet G., Prome J.C., Denarie J. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344 (6268):781-784 (1990)

Lewis-Henderson W.R. and Djordjevic M.A. A cultivar-specific interaction between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and subterranean clover is controlled by *nodM*, other bacterial cultivar specificity genes, and a single recessive host gene. *J. Bact.* 173 (9):2791-2799 (1991 a)

Lewis-Henderson W.R. and Djordjevic M.A. *nodT*, a positively-acting cultivar specificity determinant controlling nodulation of *Trifolium subterraneum* by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Plant. Mol. Biol.* 16:515-526 (1991b)

Long S.R. *Rhizobium* symbiosis: Nod factors in perspective. *Plant Cell.* 8:1885-1898 (1996)

López-Lara I.M., Block-Tip L., Quinto C., García M.L., Stacey G., Bloemberg G.V., Lamers G.E.H., Lugtenberg B.J.J., Thomas-Oates J.E. and Spaink H.P. NodZ of *Bradyrhizobium* extends the nodulation host range of *Rhizobium* by adding a fucosyl residue to nodulation signals. *Mol. Microbiol.* 21:397-408 (1996)

Lorquin J., Lortet G., Ferro M., Mear N., Prome J.C. and Boivin C. *Sinorhizobium teranga* bv. *acaciae* ORS1073 and *Rhizobium* sp. strain ORS1001, two distantly related *Acacia*-nodulating strains, produce similar Nod factors that are *O*-carbamoyleated, *N*-methylated, and mainly sulfated. *J. Bact.* 179(9):3079-3083 (1997)

Loveless B.J. and Saier M.H. Jr. A novel family of channel-forming, autotransporting, bacterial virulence factors. *Mol. Memb. Biol.* 14:113-123 (1997)

Marie C., Barny M.A., Downie J.A. *Rhizobium leguminosarum* has two glucosamine synthases, GlmS and NodM, required for nodulation and development of nitrogen-fixing nodules. *Mol. Microbiol.* 6(7):843-51 (1992)

McKhann H.I. and Hirsch A.M. Does *Rhizobium* avoid the host response? In J.L. Dangel (Ed.); Bacterial pathogenesis of plants and animals; *Curr. Top. Microbiol Immunol* 192:139-162 (1994) Springer-Verlag Press, 1994.

MecasJ. Rouviere P.E., Erickson J.W., Donohue T.J. and Gross C.A. The activity of σ_E , an *Escherichia coli* heat inducible σ -factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes & Devel.* 7:2618-2628 (1993)

Mellor R.B. and Rosendahl L. A soybean peribacteroid space component, Riboflavin, represses Daidzein-induced common *nod*-gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Plant Physiol.* 144:34-37 (1994)

Mergaert P., D'Haese W., Geelen D., Prome D., Van Montagu M., Geremia R., Prome J.C., Holsters M. Biosynthesis of *Azorhizobium caulinodans* Nod factors. Study of the activity of the NodABCS proteins by expression of the genes in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 270 (49):29217-29223 (1995)

- Mergaert P., D'Haese W., Fernandez-Lopez M., Geelen D., Goethals K., Prome J.C., Van Montagu M. and Holsters M. Fucosylation and arabinosylation of Nod factors in *Azorhizobium caulinodans*: involvement of *noIK*, *nodZ* as well as *noeC* and/or downstream genes. *Mol Microbiol* 21(2):409-19 (1996)
- Mergaert P., Van Montagu M. and Holster M. Molecular mechanisms of Nod factor diversity. *Mol. Microbiol.* 25(5):811-817 (1997)
- McKay I.A. and Djordjevic M.A. Production and excretion of Nod metabolites by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. are disrupted by the same environmental factors that reduce nodulation in the field. *Appl. Env. Microbiol.* 59:3385-3392 (1993)
- McKhann H.I. and Hirsch A.M. Does *Rhizobium* avoid the host response in bacterial pathogenesis of plant and animals. ed J.L. Dangl, Springer-Verlay Press. :139-162 (1994)
- Missiakas D. and Raina S. Signal transduction pathways in response to protein misfolding in the extracytoplasmic compartments of *E. coli*.: Role of two new phosphoprotein phosphatases PrpA and PrpB *EMBO J.* 16 (7):1670-1685 (1997)
- Missiakas D. and Raina S. The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation. *Mol. Microbiol.* 28(6):1059-1066 (1998).
- Mylona P., Pawlowski K. and Bisseling T. Symbiotic nitrogen fixation. *Plant cell* 7:869-885. (1995)
- O'Farrell P.M. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250:4007-4021 (1975)
- Ogawa J. and Long S.R. The *Rhizobium meliloti groELc* locus is required for regulation of early *nod* genes by the transcription activator NodD. *Genes & Dev.* 9:714-729 (1995)
- Palacios R., Boistard P., Dávila G., Fonstein M., Göttfert M., Perret X., Ronson C., Sobral B. Genome structure in nitrogen-fixing organisms. In C. Elmerich *et al* (eds.) Biological Nitrogen fixation for the 21 st. century. *Luwer Academic Publishers.* 541-547 (1998)
- Paulsen, I.T., Park, J.H., Choi, P.S. and Saier M.H. Jr. A family of gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from Gram-negative bacteria. *FEMS microbiology letters* 156:1-8 (1997a)
- Paulsen I.T., Beness A.M., Saier M.H. Jr. Computer-based analyses of the protein constituents of transport systems catalysing export of complex carbohydrates in bacteria. *Microbiology* 143:2685-2699 (1997b)
- Penmetsa R.V. and Cook D.R. A legume ethylene-insensitive mutant hyperinfected by its rhizobial symbiont. *Science* 275:527-530 (1997)
- Petrovics G., Putnoky P., Reuhs B., Kim J., Thorp T.A., Noel K.D., Carlson R.W. and Kondoroski A. The presence of a novel type of surface polysaccharide in *Rhizobium meliloti* requires a new fatty acid synthase-like gene cluster involved in symbiotic nodule development. *Mol. Microbiol.* 8:1083-1094 (1993)
- Pingret J.-L., Journet E.-P. and Barker D.G. *Rhizobium* Nod factor signaling: Evidence for a G protein-mediated transduction mechanism. *Plant cell* 10:659-671 (1998)

Pogliano J., Lynch A.S., Belin D., Lin E.C.C. and Beckwith J. Regulation of *Escherichia coli* cell envelope proteins involved in protein folding and degradation by the Cpx two-component system. *Genes & Dev* 11:1169-1182 (1997)

Poole, K., N. Gotoh, H. Tsujimoto, Q. Zhao, A. Wada, T. Yamasaki, S. Neshat, J. Yamagishi, X.-Z. Li, and T. Nishino. Overexpression of the mexC-mexD-oprJ efflux operon in nfxB-type multidrug resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 21:713-724. (1996a).

Poole, K., K. Tetro, Q. Zhao, S. Neshat, D.E. Heinrichs and N. Bianco. Expression of the multidrug resistance operon *mexA-mexB-oprM* in *Pseudomonas aeruginosa*: *mexR* encodes a regulator of operon expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:2021-2028. (1996b).

Price N.P.J., Kelly T.M., Raetz Ch.R.H. and Carlson R.W. Biosynthesis of a structurally novel lipid A in *Rhizobium leguminosarum* : identification and characterization of six metabolic steps leading from UDP-GlcNAc to 3-Deoxy-D-manno-2-octulosonic acid₂-lipid IV_A. *J. Bact.* 176:4646-4655 (1994)

Pugsley A.P. The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 57:50-108 (1993)

Quandt J and Hynes F. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria. *Gene* 127:15-21. (1993)

Quinto C., Wijffjes A.H.M., Bloemberg G.V., Block-Tip L., López-Lara I., Lugtenberg B.J.J., Thomas-Oates J.E. and Spaink H.P. Bacterial nodulation protein *nodZ* is a chitin oligosaccharide fucosyl transferase which can also recognize related substrates of animal origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4336-4341 (1997)

Reidl J., Romisch K., Ehrmann M. and Boos W. MalI, a novel protein involved in regulation of maltose system of *Escherichia coli*, is highly homologous to repressor proteins GalR, CytR and LacI. *J. Bacteriol.* 171(9):4888-4899 (1989)

Relić B., Perret X., Estrada-García M.T., Kopcinska J., Golinowski W., Krishnan H.B., Pueppke S.G. and Broughton W.J. Nod factors of *Rhizobium* are a key to the legume door. *Mol. Microbiol.* 13:171-178 (1994)

Ribiero A., Akkermans D.L., Van Kammen A., Bisseling T. and Pawlowski K. A nodule specific gene encoding a subtilisin like protease is expressed in early stages of actinorhizal nodule development. *Plant Cell* 7:785-794 (1995)

Rivilla R. and Downie J.A. Identification of a *Rhizobium leguminosarum* gene homologous to *nodT* but located outside the symbiotic plasmid. *Gene* 144:87-91 (1994)

Rivilla R., Sutton J.M. and Downie J.A. *Rhizobium leguminosarum* NodT is related to a family of outer membrane transport proteins that includes TolC, PrtF, CyaE and AprF. *Gene* 161:27-31 (1995)

Roche P., Debelle F., Maillet F., Lerouge P., Faucher C., Truchet G., Denarie J. and Prome J.C. Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*: *nodH* and *nodPQ* genes encode the sulfation of lipo-oligosaccharide signals. *Cell* 67(6):1131-1143 (1991a)

- Roche P., Lerouge P., Ponthus C., Prome J.C. Structural determination of bacterial nodulation factors involved in the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. *J. Biol. Chem.* 266(17):10933-10940 (1991b)
- Rohrig H, Schmidt J, Wieneke U, Kondorosi E, Barlier I, Schell J, John M. Biosynthesis of lipooligosaccharide nodulation factors: *Rhizobium* NodA protein is involved in N-acylation of the chitooligosaccharide backbone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(8):3122-6 (1994)
- Rosenblueth D.A., Thieffry D., Huerta A.M., Salgado H. and Collado-Vides J. Syntactic recognition of regulatory regions in *Escherichia coli*. *Comput. Applic, Biosci.* 12(5):415-422 (1996)
- Saier M.H. Jr., Tam. R., Reizer A. and Reizer J. Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol. Microbiol.* 11 (5):841-847 (1994)
- Sambrook J.; Fritsch E.F.; y Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory Manual, Ed. 2. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor , NY.* (1989)
- Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R. DNA sequencing with chainterminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467 (1977)
- Schatz G. and Dobberstein B. Common principles of protein translocation across membranes. *Science* 271:1519-1526 (1996)
- Schlaman H.R.M., Okker R.J.H. and Lugtenberg B.J.J Subcellular localization of the *Rhizobium leguminosarum nodI* gene product *J. Bact.* 172:5486-5489 (1990)
- Schwedock J.S. and Long S.R. *Rhizobium meliloti* genes involved in sulfate activation: the two copies of *nodPQ* and a new locus, *saa*. *Genetics* 132(4):899-909 (1992)
- Schultze M and Kondorosi A. The role of Nod signal structures in the determination of host specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *World Journal of microbiology & Biotechnology* 12:137-149 (1996)
- Scott D.B., Young C.A., Collins-Emerson J.M., Terzaghi E.A., Rockman E.S., Lewis P.E., Pankhurst C.E. Novel and complex chromosomal arrangement of *Rhizobium loti* nodulation genes. *Mol Plant Microbe Interact* 9(3):187-97 (1996)
- Segovia L., Young J.P.W. and Martínez-Romero E. Reclassification of american *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* type I strain as *Rhizobium etli* sp.nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:374-377 (1993)
- Snyder W.B., Davis L.J.B., Danese P.N., Cosma Ch.L. and Silhavy T.J. Overproduction of NlpE, a new outer membrane lipoprotein, suppresses the toxicity of periplasmic LacZ by activation of the Cpx signal transduction pathway. *J. Bact.* 177(15):4216-4223 (1995)
- Spaank H.P., Aarts A., Stacey G., Bloemberg G.V., Lugtenberg B.J.J. and Kennedy E.P. Detection and separation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* Nod metabolites using thin layer chromatography. *Mol. Plant Microbe Interact.* 5:72-80 (1992)
- Spaank H.P. and Lugtenberg B.J.J. Role of rhizobial lipo-chitin oligosaccharide signal molecules in root nodule organogenesis. *Plant Mol. Biol.* 26:1413-1422 (1994)

Spaink H.P., Wijffes A.H.M. and Lugtenberg B.J.J. *Rhizobium* NodI and NodJ proteins play a role in the efficiency of secretion of lipochitin oligosaccharides. *J. Bact.* 177:6276-6281 (1995)

Spaink H.P. Regulation of plant morphogenesis by lipo-chitin oligosaccharides. *Crit. Rev. in Plant Sci.* 15 (5 & 6):559-582 (1996)

Stacey G., Luka S., Sanjuan J., Banfalvi Z., Nieuwkoop A.J., Chun J.Y., Forsberg L.S., Carlson R. *nodZ*, a unique host-specific nodulation gene, is involved in the fucosylation of the lipooligosaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bact.* 176 (3):620-633 (1994)

Stratagene Cloning Systemes Catalog (1995)

Surin B.P., Watson J.M., Hamilton W.D.O., Economou A. and Downie J.A. Molecular characterization of the nodulation gene, *nodT*, from two biovars of *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Microbiol.* 4:245-252 (1990)

Sutton J.M., Lea E.J.A. and Downie J.A. The nodulation-signaling protein NodO from *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* forms ion channels in membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9990-9994 (1994)

Vasse J., de Billy F. and Truchet G. Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti* - alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. *Plant J.* 4 (3):555-566 (1993)

Vázquez M., Dávalos A., de las Peñas A., Sanchez F. and Quinto C. Novel Organization of the common nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* strains. *J. Bact.* 173: 1250-1258 (1991)

Vázquez M., Santana O. and Quinto C. The NodI and NodJ proteins from *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* strains are similar to capsular polysaccharide secretion proteins from Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* 8:369-377 (1993)

Vijn I., Martínez-Abarca F., Yang W.-C., das Neves L., van brussel, van Kammen A. and Bisseling T. Early nodulin gene expression during Nod factor-induced processes in *Vicia sativa*. *Plant J.* 8:111-119 (1995)

Villalobos M.A., Nava N., Vázquez M. and Quinto C. Nucleotide sequence of the *Rhizobium etli nodS* gene. *Gene* 150:201-202 (1994)

Walshaw D.L. and Poole P.S. The general L-amino acid permease of *Rhizobium leguminosarum* is an ABC uptake system that also influences efflux of solutes. *Mol. Microbiol.* 21:1239-1252 (1996)

Wu H.C. and Tokunaga M. Biogenesis of lipoproteins in bacteria. *Current topics in microbiology and Immunology* 125:127-156 (1986)

Yang W.C., de Blank C., Meskiene I., Hirt H., Bakker J., van Kammen A., Franssen H. and Bisseling T. *Rhizobium* Nod factors reactivate the cell cycle during infection and nodule primordium formation, but the cycle is only completed in primordium formation. *Plant Cell* 6:1415-1426 (1994)

Young C., Collins-Emerson J.M., Terzaghi E.A., Scott D.B. Nucleotide sequence of *Rhizobium loti* nodI. *Nucleic Acids Res* 25;18(22):6691 (1990)

Zhao Q., Li X.-Z., Srikumar R. and Poole K. Contribution of outer membrane efflux protein OprM to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* independent of MexAB. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42(7): 1682-1688 (1998)