

18

00551



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

ESTUDIO DE LA REGULACION DE LA EXPRESION DEL
OPERON *ccmIEFH* CROMOSOMAL Y SU PARTICIPACION
EN LA EXPRESION DE CITOCROMOS TIPO C EN
Rhizobium etli.

T E S I S

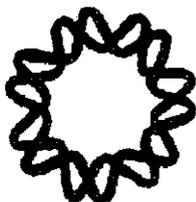
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

P R E S E N T A :

BIOL. JOSUÉ DAVID REYES AGUILAR

DIRECTOR DE TESIS: DR. MARIO SOBERON CHAVEZ



Cuernavaca, Morelos

Enero del 2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo de Tesis se realizó en el Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la U.N.A.M. (Campus Cuernavaca), bajo la dirección del Doctor Mario Soberón Chávez

Cuernavaca, Morelos 2000

Durante mis estudios de maestría fui apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

*"Soy parte del sol, como mi ojo es parte de mi,
mi pie sabe que soy parte de la tierra,
y mi sangre es parte del mar".*

*"Mi alma sabe que soy parte de la raza humana,
y mi espíritu es parte de mi nación."*

"Y en mi propio ser, soy parte de mi familia."

David Herbert Lawrence.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme continuar con mi superación académica.

Al doctor Mario Soberón Chávez por darme la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo, por la dirección de esta tesis y por el apoyo concedido durante mi maestría.

Al Comité tutorial y al de revisión de tesis: Dr. David Romero, Dr. José Luis Puente, Dr. Mario Soberón, Dr. Edmundo Calva, Dr. Edgardo Escamilla, Dra. Guadalupe Espín, y Dr. Rafael Vázquez. por sus observaciones, sugerencias, consejos y comentarios hacia el trabajo y la revisión de la tesis de maestría.

A los compañeros de laboratorio por haberme soportado por tanto tiempo; por sus consejos, tips, claves secretas, y charlas instructivas, para que los experimentos salieran bien, y hubiera un ambiente agradable en el laboratorio, y sobre todo por la calidez humana que comparten tanto en los buenos como en los malos momentos.

A los amigos de la UNAM (Campus Morelos), en especial a los Federicos, a los Quintos, a los Pantoja, a los Ginos, a los Lara, a los Rocha y Leon, a los Calva, a los zurita y a los X y G soberones, y todos los compañeros del IBT, que entre tópicos, clases, pláticas, fiestas y reuniones, hacen mi estancia más amena en este lugar.

DEDICATORIAS

A mis Padres, por el ejemplo de tenacidad y lucha ante toda circunstancia adversa de la vida, por el gran amor que he recibido de ellos, y por el apoyo tanto moral como económico en mi afán de incursionar en este mundo de la ciencia

A mis hermanos, por los momentos felices que hemos compartido, por las porras en los momentos de más estrés y sobre todo por la solidaridad que siempre me han expresado.

A cuatro seres de inmenso espíritu y bondad: a mis abuelitos, Angelita, Ma. Luisa, Arnulfo, y a mi padrino Apolinar, que donde quieran que estén les expreso mi agradecimiento por todos los consejos, historias, anécdotas y por el pensamiento positivo que me inculcaron.

A mis sobrinos Saúl de Jesús (chacho), Manuel Alejandro (piquito de pollo) y Daniel Leobardo (shaki chan), porque pensando en ellos trato de superarme para poder contribuir y dejarles un buen mundo donde vivir.

A todas las personas que han participado en mi formación académica, desde los contribuyentes que gracias a ellos pude tener mi beca, como a todo el personal del IBT, que sin su trabajo no dispondría de un lugar agradable para laborar.

A los hombres y mujeres que han caído en la lucha por la liberación de nuestros pueblos. A los que luchan por conservar su libertad y soberanía, y todo aquello que nos identifica como nación: ya sea en las montañas o en las ciudades, en la fabrica o en el surco, en el aula o en la oficina, en el hogar o en el laboratorio y en fin, donde haya una conciencia y un corazón generoso.

Estudio de la regulación de la expresión del operón *ccmIEFH* cromosomal y su participación en la expresión de citocromos tipo c en *Rhizobium etli*.

INDICE DEL CONTENIDO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUCCION | 1 |
| 1.1 Fijación de nitrógeno en <i>Rhizobium</i> | 1 |
| 1.2 Respiración bacteriana | 2 |
| 1.3 Cadenas respiratorias en <i>Rhizobium</i> | 3 |
| 1.4 Cadenas respiratorias de <i>Rhizobium etli</i> | 3 |
| 1.5 Citocromo <i>cbb₃</i> | 4 |
| 1.6 Citocromos bacterianos tipo c | 5 |
| 1.7 Biogénesis de citocromos tipo c | 8 |
| 1.8 Genes <i>ccmIEFH (cycHJKL)</i> | 10 |
| 1.9 <i>ccmIEFH</i> en otras bacterias | 11 |
| 2 ANTECEDENTES | 12 |
| 2.1 Mutantes de <i>R. etli</i> con alteraciones de citocromos y fijación de nitrógeno | 12 |
| 2.2 Expresión de <i>fixNOQP</i> en <i>R. etli</i> , regulación por NTRC y AICAR | 12 |
| 3 OBJETIVO | 14 |
| 3.1 Objetivo general | 14 |
| 3.2 Objetivos específicos | 15 |
| 3.3 Tareas de investigación | 15 |
| 4 MATERIAL Y METODOS | 16 |
| 4.1 Cepas bacterianas y plásmidos utilizados | 16 |
| 4.2 Medios de cultivo | 17 |
| 4.2.1 Medio rico PY (Peptone-Yeast) | 17 |
| 4.2.2 Medio mínimo (MM) | 17 |
| 4.2.3 Medio YS (Yeast-Succinato) | 17 |
| 4.2.4 Medio LB (Luria-Bertani) | 17 |
| 4.3 Condiciones de cultivo | 17 |
| 4.4 Antibióticos | 18 |
| 4.5 Soluciones amortiguadoras | 18 |
| 4.5.1 Tris Acetatos (TAE) | 18 |

| | |
|--|-----------|
| 4.5.2 Taurine (gel buffer glicerol) | 18 |
| 4.6 Enzimas e isótopos | 18 |
| 4.7 Aislamiento, purificación y verificación de DNA plasmídico | 18 |
| 4.8 Construcción de las fusiones <i>lacZ</i> | 20 |
| 4.9 Construcción de cepas de <i>Rhizobium etli</i> | 21 |
| 4.9.1 Crecimiento de cultivos bacterianos | 21 |
| 4.9.2 Extracción y lavado de células bacterianas | 21 |
| 4.9.3 Cruza bacteriana | 21 |
| 4.9.4 Aislamiento de bacterias | 22 |
| 4.10 Mapeo del inicio de transcripción | 22 |
| 4.11 Crecimiento de <i>Rhizobium</i> en medio líquido | 23 |
| 4.12 Cinéticas de crecimiento y expresión de actividad de β -galactosidasa | 24 |
| 4.13 Determinación de actividad enzimática de β -galactosidasa | 24 |
| 4.14 Determinación de proteína por método de Lowry | 25 |
| 4.15 Análisis de datos | 26 |
| 5 RESULTADOS | 27 |
| 5.1 Mapeo del inicio de transcripción de <i>ccmI</i> | 27 |
| 5.2 Construcción de la fusión <i>ccmI-lacZ</i> | 29 |
| 5.3 Expresión de la fusión <i>ccmI-lacZ</i> en cultivos exponenciales y estacionarios de YS | 29 |
| 5.4 Expresión de <i>ccmI-lacZ</i> durante el crecimiento | 31 |
| 5.5 Regulación de <i>ccmI-lacZ</i> por oxígeno | 33 |
| 5.6 Papel de <i>ntrC</i> y la vía biosintética de purinas sobre la expresión de <i>ccmI-lacZ</i> | 34 |
| 5.7 Papel de la disponibilidad del poder reductor sobre la regulación de la fusión <i>ccmI-lacZ</i> | 35 |
| 5.8 Construcción de la fusión <i>ccmEF-lacZ</i> | 36 |
| 5.9 Regulación de <i>ccmIEF-lacZ</i> | 36 |
| 6 DISCUSION | 38 |
| 7 CONCLUSIONES | 44 |
| 8 REFERENCIAS | 45 |

1. INTRODUCCION

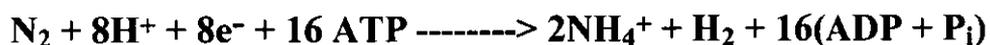
1.1 Fijación de nitrógeno en *Rhizobium*

Las especies de *Rhizobium* son bacterias fijadoras de nitrógeno saprófitas del suelo, cuyo metabolismo energético es obligatoriamente aeróbico. Las bacterias del género *Rhizobium*, tienen la capacidad de interactuar simbióticamente con las raíces de plantas leguminosas. Este tipo de asociación da origen a un órgano especializado conocido como nódulo; en el cual se lleva a cabo la fijación de nitrógeno. Durante el establecimiento de la simbiosis, las bacterias atraviesan un proceso de diferenciación a nivel morfológico y metabólico, denominándose a esta forma diferenciada como bacteroide. En el bacteroide, se lleva a cabo la fijación de nitrógeno bajo condiciones fisiológicas de microaerofilia. Esta condición es necesaria ya que el complejo enzimático de la nitrogenasa que es el encargado de fijar el nitrógeno, es sensible al oxígeno (Gallon, 1992)

Los genes de *Rhizobium* homólogos a los genes de fijación de nitrógeno de *Klebsiella pneumoniae* son conocidos como genes "*nif*". Otros genes, también esenciales para la fijación simbiótica de nitrógeno, pero que no tienen homología a *K. pneumoniae* son los denominados como genes "*fix*". Durante la simbiosis entre *Rhizobium* y la planta, ésta última provee a los bacteroides de sustratos de carbono para garantizar el poder energético y reductor necesario para la fijación de nitrógeno, a la vez de que la planta requiere de carbono y poder energético para poder asimilar el amonio, el cual es el producto de la fijación de nitrógeno (Haaker, 1988).

La fijación biológica de dinitrógeno a amonio es catalizada por el sistema enzimático de la nitrogenasa. La nitrogenasa convencional consiste de dos proteínas; la Ferro-proteína (Fe-proteína) y la proteína hierro-molibdeno (FeMo-proteína), que median coordinadamente la reducción dependiente de ATP del dinitrógeno. La reacción de fijación de nitrógeno (Ecuación 1), requiere de un donador de electrones y es acompañada por la hidrólisis de ATP-Mg_2^- a ADP-Mg_2^- y P_i . Se estima que se requiere de 2 moléculas de ATP por electrón donado al N_2 , es decir 16 moléculas de ATP por molécula de N_2 fijado (Gallon, 1991). Es por esta razón que para la fijación de nitrógeno, es necesario poseer una nitrogenasa activa y tener la capacidad de proporcionar a la enzima del ATP y electrones necesarios, provenientes del metabolismo celular. Los electrones son generalmente proporcionados por una flavodoxina reducida o una ferredoxina reducida.

Ecuación 1



Una propiedad única de la fijación biológica del nitrógeno es su extrema sensibilidad a la inactivación por oxígeno (O_2). La enzima nitrogenasa pura, sin importar su origen, es inactivada rápida y permanentemente al exponerla al O_2 . De aquí que la fijación de N_2 y la presencia de O_2 sean incompatibles (Gallon 1992). En la práctica, la aerobiosis y la fijación de nitrógeno coexisten debido a que los organismos fijadores de nitrógeno tienen que contender con reconciliar esta incompatibilidad (mantener la nitrogenasa activa en presencia del O_2). A lo largo de la evolución se han seleccionado una serie de estrategias que impiden o limitan el contacto entre la nitrogenasa y el O_2 , asegurando que cualquier contacto que ocurra resulte en una pérdida mínima de la capacidad de fijar N_2 .

Dentro de los bacteroides se mantiene una concentración intracelular baja de O_2 , debido a la presencia de una barrera a la difusión de O_2 localizada en la corteza interna del nódulo. Esta corteza interna está formada por una capa de células con paredes celulares gruesas y con numerosos espacios gaseosos intercelulares. Para sostener una velocidad óptima de fijación de nitrógeno, los bacteroides requieren de O_2 para la fosforilación oxidativa. La entrega de O_2 a las células infectadas lo realiza la proteína leghemoglobina (Appleby, 1984). La acción de la leghemoglobina asegura un abastecimiento continuo de O_2 lo que permite una respiración eficiente (Bergersen, 1984).

1.2 Respiración bacteriana

En términos generales la respiración bacteriana se puede definir como la transferencia termodinámicamente favorable de equivalentes reductores, a partir de un reductor a un oxidante y a través de una serie de componentes redox. Estos componentes están unidos predominantemente a la membrana citoplásmica y son denominados en su conjunto como cadena respiratoria. Este proceso está acompañado de un cambio grande en la energía libre, el cual depende de la diferencia de potencial de cada par redox en la secuencia. La transferencia de electrones de alta

energía por los complejos respiratorios, está acoplada a la translocación vectorial de protones al lado externo de la membrana, esto permite crear un potencial electroquímico de protones que puede ser utilizado para sintetizar ATP (Jones, 1988).

1.3 Cadenas respiratorias en *Rhizobium*

La transición de *Rhizobium* de un modo de respiración aeróbico al ambiente microaeróbico simbiótico es acompañado por cambios en la composición de los citocromos, indicando que la bacteria utiliza diferentes oxidasas terminales con diferente afinidad al oxígeno.

El esquema respiratorio mejor caracterizado genéticamente es el de *Bradyrhizobium japonicum* donde se han caracterizado los genes correspondientes a las citocromos oxidasas de tipo c: citocromo aa₃ y cbb₃ (Bott y col., 1990, 1992, Gabel y Maier., 1990, Preising y col., 1993). Se ha demostrado que la oxidasa cbb₃ es inducida en condiciones de crecimiento microaerofílico y que esta oxidasa es requerida para la formación de bacteroides fijadores de nitrógeno (Preising y col., 1993). Adicionalmente, se han identificado dos oxidasas de tipo hemo-Cu mediante la clonación de sus correspondientes genes (Bott y col., 1992; Surpin y col., 1994). Estas dos enzimas corresponden a un tercer citocromo c oxidasa y a un quinol oxidasa. De esta manera, el sistema respiratorio de *B. japonicum* posee aparentemente cuatro distintas oxidasas, las cuales son miembros de la superfamilia oxidasa hemo-Cu.

1.4 Cadenas respiratorias de *Rhizobium etli*

Las células de *R. etli* crecidas aeróbicamente en medio rico expresan citocromos tipo b y c, y dos citocromos oxidasas terminales, el citocromo bo₃, y el citocromo aa₃. El citocromo aa₃ se expresa parcialmente cuando las células se cultivan en medio mínimo y durante la simbiosis (Soberón y col., 1989). En *R. etli* se ha observado la expresión de una tercera citocromo oxidasa terminal, el complejo

citocromo d (Barquera y col., 1991a). Además se ha reportado la existencia de una vía respiratoria que no contiene citocromos, la cual tentativamente se ha propuesto que contiene una flavoproteína oxidasa dependiente de NADH (Barquera y col. 1991b), esta vía presenta una muy baja afinidad hacia el oxígeno (Barquera y col., 1991b).

La composición del sistema respiratorio de *R. etli* es muy parecida a la cadena respiratoria reportada en *B. japonicum* (Preising y col., 1996). La expresión de las diferentes oxidasas terminales de *R. etli* en vida libre está regulada por oxígeno. El citocromo aa₃ se expresa en cultivos aeróbicos en crecimiento exponencial, pero se reprime en condiciones microaeróbicas y crecimiento estacionario, condiciones en las que se induce el complejo citocromo d (Soberón y col., 1989; Barquera y col., 1991a, b). El citocromo bo₃, a su vez, se expresa tanto en condiciones aeróbicas como microaeróbicas (Soberón y col., 1990). La flavoproteína oxidasa dependiente de NADH se expresa en cultivos aeróbicos y semianaeróbicos, pero no se detecta en cultivos anaeróbicos o en bacteroides (Barquera y col 1991b).

1.5 Citocromo cbb₃

Este citocromo ha sido purificado de *Rhodobacter sphaeroides* (García Horsman y col., 1994), *R. capsulatus* (Gray y col., 1991) y *B. japonicum* (Preising y col., 1996), y caracterizada genéticamente en *B. japonicum*, *R. meliloti* (Kahn y col., 1993) y *Azorhizobium caulinodans* (Mandon y col., 1994). Las oxidasas de tipo cbb₃ carecen de las subunidades II y III equivalentes a las eucarióticas y en su lugar tienen dos citocromos de tipo c. Existen datos que indican que esta oxidasa puede bombear protones (Rati y col., 1994), sugiriendo que la subunidad I por si sola es suficiente para realizar esta función. Con excepción de las oxidasas de tipo cbb₃, todos los grupos prostéticos metálicos de las oxidasas tipo hemo-Cu se encuentran contenidas en las subunidades I y II.

Al complejo oxidasa terminal cbb₃ se le ha denominado como la oxidasa simbiótica, ésta tiene una alta afinidad por el oxígeno y es codificada por el operón *fixNOQP*. Su reciente caracterización bioquímica en *B. japonicum* ha producido datos que apoyan esta idea (Preising y col. 1996). La oxidasa purificada de

membranas de células crecidas anaeróbicamente tiene las propiedades de oxidar tanto al citocromo c como al colorante TMPD (N, N, N', N'-tetrametil-p-fenilendiamina).

La secuencia de aminoácidos confirmó la presencia de los productos genéticos de *FixN*, *FixO*, *FixP* y *fixQ*. Esta oxidasa terminal simbiótica, está compuesta por cuatro subunidades:

(1) El gen *fixN* codifica para una subunidad hemo cobre (SUI) y es un citocromo tipo b, que tiene al menos 12 hélices transmembranales, 4 histidinas conservadas como ligandos para el centro hemo-CuB, y otras histidinas que pudieran unir al menos otro hemo adicional, posiblemente un hemo B.

(2) *fixO* es un nuevo tipo de citocromo c monohemo anclado a membrana.

(3) *fixP* codifica para un citocromo tipo c dihemo que está anclado a la membrana con una duplicación interna de secuencia y alguna similitud a la clase c₆ de citocromos tipo c unidos a membrana (Preisig y col., 1993; Soberón y col., 1997).

(4) *FixQ*, es un producto genético pequeño el cual no se requiere para el funcionamiento de la oxidasa y tampoco para su ensamblaje.

1.6 Citocromos bacterianos tipo c

Los citocromos tipo c participan en una amplia cantidad de procesos transportadores de electrones, que permite a varias especies de bacterias crecer en diversas fuentes de energía (Pettigrew y Moore. 1987). Los citocromos tipo c son proteínas solubles en agua, localizadas en el periplasma de bacterias gram-negativas o son proteínas en el cual el (los) dominio(s) que contienen el hemo, están en el exterior de la membrana citoplásmica, anclados a la membrana por uno o más hélices transmembranales.

Los citocromos tipo c, a diferencia de los demás tipos de citocromos, se caracterizan porque tienen el grupo hemo unido covalentemente a la proteína. Este grupo incluye a los citocromos c, c₁, c₂, c₃, c₅₅₀, c₅₅₁ y c₅₅₈ en los cuales el grupo hemo se encuentra unido covalentemente a la proteína uniones tioéter. El ligamiento ocurre a nivel de dos distintos residuos de cisteínas del apocitocromo c (sitio de unión covalente para el grupo hemo, CxxCH), con los residuos vinilo 2 y 4 del grupo hemo (Taniuchi y col., 1983). La unión covalente del grupo hemo c a la cisteína se considera como una modificación evolutiva de la estructura del citocromo c, para

prevenir la disociación del mesohemo y la apoproteína, lo que permite a este tipo de citocromos funcionar en el periplasma ó en la superficie periplásmica (Pettigrew y Moore 1987)

En cuanto a las características estructurales de los citocromos tipo c que permiten el reconocimiento y pegado covalente del hemo, no se sabe si son importantes los residuos que flanquean el motivo CxxCH, ni si hay alguna discriminación de un aminoácido en particular en alguna de estas secuencias, o entre el espacio de residuos que hay entre las cisteínas.

Una vez que los citocromos de tipo c solubles son translocados al periplasma, su secuencia líder es removida por una peptidasa. En mitocondrias de *Neurospora crassa* se ha demostrado que el grupo hemo es ligado a apocitocromos c₁ antes de que éste sea procesado por la peptidasa (Nicholson y col., 1989b). De forma similar, en *B. japonicum* el grupo hemo es ligado al precursor del citocromo bc₁, independientemente de que el procesamiento de la secuencia señal se encuentre inhibido por mutación. (Thöny-Meyer y col., 1991), lo que sugiere que no se requiere la unión del hemo para que se lleve a cabo el procesamiento o bien que los dos pasos sean independientes uno del otro.

Análisis mutacionales en bacterias han implicado al menos la participación de 12 genes en el ensamblaje de citocromos tipo c (ver tabla 1), aunque no necesariamente estén todos estos genes en cada una de las bacterias estudiadas.

No se ha encontrado relación cercana de estos genes con los del genoma de *S. cerevisiae*, aunque se han encontrado contrapartes de algunos de estos genes bacterianos en mitocondrias o cloroplastos de ciertos eucariontes (Lang y col., 1997). Mutaciones bacterianas en alguno de estos genes (listados en la tabla 1) lleva a la pérdida de todos los citocromos tipo c (más de diez en algunos organismos).

Finalmente, el grupo hemo no debe estar solamente unido, sino que también los polipéptidos deben de doblarse en el periplasma. A la fecha no se conoce hasta que punto es asistido este proceso por otros productos génicos aparte de los listados en la tabla 1. El plegamiento del holocitocromo c representa el último de los pasos en la vía de maduración y es seguido por el ensamblaje con otros citocromos para formar un complejo respiratorio.

Tabla 1. (Genes implicados en la biogénesis de citocromos tipo c en bacterias gram-negativas).

| Productos génicos | Función sugerida | Conocido también como |
|-------------------|--|-----------------------|
| CcmA, CcmB, CcmC | Transporte (¿de hemo?) | HelABC; CycVWZ |
| CcmD | Desconocida | HelD; cycX |
| CcmE | Desconocida | CycJ |
| CcmG | Función de reducción en el periplasma para tioles y/o hemo | HelX; CycY |
| CcmF | Facilitación de la unión del hemo | Ccl1; CycK |
| CcmH | Facilitación de la unión del hemo | Ccl2; CycL |
| CcmI | Desconocida | CycH |
| DipZ | Transferencia de poder reductor al periplasma | DsbD |
| CcdA | Transferencia de poder reductor al periplasma | — |
| DsbA | Convertidor de SH a disulfito | — |
| DsbB | Oxirreductor de DsbA | — |

La nomenclatura es adoptada de *Escherichia coli* (genes involucrados en la maduración de citocromos tipo c), con algunos de los nombres alternativos más frecuentemente adoptados para otros organismos. Los genes *ccm* se han descrito de forma más completa en *Rhodobacter capsulatus*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Paracoccus denitrificans* y *Escherichia coli* (Page y col., 1998).

1.7 Biogénesis de citocromos tipo C

De acuerdo con todo lo que se ha reportado, se propone que la biogénesis de citocromos tipo c sigue una vía de eventos lineales (presentada en la siguiente lista), (ver Fig. 1 donde se presenta una sencilla versión de las vías de maduración de los tres diferentes tipos de citocromos c) (Thöny Meyer, 1997).

- 1) El citocromo tipo c es sintetizado inicialmente como una preapoproteína con una secuencia señal en el extremo amino.
- 2) La apoproteína es translocada como un polipéptido no plegado a través de la membrana en una vía que involucra el sistema de secreción dependiente.
- 3) Al tiempo que la región de cisteínas (sitios de unión al hemo) se mueven hacia el periplasma, son rápidamente oxidadas por el sistema DsbA/DsbB formando enlaces disulfuro.
- 4) Las cisteínas intramoleculares no son accesibles para la ligación del grupo hemo y, por lo tanto, deben subsecuentemente volverse a reducir por una tiorredoxina periplásmica, muy probablemente por CcmG. Se ha sugerido que DsbD es un reductante periplásmico y que pudiera estar involucrado en la regeneración de CcmG reducido que, a su vez, reduce a CcmH.
- 5) La ligación del hemo c se da en el lado periplásmico de la membrana. De esta manera, el hemo debe atravesar la bicapa lipídica, muy probablemente por transporte activo. Se han postulado dos distintos transportadores ABC como responsables de translocar el hemo, uno de ellos es codificado en el grupo de genes de biogénesis de citocromos tipo c, *ccmABC*.
- 6) El hemo debe ser liberado del transportador por CcmE, que es una proteína periplásmica de unión al hemo.
- 7) En el ambiente oxidativo del compartimento periplásmico, es probable que el hemo se oxide rápidamente, por lo cual es necesario evitarlo antes de que se de la ligación al apocitocromo. Puede postularse, por lo tanto, la existencia de una proteína reductora de hemo-hierro.
- 8) Apocitocromos y hemo deben ser presentados uno a otro en una conformación estérica favorable, de tal manera que sea posible la unión covalente.
- 9) El holocitocromo tipo c es liberado del motivo CCHL y plegado dentro de una estructura terciaria activa. Este, está ahora listo para su ensamblaje con otras proteínas.
- 10) El citocromo c soluble es liberado en el periplasma por una peptidasa. Este paso es independiente de la ligación del hemo y viceversa; y puede ocurrir antes de que el hemo sea ligado.

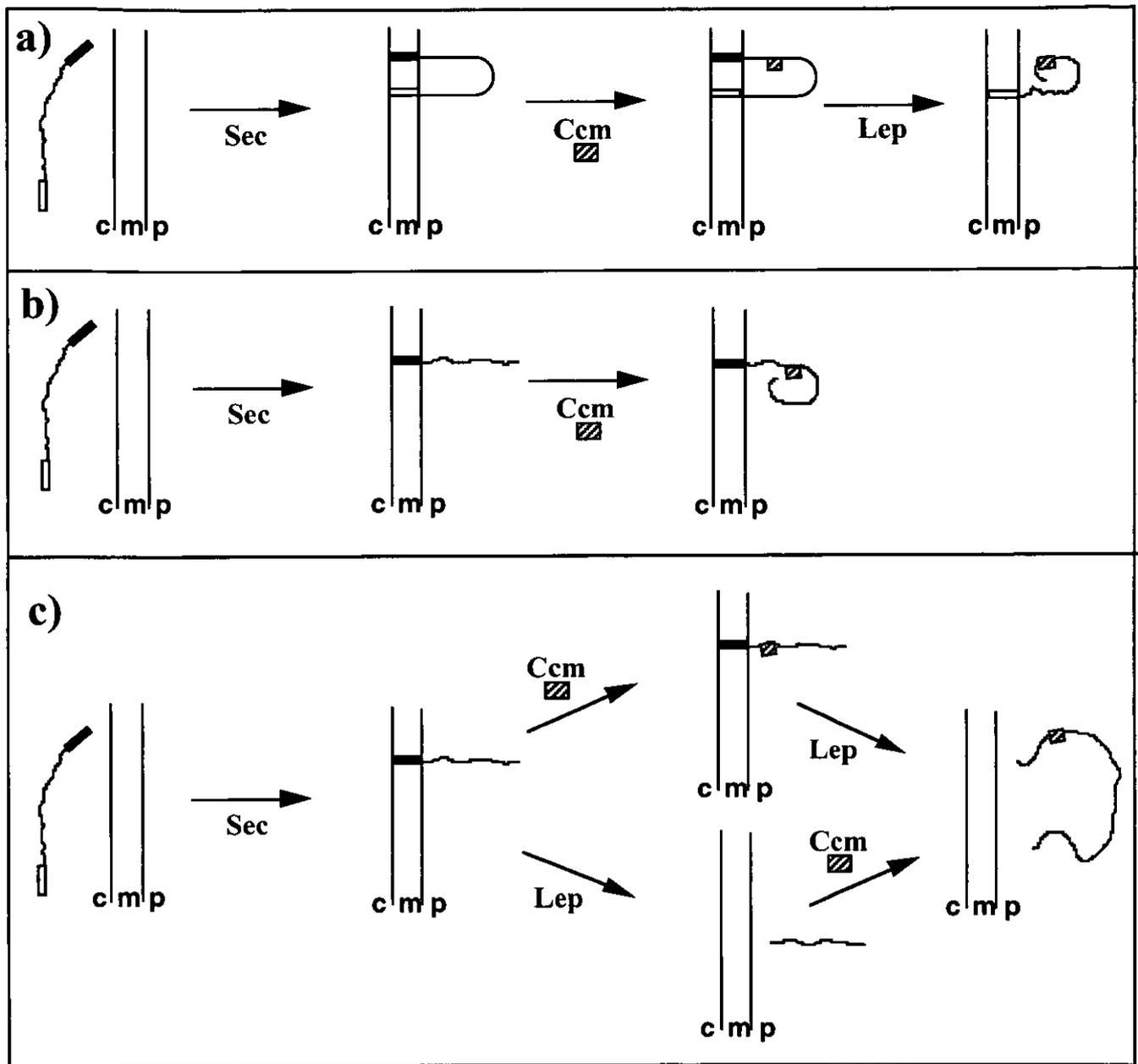


Figura 1. Modelo de maduración de citocromos tipo c. Las vías de maduración propuestas están basadas en la caracterización de intermediarios específicos para citocromos c₁ (a), citocromos tipo c unidos a membrana (b), y citocromos tipo c solubles (c). La barra negra representa la secuencia señal del extremo amino, la barra blanca representa el extremo carboxilo anclado a membrana, y los cuadros con diagonales representan el grupo hemo. El tipo de productos génicos requerido para cada paso en las vías está indicado junto con las flechas. Abreviaciones: **Sec**, subunidades del aparato general de secreción; **Ccm**, subunidades de un complejo de maduración específico para citocromos tipo c; **Lep**, peptidasa para el corte de la secuencia señal líder; **c**, citoplasma; **m**, membrana citoplásmica; **p**, periplasma (Thöny-Meller, L. 1997).

1.8 Genes *ccmIEFH* (*cycHJKL*)

En *Neurospora crassa* y *Saccharomyces cerevisiae*, dos enzimas hemoliasas, catalizan respectiva y específicamente el enlace covalente del grupo hemo a apocitocromos tipo c o c₁ (Dumont y col., 1987; Drygas y col., 1989). En bacterias, se ha sugerido que el operón *ccmIEFH* codifica para la hemoliasa. Aunque, existen datos contradictorios a esta sugerencia, ya que en *Helicobacter pylori*, a excepción de *ccmF*, no se han encontrado homólogos a *ccmIEH*, y sin embargo, es capaz de producir citocromos tipo c (Tomb y col., 1997).

En *R. leguminosarum*, *S. meliloti* y *Bradyrhizobium japonicum*, los genes *ccmIEFH* se encuentran en un solo operón. Este operón es esencial para la biogénesis de citocromos tipo c, ya que mutaciones en estos genes provocan incapacidad para fijar nitrógeno atmosférico, y parece ser causado por la ausencia de citocromos celulares tipo c. Esto es importante, ya que la oxidasa simbiótica terminal está compuesta por cuatro subunidades, de las cuales dos son citocromos tipo c (Delgado y col. 1995; Kereszt y col. 1995; Ritz y col. 1995).

Todas las mutantes en *ccmI* descritas, fallan para ensamblar y madurar citocromos tipo c. Se ha propone que CcmI puede considerarse como un factor de ensamblaje, que es capaz de seleccionar apocitocromos específicos y discriminar a otros en la unión de hemo; ya que se encontró que mutantes de *ccmI* en *B. japonicum* y *P. denitrificans* presentan una expresión residual de citocromos tipo c de membrana (Ritz, y col., 1993; Page y Ferguson, 1995). La topología membranal de esta proteína muestra que en el extremo amino existen dos probables hélices transmembranales y un lazo citoplásmico; el extremo carboxilo se encuentra en el periplasma (Thöny Meyer, 1997). Aparentemente, no se necesita una parte substancial del extremo carboxilo para la función de CcmI en la biogénesis de citocromos c₁, mientras que el ensamblaje de citocromos solubles tipo c es dependiente de esta parte de la proteína CcmI (Lang y col., 1996). En algunas circunstancias, en ausencia de CcmI, pueden haber niveles bajos de biogénesis de citocromos tipo c (Page y col., 1998).

CcmE (*cycJ*) es una proteína periplásmica que está anclada en su extremo amino a la membrana; esta proteína tiene en su secuencia de aminoácidos una histidina conservada, que puede estar involucrada en la unión del hemo (Thöny-Meyer, 1997). Esta proteína posiblemente puede actuar como un acarreador del hemo periplásmico, evitando la agregación de hemo libre. La reducción del hemo-ferro en el ambiente oxidativo del espacio periplásmico, puede ser otra posible

función de CcmE (Nicholson y Neupert, 1989; Thöny-Meyer, 1997; Reid y col., 1998).

CcmF (*cycK*) está unido a la membrana, es altamente hidrofóbico, y contiene de 12 a 15 hélices transmembranales, presenta lazos periplásmicos y lazos citoplásmicos. La alta proporción de aminoácidos aromáticos en los lazos periplásmicos, junto con un motivo WGGWWFWD que se sospecha está involucrado en la unión al hemo, sugiere que estos motivos pueden estar permitiendo la interacción con el anillo hidrofóbico de la porfirina del hemo (Thöny-Meyer 1994; von Heijne, G. 1992).

CcmH (*cycL*) es también una proteína periplásmica anclada a la membrana. Se ha postulado que CcmH es una proteína que se une al hemo en el periplasma; esta proteína presenta un motivo conservado LRCxxC, por lo que es probable que las cisteínas presentes se unan al hemo por enlaces disulfuro de forma intra o intermolecularmente y de esta manera permite interactuar al hemo con apocitocromos tipo c o con una tioredoxina periplásmica (Thöny-Meyer 1997).

1.9 *ccmIEFH* en otras bacterias.

En *Rhodobacter capsulatus* se ha encontrado la presencia de CcmI. CcmI está compuesto por dos dominios funcionales que pueden reconocer diferentes citocromos tipo c. El dominio amino terminal, que consiste de dos hélices transmembranales, es necesario para el ensamblamiento de citocromo c₁. No se ha identificado un homólogo de *ccmE* en *R. capsulatus*. *ccmF* y *ccmH* también se encuentran en *Rhodobacter capsulatus*, donde se conocen como *ccl1* y *ccl2*, respectivamente (Beckman y col., 1992).

También se han encontrado homólogos de los genes *ccmIEFH* en una variedad de bacterias, incluyendo a *Escherichia coli* (Thöny-Meyer y col., 1995), *Haemophilus influenzae* (Fleischmann, y col., 1995) y *Paracoccus denitrificans* (Page y Ferguson, 1995). De igual manera, se han identificado homólogos en cloroplastos (Ohyama y col., 1988) y en mitocondria (Pritchard y col., 1990).

En *E. coli*, el gen *ccmH* de *E. coli* codifica para una proteína fusionada en su extremo amino es similar a *ccmH* (*cycL*) y en su porción carboxilo es similar a *ccmI* (*cycH*) (Thöny-Meyer, 1997).

2 ANTECEDENTES

2.1 Mutantes de *R. etli* con alteraciones de citocromos y fijación de nitrógeno

En trabajos previos (Soberón y col., 1989, 1990, 1993; Tabche y col., 1998; Aguilar y col., 1996; Miranda y col., 1996), se reporta el aislamiento y caracterización de cepas mutantes de *R. etli* con alteraciones en la cadena respiratoria. Las cepas CFN4202 e IFC01 fueron aisladas por mutagenización con el fago mini-Mu y el transposón *Tn5*, respectivamente. Estas cepas presentan niveles disminuidos de citocromos tipo c; forman nódulos pero no infectan (CFN4202) o infectan muy poco (IFC01), y ninguna de ellas es capaz de fijar nitrógeno (Soberón y col., 1993; García, 1992 y Tabche, 1995). Se ha reportado que ambas mutantes están afectadas en el gen *ccmI* (Tabche, 1995), el cual se piensa que codifica junto con *ccmE*, *ccmF* y *ccmH* para una enzima (liasa) que tiene como función la de unir covalentemente el grupo hemo a los citocromos tipo c (Thöny Meyer, 1994). El fenotipo Fix⁻ de las cepas, CFN4202 e IFC01, afectadas en la biogénesis de citocromos tipo c, sugiere que existe una vía respiratoria que utiliza preferencialmente a los citocromos tipo c, y que ésta es esencial en los primeros estadios de la interacción simbiótica y para sustentar la actividad de la nitrogenasa.

2.2 Expresión de *fixNOQP* en *R. etli*, regulación por NTRC y AICAR

En *R. meliloti*, la expresión de los genes *fixNOQP* están regulados principalmente en respuesta a la disponibilidad del oxígeno, através de una cascada que detecta oxígeno, realizada por los productos de *fixL*, *fixJ* y *fixK*. Los genes *fixL* y *fixJ* son miembros de la familia de reguladores de respuesta de dos componentes, involucrado en controlar la expresión genética bacteriana en respuesta a cambios en el medio ambiente. El producto del gen *fixK* activa la transcripción del operón *fixNOQP* y regula negativamente su propio promotor (Batut y col., 1989).

En cuanto a la regulación de la oxidasa simbiótica terminal *cbb₃* (producto de *ficNOQP*), se tienen datos en el laboratorio que en una cepa mutante de *R. etli* en el gen *ntrC*, contrario a la cepa silvestre, sí se produjo la oxidasa terminal *cbb₃* cuando la bacteria se creció en vida libre, sugiriendo que *ntrC* juega un papel importante en controlar la producción de la oxidasa simbiótica en *R. etli*. La expresión de *fixN* no fue afectada en la cepa CFN2012 (*ntrC*⁻). De esta forma, que es posible que la

regulación negativa de la producción de la oxidasa terminal simbiótica por nitrógeno, sea uno de los puntos de control para la represión de la simbiosis cuando existe nitrógeno disponible.

Se ha postulado un posible papel de la biosíntesis de purinas en la simbiosis, ya que se han reportado auxótrofos de purina en *R. meliloti*, *R. leguminosarum biovar phaseoli* y *R. etli*, que tienen defectos en el establecimiento de la simbiosis (Swamynathan y Singh A., 1992; Newman y col, 1992; Newman y col, 1995; Djordjevic y col., 1995). El análisis de la expresión de una fusión *fixN-LacZ* de *R. etli*, muestran que en mutantes afectadas en diferentes pasos de la vía biosintética de purinas, el nivel de expresión fue tres veces mayor que en la cepa silvestre, excepto en la mutante *purH*, que presentó niveles similares a la silvestre (Soberón, y col., 1997). El producto del gen *purH* cataliza la conversión de AICAR a FAICAR e Inosina, por lo que esta molécula (AICAR), o un metabolito relacionado, pudiera ser la molécula represora de la expresión en la cepa silvestre. La adición de AICA ribósido disminuyó el nivel de la expresión en las mutantes en *purF*, así que probablemente las purinas afectan negativamente la producción de la oxidasa terminal *cbb₃* en *R. etli* (Soberón, y col., 1997).

El análisis espectral y el contenido de citocromos tipo c en la cepa silvestre, ha mostrado que la oxidasa simbiótica terminal no es detectable, todavía cuando la expresión del operón *fixNOQP* se induce en cierto grado. Por lo tanto, se propone que un proceso postranscripcional y no solamente transcripcional, puede limitar la producción de la oxidasa terminal *cbb₃* en *R. etli* en condiciones de vida libre. Por todo lo anterior, se juzga importante el estudiar si el metabolismo de las purinas o el efecto del amonio a través de *ntrC* puede modular no solo la transcripción del operón *fixNOQP*, sino también alguno de los pasos involucrados en la biogénesis de la oxidasa terminal *cbb₃*, como sería el paso catalizado por *ccmIEFH*.

3 OBJETIVO

Rhizobium etli es un organismo interesante desde el punto de vista energético. Este género expresa un sistema respiratorio ramificado y complejo cuya expresión y función están fuertemente influenciados por la fase de diferenciación en que se encuentre la bacteria. De tal forma, que resulta importante conocer el patrón de regulación del sistema respiratorio en *Rhizobium* en cultivo, para posteriormente explorar el proceso durante la simbiosis. El conocimiento obtenido de la expresión de los citocromos nos permitirá plantear estrategias para el diseño de cepas con una capacidad incrementada para fijar nitrógeno.

Este proyecto es parte de un proyecto más amplio del grupo del Dr. Mario Soberón, que pretende estudiar los mecanismos moleculares que regulan la expresión genética y la biogénesis de los diferentes componentes de las cadenas del transporte de electrones que operan en *R. etli* en vida libre y durante la simbiosis. Este objetivo se pretende llevar a cabo a través de identificar, aislar y caracterizar los genes estructurales y reguladores, relacionados con la biogénesis de las enzimas que participan en las cadenas del transporte de electrones. La estrategia con la que se ha venido logrando estos objetivos, ha sido principalmente mediante el aislamiento y caracterización de mutantes que tienen afectada la respiración.

3.1 Objetivo general

Estudiar la participación de los genes *ccmIEFH* cromosomales de *R. etli* en la maduración de citocromos tipo c.

3.2 Objetivos específicos

- 1.- Determinar la organización transcripcional de los genes *ccmIEFH*.
- 2.- Determinar la transcripción de estos genes en medio de cultivo.

3.3 Tareas de investigación

- 1.- Mapear el promotor de *ccmI* y estudiar la posible existencia de otros promotores en el operón *ccmIEFH*.
- 2.- Hacer fusiones transcripcionales con el gen de *lacZ*, del promotor cromosomal del gene *ccmI* y *ccmEF*; clonar las construcciones obtenidas en la cepa silvestre de *Rhizobium etli* y mutantes que se tienen en el laboratorio.
- 3.- Medir la actividad de β -galactosidasa de las cepas construidas, creciendo en diferentes condiciones de cultivo.

4 MATERIALES Y METODOS

4.1 Cepas bacterianas y plásmidos utilizados

Las cepas y plásmidos utilizados se resumen en la tabla 4.1.

Tabla No. 4.1: Cepas bacterianas y plásmidos utilizados.

| Cepas | Características relevantes | Fuente o referencia |
|------------------|--|-----------------------|
| <i>R. etli</i> | | |
| CFN42 | Cepa silvestre, Nod ⁺ Fix ⁺ | Quinto y col., 1982 |
| CE-3 | Sm ^r , derivada de CFN42 | Noel y col., 1984 |
| CFN2012 | ntrC::Tn5 derivada de CE3 | Moreno y col., 1985 |
| CE-106 | PurF::Tn5 mutant | Noel y col. 1988 |
| SAM100 | <i>phaC</i> ::Ω-Km ^r derivada de CE3 | Cevallos y col., 1996 |
| CFNX186 | cepa derivada de <i>Rhizobium etli</i> carente del plásmido f. | Brom y col., 1992 |
| <i>E. coli</i> | | |
| S17-1 | Cepa conteniendo un RP4 cromosomalmente, que permite la movilización de plásmidos. | Simon y col., 1983. |
| plásmidos | | |
| pMP220 | Vector útil para fusiones transcripcionales lacZ, Tc ^r | Spaink y col., (1987) |
| pML7 | Plásmido derivado de pKS bluescript portando un inserto (EcoRI-EcoRI) de 2.8 kb que lleva los genes <i>ccmI</i> , <i>ccmE</i> , y 219 pb de <i>ccmF</i> , además de 1058 nucleótidos cuesta arriba del inicio de traducción de <i>ccmI</i> | Tabche, 1995 |
| pSK o pKS | Vector de clonación con un pollinker de 21 sitios únicos, Bluescript, <i>colE1</i> , <i>f1</i> , promotor <i>lacZ</i> , Amp ^r . | Stratagene |
| pJR-744psk | Plásmido derivado de psK portando un inserto de 0.744 kb conteniendo el promotor del gen <i>ccmI</i> cromosomal de <i>Rhizobium etli</i> . | Este trabajo |
| pJR-0.748 | Plásmido derivado de pMP220 portando un inserto de 0.748 Kb conteniendo el promotor del gen <i>ccmI</i> cromosomal de <i>Rhizobium etli</i> . | Este trabajo |
| pJR-0.852 | Plásmido derivado de pMP220 portando un inserto de 0.85 Kb conteniendo 135 pb de <i>ccmI</i> , el gen <i>ccmE</i> y 219 pb de <i>ccmF</i> . | Este trabajo |

4.2 Medios de cultivo

4.2.1 Medio Rico PY (Peptone-Yeast): Para el crecimiento de *E. coli* ó *Rhizobium*, que consiste de peptona de caseína al 0.5%, extracto de levadura al 0.3%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 7 mM. (Noel y col., 1984).

4.2.2 Medio Mínimo (MM): Para crecimiento de *Rhizobium* en vida libre, que consiste de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4056 mM, K_2HPO_4 1.263 mM, ácido succínico 5 mM pH 6.8, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.5 mM, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0407 mM, NH_4Cl 10 mM.

4.2.3 Medio YS (Yeast-Succinato): Para crecimiento de *Rhizobium* que consiste de K_2HPO_4 2.87 mM, KH_2PO_4 3.674 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.8113 mM, NaCl 1.71 mM, Extracto de levadura 0.5%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.272 mM pH 6.8, ácido succínico 5 mM pH 6.8.

4.2.4 Medio LB (Luria-Bertani): Para crecimiento de *E. coli* que consiste de peptona de caseína al 1%, extracto de levadura al 0.5%, NaCl al 1 %, el medio a pH 7.2.

Nota: Para medios sólidos se les agregó agar a una concentración final de 1.5%.

4.3 Condiciones de cultivo

La temperatura de crecimiento para *R. etli* fue de 30°C y para *E. coli* de 37°C. Los cultivos en medio líquido fueron agitados a 200 rpm durante el tiempo requerido para cada experimento; los cultivos en medio sólido fueron incubados hasta observar colonias aisladas (aproximadamente 3 días para *R. etli* y de 24 hrs para *E. coli*).

4.4 Antibióticos:

| Antibiótico | Notación | Concentración final en el medio * |
|------------------|-------------------|-----------------------------------|
| Acido Nalidíxico | Nal ²⁰ | 20 (µg/ml) |
| Estreptomina | Sm ²⁰⁰ | 200 (µg/ml) |
| Kanamicina | Km ⁵⁰ | 50 (µg/ml) |
| Tetraciclina | Tc ¹⁰ | 10 (µg/ml) |

4.5 Soluciones amortiguadoras

4.5.1 Tris Acetatos (TAE): Solución amortiguadora que consiste de $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})$ Tris base 0.4 M, CH_3COOH ácido acético glacial 0.2 M pH 8, EDTA 10 mM.

4.5.2 Taurina (gel buffer glicerol): Tris Base 90 mM, Taurina 29 mM, $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5 mM.

4.6 Enzimas e isótopos

Las endonucleasas de restricción, ligasa de T4, fueron obtenidas de la compañía BOEHRINGER MANNHEIM y los isótopos se obtuvieron de AMERSHAM, Co. utilizados conforme indicaciones del fabricante (Maniatis y col., 1982)

4.7 Aislamiento, purificación y verificación de DNA plasmídico

Para aislar los plásmidos, se inocularon las cepas portadoras, en 5 ml de medio Lb líquido más el antibiótico al cual son resistentes, incubándolas durante 24 hrs a 37°C en agitación (200 rpm) en tubos de ensaye estériles (13 x 100). Se colocó 3 ml del cultivo en un tubo eppendorf y se centrifugó durante 20 seg a 14,000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 175 µl de

TES (15% de sacarosa; TRIS 50 mM pH 8; EDTA 50 mM pH8). Se le adicionó 25 µl de lizozima (stock a 10 mg/ml), se mezcló suavemente por inversión y se incubó en hielo durante 20 minutos. Se adicionó entonces 400 µl de agua ultrapura helada y se mezcló suavemente por inversión incubando 15 minutos a 73°C. Posteriormente se centrifugaron los tubos 15 minutos a 14,000 rpm. En el fondo de los tubos de centrifugado se forma un sedimento viscoso (de material celular), que lleva DNA genómico, y se extrajo mediante un palillo nuevo y estéril, quedando solo el sobrenadante en el tubo; se adicionó 60 µl de NaClO₄ 5M al sobrenadante y se mezcló suavemente por inversión. Fue precipitado con 600 µl de isopropanol. El DNA plasmídico, se mezcló por inversión y se centrifugó la mezcla durante 15 minutos a 14,000 rpm, se decantó el isopropanol, se lavó la pastilla con etanol al 70%, se decantó el etanol y se secó la pastilla (DNA plasmídico) con vacío o a 45°C. Las muestras se almacenaron a -20°C para su uso posterior. El DNA plasmídico obtenido de esta manera, aun cuando no está muy limpio, se puede utilizar para fines de clonación; la ventaja de este método reside en la gran cantidad de DNA plasmídico obtenido en comparación con otras técnicas.

Para utilizar el DNA plasmídico para otros fines como el de PCR, se necesitó purificarlo utilizando el siguiente método. Se resuspendió la pastilla en 100 µl de agua desionizada, se agregaron 300 µl de fenol saturado a los tubos y se agitaron en vórtex. Se agregaron 300 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se agitaron en vórtex. Se centrifugaron entonces a 14,000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo. Los tres últimos pasos se repitieron hasta que la interfase fenol-DNA quedara limpia. Se le adicionaron entonces 2.5 volúmenes de etanol absoluto (100%) y se mezcló por inversión. Se pusieron los tubos en un ultracongelador (-70°C) durante 15 min, para obtener una mejor precipitación del DNA. Posteriormente se centrifugaron durante 10 min a 14,000 rpm a 4°C. Se decantó el etanol y se lavaron las pastillas con 200-500 µl de etanol al 70 %. Las pastillas se secaron con vacío o a 45°C y se resuspendieron en 20 µl de TE-RNAasa o agua desionizada guardando a -20°C.

La presencia del plásmido se verificó por electroforesis en geles de agarosa, se tomaron 5 µl de cada muestra de DNA plasmídico y se agregó 1 µl de colorante "Dye mix" (Azul de bromofenol 0.25%; Xilen-cianol 0.25%; TAE 1%; Ficol 20%), se colocaron en los carriles de un gel horizontal de agarosa al 1%

con TAE 1X (Trizma base 4.83gr, EDTA sódico 0.372 gr y Acetato de sodio 0.68 gr x lt). La electroforesis se llevó a cabo a 100 V durante el tiempo necesario y que dependió del tamaño de los plásmidos o fragmentos deseados, usando como amortiguador de corrida TAE 1X. El gel se tiñó con bromuro de etidio (300 µg/lt dH₂O) durante 15 min y se trasladó a una pantalla de luz U.V. para verificar las bandas correspondientes a los plásmidos purificados y así de esta manera constatar su presencia dentro de las bacterias candidatas.

4.8 Construcción de las fusiones con *lac-Z*.

Se diseñó de manera precisa una estrategia para clonar el promotor de *ccmI*. Para ello se amplificó un fragmento de DNA mediante la técnica de PCR, utilizando como oligo "Upper Primer" la secuencia del primero T7 (localizado cuesta arriba del fragmento *ccmIEFH*) 5'GTAATACGACTCACTATAGG3' ya que el DNA molde usado fue extraído a partir del plásmido pML7, y para fines de clonación, se utilizó como oligo "lower primer" la secuencia 5'GCTCTAGAGCTGCGATGGCAGATC3', diseñado para insertar un sitio de restricción *XbaI* a una distancia de 345 pb cuesta abajo del inicio de traducción de *ccmI*. El fragmento amplificado se digirió con las enzimas *PstI* y *XbaI*, liberando un fragmento, el cual se clonó al plásmido vector pSK. De la construcción resultante (plásmido pJR-744psk), se consideró un sitio de restricción *EcoRI* en el polilinker del vector (pSK), y el plásmido se digirió con las enzimas *EcoRI* y *XbaI*. El fragmento derivado se subclonó al plásmido reportero pMP220. Por otra lado, para la fusión *ccmEF-lacZ*, se digirió el plásmido pML7 con las enzimas *BamHI* y *EcoRI*, y el fragmento liberado se subclonó al plásmido pMP220, el cual fué previamente digerido con las enzimas *BglII* y *EcoRI* (los sitios *BglII* son compatibles con los sitios *BamHI*).

4.9 Construcción de cepas de *Rhizobium etli*.

Los plásmidos construidos se introdujeron a las distintas cepas de *R. etli*, mediante conjugación bacteriana utilizando el siguiente protocolo:

4.9.1 Crecimiento de cultivos bacterianos: Se inoculó cada una de las cepas a conjugar en 2 ml de medio rico PY ó Lb (dependiendo si era *Rhizobium* ó *E. coli*) adicionado con sus respectivos antibióticos de selección. El cultivo se incubó a 30°C durante 24 hrs en agitación (200 rpm).

4.9.2 Extracción y lavado de células bacterianas: Se centrifugó 1.5 ml del medio saturado en un tubo eppendorf estéril en cada condición, a una velocidad de 14,000 rpm durante 30 segundos. Se desechó el sobrenadante, y se resuspendió la pastilla en 1 ml de MgSO₄ 10 mM, estéril. Se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm durante 3 min. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla, esta vez, en 20 µl de MgSO₄ 10 mM; esto se hizo para cada cepa por separado.

4.9.3 Cruza bacteriana: Se mezclaron en un tubo éppendorf estéril las cepas a conjugar, (cepas donadoras del plásmido y cepas receptoras del plásmido a una relación 1:5), agitando en vórtex durante 20 segundos. Se tomaron 30 µl de cada mezcla, y se sembró con una gota (formando un parche) en cajas petri con medio PY sin antibiótico. Las cajas petri se incubaron a 30°C durante 24 hrs.

4.9.4 Aislamiento de bacterias: Con un asa bacteriana estéril, se tomaron las bacterias del parche formado, transfiriéndolas a un tubo eppendorf estéril. La muestra se resuspendió en 1 ml de MgSO₄ + Tween 0.1% (detergente) estéril. Se centrifugó entonces durante 15 seg a 14,000 rpm (centrífuga eppendorf 5415 C) y se decantó el sobrenadante. La pastilla se recuperó en 350 µl de MgSO₄ + Tween 0.1% estéril, del cual se tomaron diferentes muestras (50, 100 y 200µl). Cada muestra se distribuyó separadamente con una espátula de vidrio estéril en cajas petri, con PY suplementado con los antibióticos adecuados para hacer un medio de selección (dependiendo de las células conjugadas), para

aislar de esta manera las bacterias de *R. etli* que hubieran recibido el plásmido (resultantes de la conjugación, y que son Tc^r).

Tabla 3.2 Protocolo esquemático para la obtención de las cepas de *Rhizobium* portando el plásmido pJR-0.748 ó pJR-0.852.

| <i>CEPAS CONJUGADAS</i> | <i>CEPA RESULTANTE (resistente a)</i> |
|--------------------------|---|
| CE-3 + S17.1/pJR0.748 | CE-3/pJR0.748 (Nal ^r Sm ^r Tc ^r) |
| CE-3 + S17.1/pJR0.852 | CE-3/pJR0.852 (Nal ^r Sm ^r Tc ^r) |
| CFN2012 + S17.1/pJR0.748 | CFN2012 /pJR0.748 (Nal ^r Sm ^r Km ^r Tc ^r) |
| CFN2012 + S17.1/pJR0.852 | CFN2012/pJR0.852 (Nal ^r Sm ^r Km ^r Tc ^r) |
| CE-106 + S17.1/pJR0.748 | CE-106/pJR0.748 (Nal ^r Sm ^r Km ^r Tc ^r) |
| CE-106 + S17.1/pJR0.852 | CE-106/pJR0.852 (Nal ^r Sm ^r Km ^r Tc ^r) |
| SAM100 + S17.1/pJR0.748 | SAM100/pJR0.748 (Nal ^r Sm ^r Km ^r Tc ^r) |
| SAM100 + S17.1/pJR0.852 | SAM100/pJR0.852 (Nal ^r Sm ^r Km ^r Tc ^r) |

4.10 Mapeo del inicio de transcripción

Se utilizó como primero un oligonucleótido sintético diseñado a partir de la secuencia de DNA cromosomal (GTTCTGACGGCAGCCGTCGCCT) de *ccmI*, éste oligo se encuentra localizado a 21 nucleótidos cuesta abajo del inicio de la traducción de *ccmI*. A fin de trabajar con la copia cromosomal de *ccmI*, el RNA mensajero se obtuvo de células de la cepa CFNX186 (mediante el paquete High Pure RNA isolation Kit, de la compañía BOEHRINGER MANNHEIM), que fueron crecidas y colectadas a 8 hrs de incubación, en medio rico Py a 30°C. De igual forma, se extrajo RNA mensajero de las cepas CE-3 y CE-3/pJR0.748 crecidas en las mismas condiciones que la cepa CFNX186. El DNA templado utilizado para las secuencia, se purificó a partir de la clona pML7.

El Oligo se marcó mediante la siguiente reacción en un volumen total de 20 µl: Oligo 10 pMol, Buffer PNK (10X) 2 µl, γ-ATP ³²P 25 µCuries, Enzima PNK (Polinucleotido Cinasa) 4 µl de una dilución 1:10 con H₂O. La reacción se incubó 1 hora a 37°C y después se inactivó a 95°C durante 3 minutos.

La reacción de empalme entre el RNA y el oligo, se realizó con la siguiente reacción en un volumen total de 20 μ l: Tris 1M pH8, 0.66 μ l; NaCl 2.5M, 1.66 μ l; Oligo marcado, 1 pmol; RNA 30 μ g. La reacción se incubó tres minutos a 90°C y se dejó enfriar hasta alcanzar la temperatura de 42°C, entonces se procedió a llevar a cabo la reacción de retrotranscripción (RT), agregando al coctel anterior RNAsina (inhibidor de RNAsa) 0.5 μ l; Buffer RT (5X), 7.4 μ l; dnTPS (2.5 mM), 2.0 μ l; DTT 10 mM, 3.7 μ l; Enzima transcriptasa reversa, 0.5 μ l; H₂O, 3.0 μ l. La reacción se incubó 1 hora a 42°C, el DNA se precipitó al vacío y se resuspendió en 5 μ l de buffer "Stop mix" (solución que contiene formamida; Azul de bromofenol, 0.25%; y Xilen-cianol, 0.25%); ésta fue la muestra para un gel de poli-acrilamida (Urea 7M, Tris Base 90 mM, Taurina C₂H₇NO₃ 29 mM, Na₂EDTA·2H₂O 0.5 mM, acrilamida 2.8 M, persulfato de amonio (NH₄)₂S₂O₈ 4.4 mM, Temed 2.15 mM), junto con una reacción de secuencia ocupando el DNA template y el mismo oligo. La reacción de secuencia se llevó a cabo utilizando el paquete "Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing kit", de la compañía Amersham LIFE SCIENCE. La secuencia y el inicio de transcripción se identificaron en películas para autorradiografía (High performance chemiluminescence film, de la compañía Amersham LIFE SCIENCE) que fueron expuestas por contacto al gel donde se corrieron las muestras.

4.11 Crecimiento de *Rhizobium* en medio líquido

Para evaluar el crecimiento de las cepas de *R. etli*, se determinó la cinética de crecimiento en medios líquidos, PY, YS y MM, procediendo de la siguiente manera: se sembraron las distintas cepas de *R. etli* en medios de PY sólido en caja petri, a partir de células almacenadas en glicerol al 20%, a -70°C, y se dejaron incubar los medios durante tres días (o hasta ver colonias aisladas) a 30°C, después se procedió a sembrar las bacterias en medio PY líquido con sus respectivos antibióticos de selección, incubando a 30°C y 200 rpm en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de medio estéril. Transcurrida 12 hrs (cuando las células se encuentran en fase exponencial de crecimiento), se tomaron dos alícuotas de medio para los ensayos de Lowry y β -galactosidasa, lo mismo a las

36 hrs de crecimiento (fase de crecimiento estacionario). A las 36 hrs, cada cultivo se midió a 540 nanómetros (nm) de dispersión de luz para verificar que crecieron a saturación (~ 1 D.O.₅₄₀), esto se hizo tomando 1 ml de cada cultivo. Se centrifugó 30 ml de la suspensión de bacterias en tubos de centrífuga estériles de 40 ml, durante 5 min a 10,000 rpm a 4°C, se decantó el medio y se resuspendió la pastilla en agua destilada estéril. Se centrifugó otra vez en las mismas condiciones y se decantó el sobrenadante. La pastilla formada se resuspendió en el mismo volumen de Sulfato de Magnesio 10 mM en un volumen comparable al sobrenadante anterior (1ml). Se midió la D.O.₅₄₀ de la suspensión y se calculó el volumen de inóculo, para añadir en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de medio YS para obtener una D.O.₅₄₀ final de 0.05 en cada matraz. Ya inoculados los matraces se pusieron en agitación a 200 rpm a 30°C. Se tomaron dos alícuota de cultivo a las 36 hrs de crecimiento para los ensayos de Lowry y β -galactosidasa. De la misma manera que los cultivos provenientes de PY, se ocuparon estos cultivos de YS (36 hrs de crecimiento) para inocular otros matraces ya sea de YS o MM y se tomaron alícuotas de medio a las 8 y 36 hrs de crecimiento para los ensayos de Lowry y β -galactosidasa.

4.12 Cinéticas de crecimiento y expresión de actividad de β -galactosidasa

Para las cinéticas de crecimiento y expresión de actividad β -galactosidasa, se hizo los ensayos de la misma manera que en la sección 4.11, a excepción de que las alícuotas en el último cultivo, ya sea YS o MM, se tomaron cada 4 hrs durante 36 hrs de crecimiento. La cinética se siguió tanto por D.O.₅₄₀ como por expresión de actividad de β -galactosidasa.

4.13 Determinación de actividad enzimática de β -galactosidasa.

La medición de la actividad enzimática de β -galactosidasa de las diferentes cepas de *Rhizobium etli* fue llevada acabo de la siguiente manera: se inocularon las cepas en matraces Erlenmeyer con 100 ml de medio (ya sea PY, YS o MM) a

una concentración final en el medio de 0.05 de absorbencia a 540 nm, al inicio del crecimiento. Para medir cada una de las actividades enzimáticas en cada condición, se tomaron dos alícuotas del cultivo, calculando tomar el equivalente a 1 ml de células a una DO_{540} de 0.7. Las células se sedimentaron a 10,000 rpm, durante cinco minutos y la pastilla formada se resuspendió en 500 μ l de $MgSO_4$ 10 mM, y se agitaron vigorosamente en vórtex durante 10 segundos. Se tomó 100 μ l para la determinación de proteína por Lowry, y otros 100 μ l para los ensayos de β -galactosidasa, que se añadieron a 900 μ l de buffer Z ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 60 mM, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 40 mM, KCl 10 mM, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 mM, β -mercaptoetanol 50 mM) en tubos de ensaye (13 x 100); se añadieron 30 μ l de SDS 0.1% y 30 μ l de cloroformo, y se agitó el tubo vigorosamente en vórtex durante 10 segundos, de esta manera las células se rompen y liberan la β -galactosidasa, incubando después la mezcla 5 minutos a 30°C antes del ensayo. Se añadieron entonces 200 μ l de inductor ONPG (O-nitrofenil- β -D-galactosido) (4 mg/ml en buffer de fosfato 0.1 M pH 7= solución equimolar Na_2HPO_4 0.05M, NaH_2PO_4 0.05 M) y se mezcló bien, se esperó hasta ver un color amarillo, y se paró la reacción agregando y mezclando bien, 500 μ l de Na_2CO_3 1M. Se centrifugaron las muestras 5 minutos a 3,000 rpm, se tomó 1 ml del sobrenadante y se leyeron en un espectrofotómetro a 420 nm de absorbencia.

4.14 Determinación de proteína por el método Lowry

Se tomaron los 100 μ l de células resuspendidas en 500 μ l de $MgSO_4$ 10 mM + SDS y cloroformo (ver párrafo anterior) y se adicionaron a 900 μ l de agua en tubo de ensaye (16 x 125), se agregaron tres ml de solución AB (solución A= Na_2CO_3 188.7 mM, NaOH 100 mM, tartrato de Na y K 5.6 mM, SDS 34.6 mM; solución B= $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 4%. A una relación 99:1 de solución A:B) se mezcló en vórtex y se incubó 40 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 300 μ l de una mezcla 1:1 folín:agua y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Se tomó la lectura de la muestra en espectrofotómetro a 600 nm de absorbencia, calculado los mg de proteína utilizando como referencia una curva standard de albúmina de bovino.

4.15 Análisis de datos

Los valores obtenidos para proteína y β -galactosidasa, se procesaron en computadora mediante una hoja de cálculo (utilizando el programa Microsoft Excel). Las fórmulas utilizadas fueron las siguientes:

$$\text{Actividad de } \beta\text{-galactosidasa: Unidades/ml} = \frac{\text{DO}_{420} \times 1.76 \times \text{dilución}}{0.0045 \times t(\text{min})}$$

donde **una unidad** es la cantidad de enzima que se requiere para producir 1 nmol de o-nitrofenol/min a 30°C.

1 nmol OD₄₂₀=0.0045 en una cubeta de 1 cm.

1.76 es el volumen total en ml, en donde se llevo a cabo la reacción.

Actividad específica: La actividad específica se obtuvo dividiendo la actividad enzimática entre la proteína total del extracto usado en el ensayo, y se expresa como unidades/mg de proteína. Los datos se graficaron utilizando el mismo programa.

5 RESULTADOS

5.1 Mapeo del inicio de transcripción de *ccmI*

Con el objetivo de mapear el inicio de transcripción del gen *ccmI*, así como la localización de su promotor, se hicieron ensayos de extensión del primero, utilizando el oligo *cycHeft* (derivado de la secuencia cromosomal de *ccmI*), el cual tiene una longitud de 22 nucleótidos, cuyo inicio se localiza a 20 pb cuesta abajo del inicio de traducción de *ccmI* (Fig. 5.1.a).

Los resultados obtenidos con el ensayo de extensión del primero dió una señal que se localiza en una adenina (Fig. 5.1.b, que viene siendo el primer nucleótido del ATG (inicio de traducción) de *ccmI*. A partir de esta señal, se buscaron las posibles regiones -10 y -35 en la secuencia para encontrar el posible promotor de este gen (fig 5.1). Aún, no obstante de encontrar las posibles regiones, -10 y -35, no se observó la presencia de una secuencia Shine-Dalgarno, tomando como punto de partida esta señal de inicio de transcripción.

| | |
|---|-----|
| GCCTGGT'TG AAATCGT'TTC CAACCTGAAT TCGGGCGAAT AGCCTCAAAT | 50 |
| CTTCGICATT CCGGCTT'TGG CAGTIGGAAT AGGGTGGGCT TCACGTAATT | 100 |
| GGCCGATA* GCTGTTCTGG ATTCTGGTTG CGGTICTGAC GGCAGCOGIC | 150 |
| Me tLeuPheTrp IleLeuValA laValLeuTh rAlaAlaVal | |
| GCCTTCATCC TGCTCTACCC CCTTCTGGGT GGIGCGAAGG CGGC GCAGAA | 200 |
| AlaPheIleL euLeuTyrPr oLeuLeuArg GlyAlaLysA laAlaGlnAs | |

* señal de la extensión del primero

Figura 5.1.a Muestra el sitio de pegado del *primero cycHeft*, además de la señal de inicio de transcripción (*), que se obtuvo con el ensayo de extensión del primero, así como las posibles regiones -10 y -35 (cuadros sombreados).

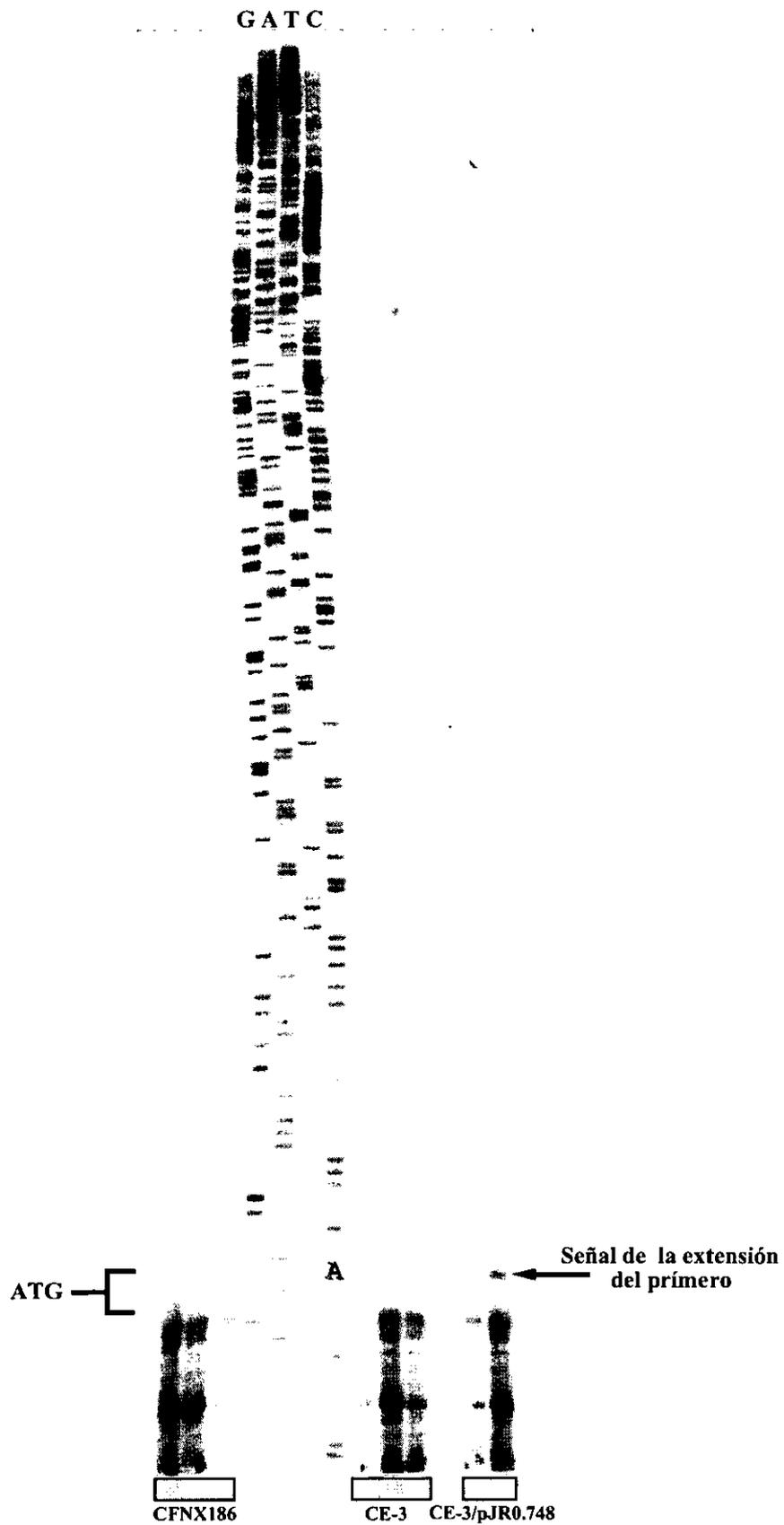


Figura 5.1.b : Análisis de la extensión del primero del gen *ccmI* en *R. etli*. El inicio de la transcripción fue mapeado en la Adenina (A) del inicio de traducción de *ccmI* (ATG), cada línea contiene diferentes concentraciones de RNA 90 60 30 μg.

5.2 Construcción de la fusión *ccmI-lacZ*

Debido al interés en obtener un conocimiento más extenso sobre la participación que tienen los distintos genes involucrados en la biogénesis de la oxidasa terminal simbiótica *cbb₃*, se estudió la regulación del operón *ccmIEFH* de *R. etli* (el cual se propone que actúa uniendo covalentemente el grupo hemo a citocromos tipo c). Para ello, fue necesario hacer una fusión transcripcional del promotor del operón *ccmIEFH* con el gen reportero *lacZ*. Esto se realizó amplificando un fragmento de ADN cromosomal de *R. etli* de 1478pb, el cual lleva 345pb cuesta abajo del sitio de inicio de traducción del gen *ccmI* y 1123pb cuesta arriba de este mismo sitio (ver Material y Métodos). A partir de este fragmento de ADN amplificado, se cortó un fragmento (*PstI-XbaI*) de 744 pb, el cual se subclonó al plásmido vector pSK (ver Material y Métodos), resultando el plásmido pJR-744pSK. A partir de esta construcción se subclonó un fragmento (*EcoRI-XbaI*) de 748pb al plásmido reportero pMP220 (ver Material y Métodos), resultando el plásmido pJR-0.748 (el cual lleva un fragmento de DNA con 399 pb cuesta arriba del inicio de traducción de *ccmI* y 345 pb cuesta abajo de este mismo inicio de traducción, fusionado transcripcionalmente al gen reportero *lacZ*. (fusión *ccmI-lacZ*) (Fig 5.2).

5.3 Expresión de la fusión *ccmI-lacZ* en cultivos exponenciales y estacionarios de YS.

En *Rhizobium*, la producción de citocromos tipo c es más abundante durante el crecimiento exponencial, que en la fase de crecimiento estacionario. Por esta razón, se estudió la regulación de *ccmI-lacZ* durante el crecimiento, y para ello se transfirió el plásmido pJR-0.748 (fusión *ccmI-lacZ*), a la cepa silvestre CE-3 de *R. etli*, dando lugar a la cepa CE-3/pJR-0.748, en la cual se determinó la actividad de la expresión del promotor de *ccmI*, mediante ensayos de β -galactosidasa en células crecidas y colectadas a 12 horas (crecimiento exponencial) y 36 horas (crecimiento estacionario) de incubación en medio YS, MM y PY (como se indica en Materiales y Métodos).

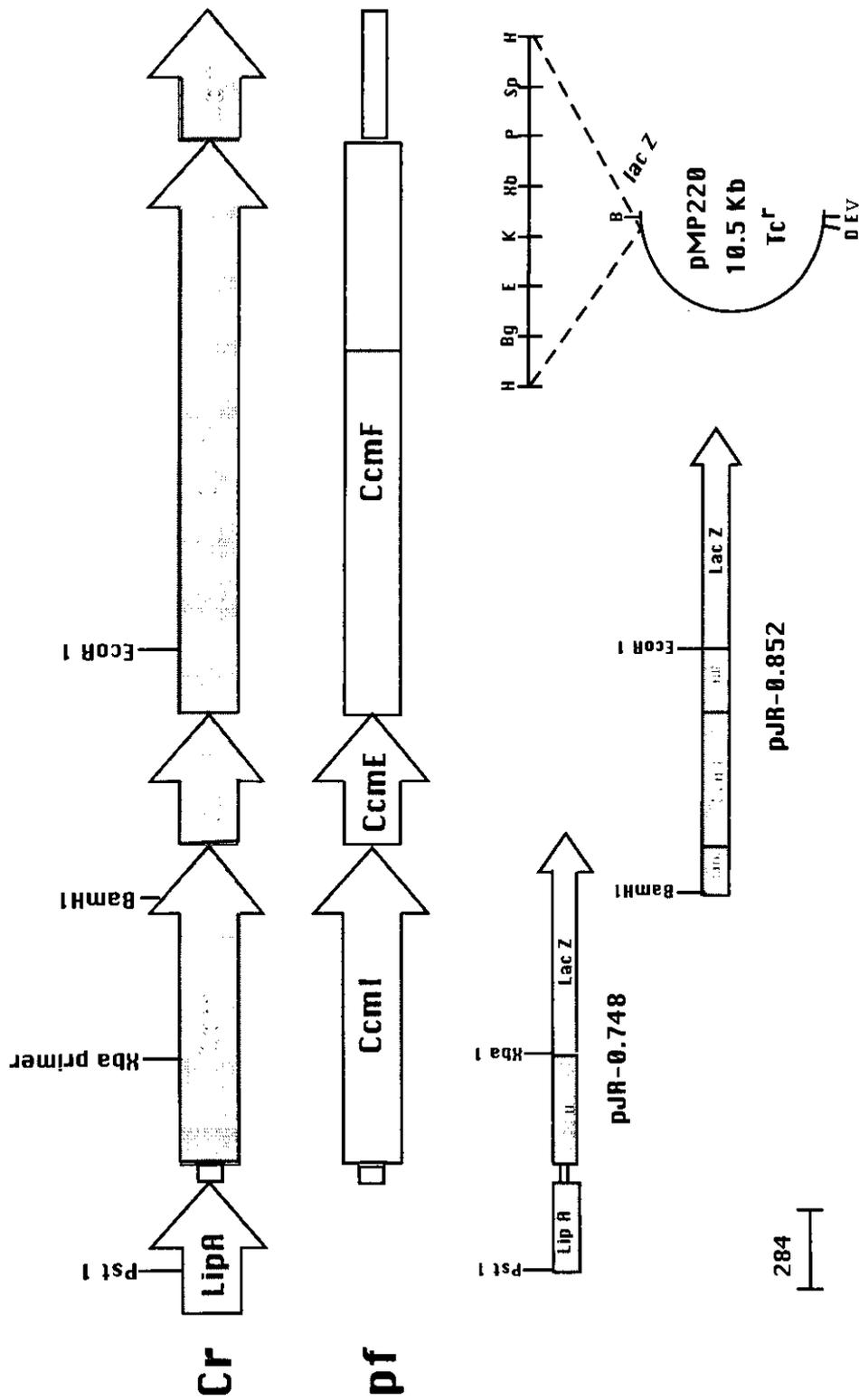


Figura 5.2 Muestra el mapa físico del operón *ccm/EFH* cromosomal □ y copia plasmídica □ así como las fusiones *lacZ* (pJR-0.748) y (pJR-0.852).

Tabla 5.1 Valores de expresión de la fusión *ccmI-lacZ* en distintos medios de crecimiento.

| | PY | YS | MM |
|---------------|--------------|-------------|------------|
| 12 hrs | 11919 ± 2127 | 5176 ± 1087 | 1843 ± 393 |
| 36 hrs | 4427 ± 1168 | 1593 ± 114 | 779 ± 20 |

Los datos obtenidos en la tabla 5.1, indican que independientemente de los valores presentados para cada cultivo, existe una inducción de la expresión de *ccmI* en cultivos exponenciales y una represión en cultivos estacionarios, por lo que se afirma que *ccmI* se induce en la fase exponencial y se reprime hacia el final del crecimiento.

5.4 Expresión de *ccmI-LacZ* durante el crecimiento.

Para determinar de manera más detallada la relación de inducción de *ccmI-LacZ* con respecto al crecimiento, se realizaron cinéticas de crecimiento, tomando muestras de células en distintos puntos de la curva de crecimiento, de cultivos de la cepa CE-3/pJR0.748 creciendo en medio YS y medio mínimo (MM) (como se indica en Material y Métodos). A estos se les midió la D.O.₅₄₀ y se les determinó la actividad de β-galactosidasa; de esta manera, se obtuvo una curva de crecimiento y una cinética de inducción en los mismos puntos, lo que permitió correlacionar ambos parámetros.

Los datos obtenidos en YS demuestran que existe una inducción de la expresión de *ccmI* en la fase de crecimiento exponencial, la cual se reprime a medida que se acerca a la fase estacionaria (Fig. 5.3).

En medio mínimo (MM) no se observó el nivel de inducción de *ccmI* que se obtuvo en YS, sino que también se observó una represión mayor y rápida de la expresión de *ccmI* durante la fase final del crecimiento (Fig. 5.4).

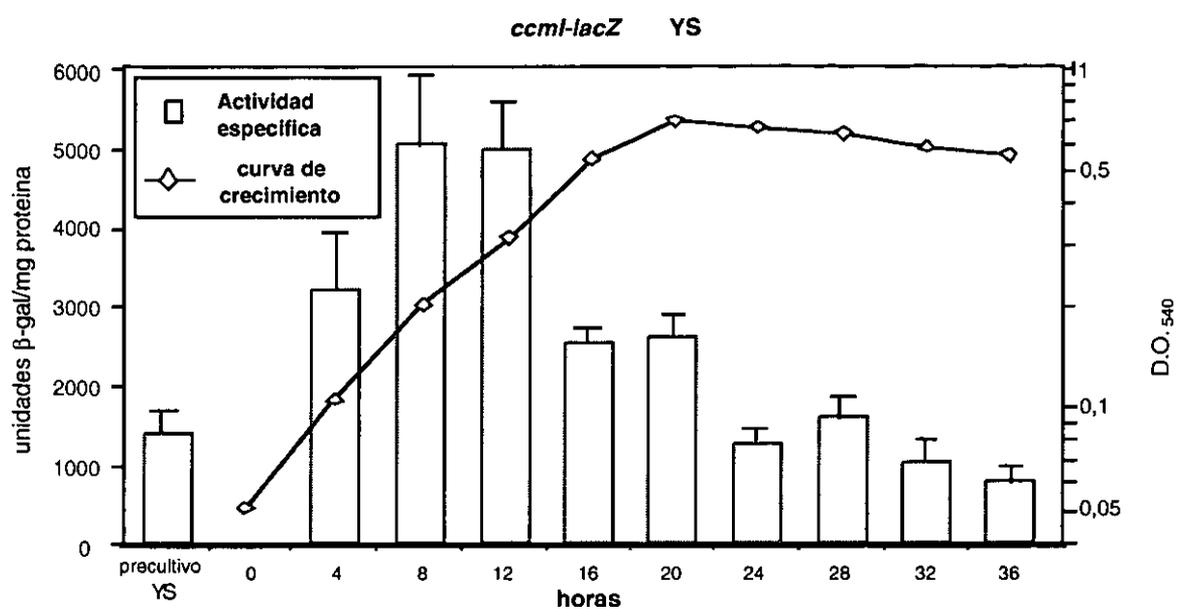


Figura 5.3

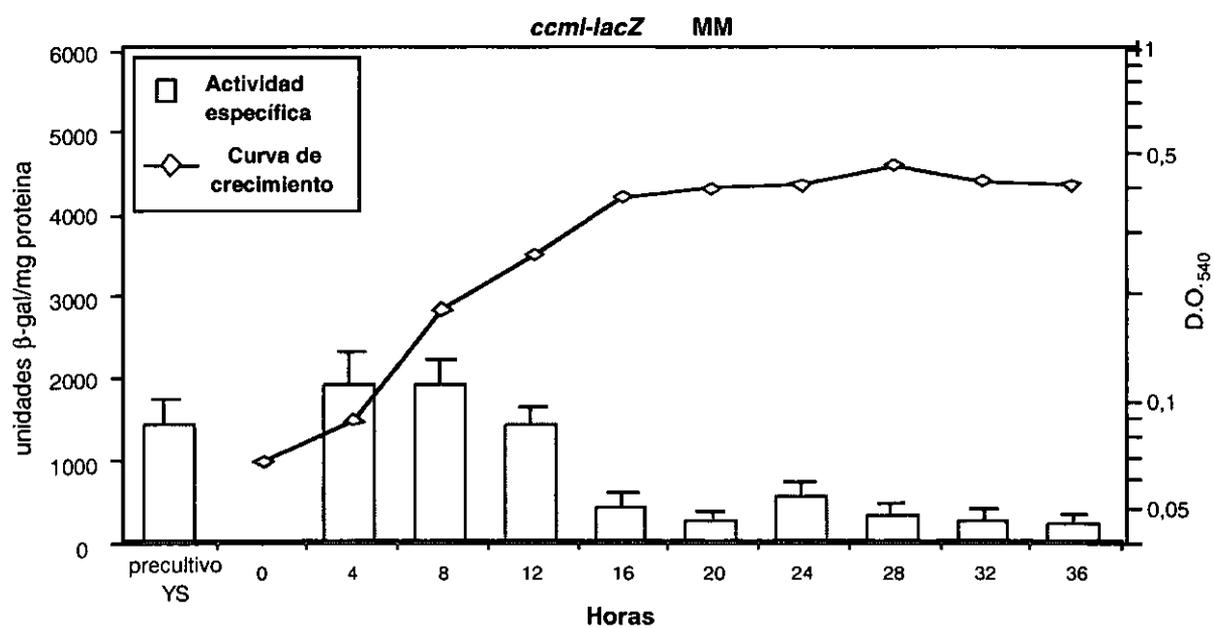


Figura 5.4

5.5 Regulación de *ccmI-LacZ* por Oxígeno

En *R. meliloti*, la expresión de los genes *fixNOQP* está regulado principalmente en respuesta a la disponibilidad de oxígeno. Con el interés de establecer si el operón *ccmIEFH*, al igual que los genes *fixNOQP*, pudiera estarse regulando por la disponibilidad el oxígeno; se inocularon cultivos aerobicos (medio YS) y microaeróbicos (medio YS con una atmósfera de 2% de O₂), con la cepa CE-3/pJR-0.748, incubandose los cultivos durante 12 hrs (momento en que las células se encuentran en la fase exponencial de crecimiento). Al término de este tiempo, se tomaron muestras de los cultivos y se les determinó la actividad de β -galctosidasa.

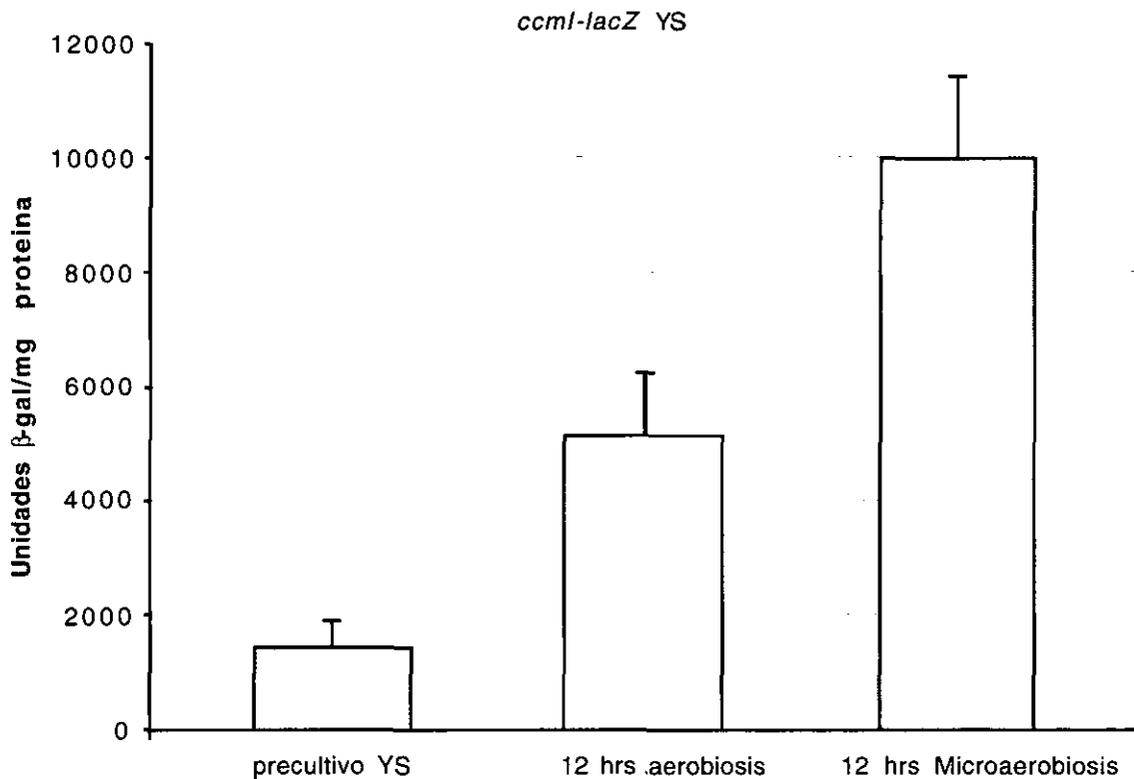


Figura 5.5

Los datos obtenidos (Figura 5.5), muestran que existe una expresión de la fusión *ccmI-lacZ*, de casi dos veces, en cultivos microaerobicos, en comparación con la expresión obtenida en cultivos aeróbicos. De esto se concluye, que existe un efecto sobre la inducción de *ccmI*, que depende de la disponibilidad de oxígeno.

5.6 Papel de *ntrC* y la vía biosintética de purinas sobre la expresión de *ccmI-LacZ*

Entre los efectores que regulan la expresión de la oxidasa simbiótica terminal (cbb_3), se sugiere que *ntrC* juega un papel importante, ya que una mutante *ntrC*⁻ de *R. etli* produjo la oxidasa cbb_3 , cuando la bacteria se creció en vida libre; cosa que no se observa en la cepa silvestre.

Por otra parte, se sugiere que las purinas afectan negativamente la producción de la oxidasa terminal cbb_3 en *R. etli*, ya que una fusión *fixN-lacZ* presenta una expresión tres veces mayor en mutantes afectadas en distintos pasos de la vía biosintética de purinas, comparada a los valores de expresión presentados por la cepa silvestre.

Por lo anterior, y para estudiar si el efecto del amonio a través de *ntrC* ó el metabolismo de purinas pueden modular no solo la transcripción del operón *fixNOQP*, sino también al operón *ccmIEFH*, se introdujo entonces el plásmido pJR-0.748 a las cepas de *R. etli* CFN2012 (*ntrC*⁻) y CE-106 (*purf*⁻). Se determinó entonces los niveles de expresión de la fusión *ccmI-lacZ* en las cepas construidas (CFN2012/pJR-0.748 y CE-106/pJR0.748) cultivadas en medio YS durante 12 hrs, y se realizaron ensayos de β -galactosidasa en muestras tomadas de los cultivos en este tiempo (12 hrs).

Tabla 5.2 Valores de Expresión de la fusión *ccmI-lacZ*. en distintas cepas de *R. etli*.

| | Fusión <i>ccmI-lacZ</i> en | | |
|-----------|----------------------------|---------|--------|
| | CE-3 | CFN2012 | CE-106 |
| YS 12 hrs | 5176 | 5630 | 4586 |

Los datos obtenidos (tabla 5.2), indican que ni *ntrC* ni las purinas, ejercen un efecto regulador en *ccmI-lacZ*, ya que no se observó diferencia significativa con los valores de inducción presentados por *ccmI-lacZ* en las cepas CFN2012 y CE-106, en comparación con los valores presentados en la cepa silvestre.

5.7 Papel de la disponibilidad del poder reductor sobre la regulación de la fusión *ccmI-lacZ*

Para estudiar el papel de la disponibilidad del poder reductor en la regulación de la fusión *ccmI-lacZ*, se transfirió el vector pJR-0.748 a la cepa mutante de *R. etli* SAM100 (cepa *phaC*⁻), que no acumula PHB (poli hidroxibutirato) y por lo tanto presenta niveles de poder reductor mayor (Cevallos y col., 1996). La cepa generada, SAM100/pJR-0.748, se cultivó durante 12 hrs en medio YS en aerobiosis y microaerobiosis, y se determinó la actividad de β -galactosidasa en muestras tomadas a este tiempo (12 hrs).

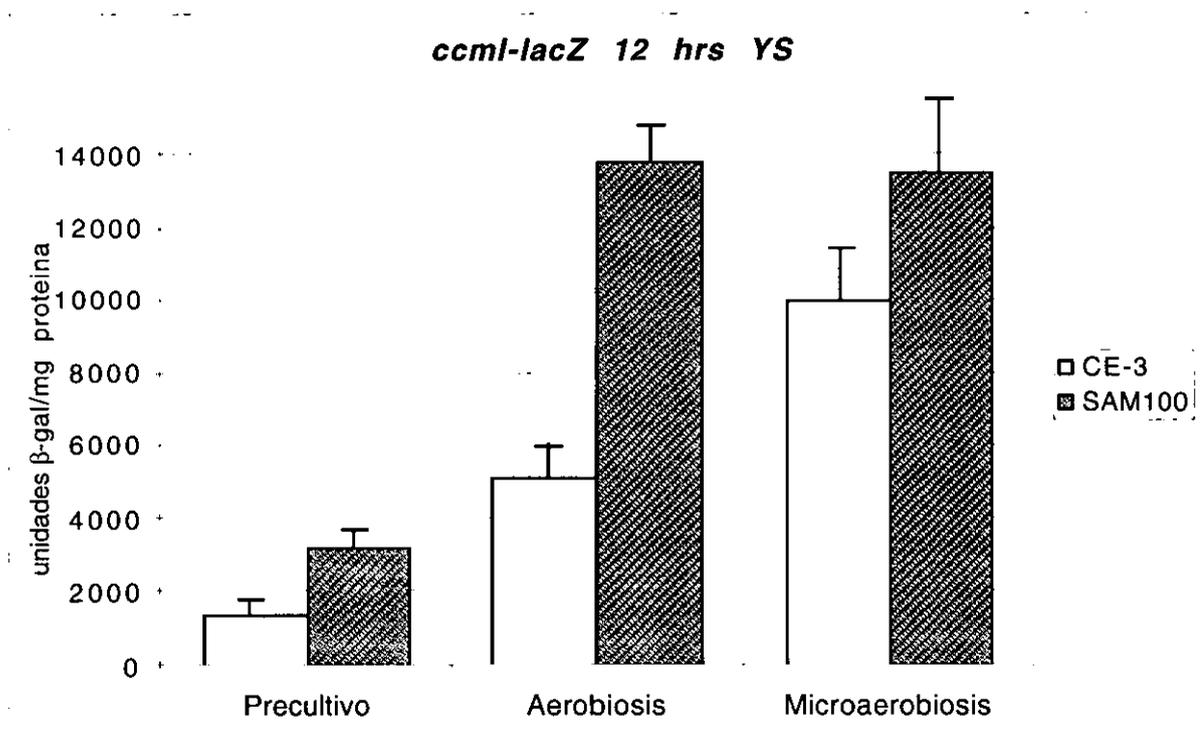


Figura 5.6

Los datos obtenidos (Figura 5.6), indican que los niveles de expresión de *ccmI-lacZ* en la cepa SAM100, fueron dos veces mayores con respecto a la cepa silvestre CE-3, cuando se crecen en condiciones aeróbicas. Por otro lado, se observa una inducción mayor de *ccmI-lacZ* en condiciones microaeróbicas en la cepa SAM100, comparada con la obtenida con la cepa silvestre (CE-3); esta inducción en microaerobiosis en la SAM100 es similar a la obtenida cuando se crece en condiciones aeróbicas. Estos datos demuestran un importante papel de la disponibilidad de poder reductor en las células, el cual regula la expresión de *ccmI-lacZ*.

5.8 Construcción de la fusión *ccmEF-lacZ*

Se han obtenido en el laboratorio datos recientes, que apuntan a que el gen *ccmF* es importante para la biogénesis de citocromos tipo c y por lo tanto para la biogénesis de la oxidasa simbiótica, ya que una mutante cromosomal *ccmF* de *R. etli* (cepa IBTK⁻³), no es capaz de oxidar el colorante TMPD en medio YS, fenotipo que aun se observa en mutantes *ccmI*⁻ (cepas CFN4202 e IFC01) (Tabche y col., 1995); además, esta mutante IBTK⁻³ es incapaz de fijar nitrógeno atmosférico (Tabche y col., datos no publicados).

Basados en estos datos y dado a que es importante la expresión de *ccmF* para conservar el fenotipo TMPD⁺, se sugiere entonces la existencia de un segundo promotor importante en el operón *ccmIEFH*, además del promotor de *ccmI*, que podría estar ya sea cuesta arriba de *ccmE* o de *ccmF*.

Para poder estudiar aisladamente este segundo promotor hipotético, se subclonó entonces un fragmento de ADN cromosomal (BamH1-EcoR1) de *R. etli* de 852 pb, al plásmido pMP220 (ver sección 4.11 de Material y Métodos), dando lugar al plásmido pJR-0.852 (el cual lleva 135 pb de *ccmI*, el gene *ccmE*, y 219 pb de *ccmF*) (Fig. 5.2).

5.9 Regulación de *ccmEFLacZ*

Para poder estudiar si los distintos efectores que regulan la transcripción de *ccmI-lacZ*, pueden estar regulando también a la expresión de la fusión *ccmEF-lacZ*, se transfirió la construcción pJR-0.852 a la cepa silvestre de *R. etli* CE-3 y a la cepa mutante SAM100.

Los datos obtenidos (figura 5.7) demuestran que la fusión *ccmEF-LacZ*, cuando está en la cepa silvestre, puede expresarse independientemente del gene *ccmI* en condiciones aeróbicas y microaeróbicas en medio YS; esta expresión es mayor cuando se crece en medio rico, lo que apoya la idea de la existencia de un segundo promotor en el operón *ccmIEFH*. Por otra parte, cuando la fusión *ccmEF-lacZ* está en la cepa SAM100, no se observa una inducción significativa de su expresión, como sucede cuando se expresa la fusión *ccmI-lacZ* en la misma cepa, lo cual indica que la fusión *ccmEF-lacZ* no se regula por disponibilidad de poder reductor.

ccmEF-lacZ YS 12 hrs

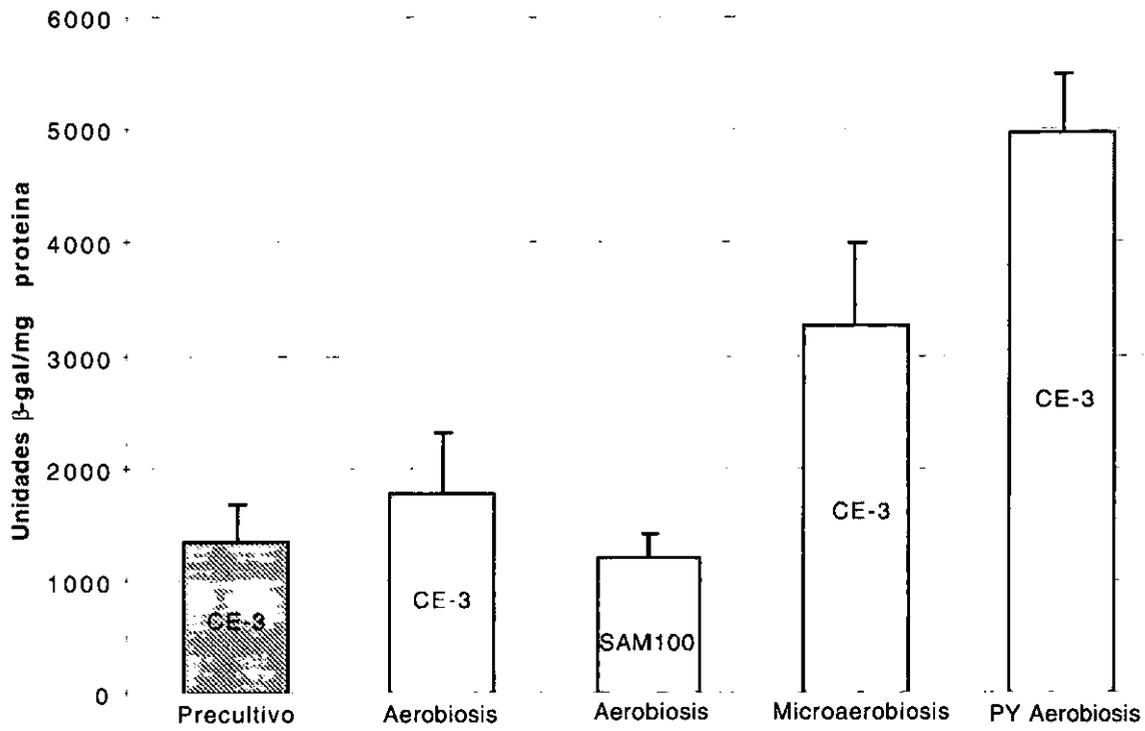


Fig. 5.7

6. DISCUSION:

Este trabajo forma parte de un proyecto que pretende estudiar los mecanismo moleculares que regulan la expresión genética, así como la biogénesis de los diferentes componentes de las cadenas de transporte de electrones que operan en *R. etli*, en vida libre y en simbiosis. Durante el desarrollo de este proyecto, trabajos previos a esta tesis, reportan el distinto comportamiento que presentan dos mutantes independientes de *ccmI*, las cuales pueden producir citocromos tipo c en ciertas condiciones de cultivo. Para poder explicar esto, se llevó a cabo la caracterización de una reiteración del locus *ccmIEFH* localizado en el plásmido pf el cual podría ser responsable de esta producción de citocromos tipo c. El análisis de la secuencia reveló que el locus *ccmIEFH*, presente en el plásmido pf, se obtuvo por transferencia horizontal seguido de un evento de recombinación con el locus cromosomal *ccmIEFH*. La hipótesis de la transferencia horizontal se basa en la baja homología que hay entre los dos genes *ccmI*, los cuales presentan una homología de solamente un 57%, mientras que la homología de los genes *ccmE* y *ccmF* es mayor al 97% entre los dos locus. La capacidad de las dos mutantes *ccmI* de *R. etli* para producir citocromos tipo c no fue debida a la expresión del locus presente en el plásmido pf, sino que fue debido a la expresión del gen cromosomal *ccmF*, ya que la mutante cromosomal *ccmF* (IBTk⁻³) no fue capaz de fijar nitrógeno, lo que nos hace pensar que el locus presente en el plásmido pf no es funcional, ni en condiciones de vida libre ni en simbiosis.

A partir del análisis secuencial de la proteína CcmI codificada por el locus del plásmido pf, se observa que hay una pérdida de 76 residuos del extremo carboxilo cuando se compara con la proteína CcmI codificada por el locus cromosomal. En varios sistemas bacterianos, se presentan homólogos cortos de *ccmI* (los cuales tienen un extremo carboxilo corto) que son funcionales, además existen reportes de mutantes de *ccmI* de *Paracoccus denitrificans* y *Rhodobacter capsulatus*, que tienen la excisión del extremo carboxilo y pueden aún ensamblar citocromos tipo c (Lang y col., 1996). No obstante a lo anterior, el estudio de una fusión génica de la región promotora de *ccmI* del plásmido pf, con el gen reportero *lacZ*, reveló que este gen no se expresa. En adición a esto último, se encontró que el gen *ccmF* localizado en el plásmido pf está interrumpido, lo que nos hace pensar que este gen no es funcional.

En el laboratorio se han presentado evidencias de que el locus *ccmIEFH* presente en el cromosoma, está organizado como un operón, como se ha sugerido en otras especies bacterianas. Mediante análisis de complementación se ha demostrado que cuando una mutante *ccmI* inducida por MuD1 (cepa CFN4202) se crece en medio sólido, la inserción del transposón en ésta mutante tiene un efecto polar en los genes *ccmIEFH*. Sin embargo, en este

Sumado a lo anterior, el análisis computacional de la estructura secundaria del RNA de *ccmI* (dato proporcionado por el Dr. Juan Miranda), utilizando el programa "MFOLD" del paquete "GCG" (Genetics Computer Group), que es un software para el análisis de genes y proteínas. Este dio como resultado la formación de una estructura conformada por dos tallos-asas (Fig. 6.2), que comienza a tres nucleótidos cuesta arriba del posible inicio de transcripción (adenina del ATG) y finalizan a 7 nucleótidos cuesta abajo del supuesto inicio de transcripción del segundo promotor predicho por el análisis computacional.

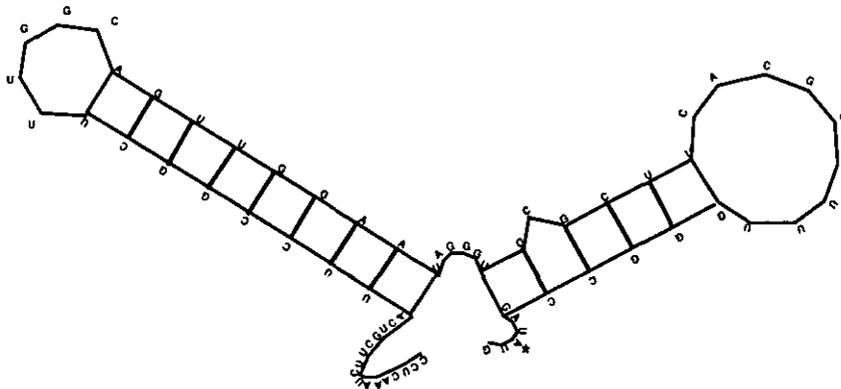


Figura 6.2 Estructura secundaria obtenida a partir del RNA de la secuencia cuesta arriba del inicio de traducción de *ccmI*. Esta estructura tiene una longitud de 69 pb y una energía libre de -11.1.

De todo esto se puede argumentar, que posiblemente la formación de una estructura secundaria en el RNA de *ccmI*, que no es disuelta en el ensayo de extensión del primer, podría estar impidiendo el paso de la enzima transcriptasa reversa a través del RNA y por lo tanto, ésta se separe del complejo antes de finalizar de transcribir el RNA completo. Para poder resolver este problema se podría diseñar un primer que estuviera cuesta arriba del sitio de pegado del primer *cycHeft* justo en donde se forma la estructura secundaria, para de esta manera interferir en su formación y permitir el paso de la enzima transcriptasa reversa al final del RNA mensajero y poder localizar el sitio de inicio de la transcripción. En el caso de que esta estructura no se pueda disolver, ni con compuestos químicos durante el ensayo de extensión del primer, sería necesario hacer remociones que impidieran la formación de estas estructuras secundarias, y de esta forma permitir el paso de la polimerasa, lo cual nos conduciría a definir el sitio de inicio de transcripción, que hipotéticamente estaría cuesta arriba del inicio de transcripción encontrado en este trabajo.

En este trabajo, se demuestra que la expresión del promotor de *ccmI* es inducida en respuesta al enriquecimiento del medio de cultivo y que este promotor se induce en cultivos exponenciales y se regula negativamente durante la fase estacionaria de crecimiento. Por otra parte, los niveles de expresión de la fusión *ccmI-lacZ* se indujeron dos veces más en bajo oxígeno, en comparación con los cultivos aeróbicos. En *Rhodobacter capsulatus* los niveles de Ccl2 (homólogo de *ccmH*) son más elevados en medio rico que en un medio definido (Gabbert y col., 1997). Estos patrones de expresión pueden relacionarse a la disponibilidad de poder reductor en las diferentes condiciones de cultivo. De acuerdo a esto, en este trabajo se presenta que una mutante afectada en la síntesis de PHB, que acumula poder reductor (Cevallos y col., 1996), induce a la fusión *ccmI-lacZ* a niveles dos veces mayores que los presentados en la cepa silvestre, en cultivos aeróbicos, indicando que el promotor de *ccmI* puede responder a la disponibilidad de poder reductor. Este patrón de expresión es importante, en cuanto a que correlaciona el incremento del poder reductor con el incremento de la síntesis de citocromos y de la respiración (Fig. 6.4).

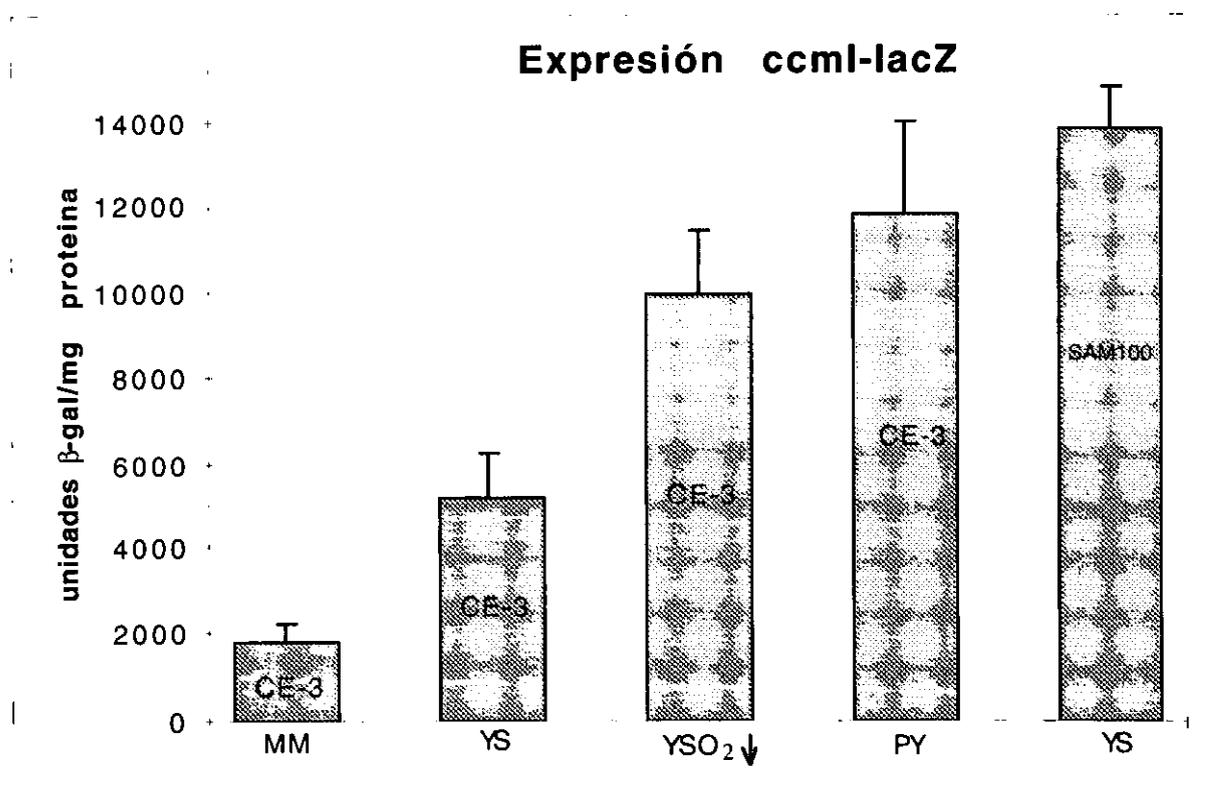


Figura 6.4. Muestra la actividad de la expresión de la fusión *ccmI-lacZ* en diferentes condiciones de cultivo, las cuales, de izquierda a derecha, presentan gradualmente mayor poder reductor.

Los genes *ccmIEFH* fueron expresados en alto y bajo oxígeno tanto en medio mínimo como en medio complejo, lo que nos hace pensar que estos genes son necesarios para el ensamblaje de citocromos tipo c, en diferentes condiciones de cultivo.

Se ha postulado que en bacterias, la contraparte de la hemoliasa mitocondrial es un complejo formado por CcmF y CcmH, con base en que ambas proteínas tienen algunas secuencias motivo que sugieren que están involucradas en la unión del grupo hemo (Thöny-Meyer y col., 1994). En *E. coli* existe un homólogo de CcmF, NrfE, que es esencial para la unión covalente del hemo a citocromos tipo-c (Cole y col., 1996). Los datos obtenidos en este trabajo de tesis, muestran que pueden producirse citocromos tipo c en ausencia del promotor de *ccmI*, apoyando la idea de que CcmF puede interactuar directamente con las apoproteínas de los citocromos tipo-c. Probablemente en condiciones donde ambos promotores del locus *ccmIEFH* sean transcritos, sea posible que la relación de concentración entre CcmIE y CcmFH cambie, y puedan ensamblarse dos tipos de hemoliasas, un complejo formado con CcmI y CcmE y otra sin estas subunidades. Estos dos complejos podrían reconocer diferentes apoproteínas de citocromos tipo-c o, de manera alternativa, la eficiencia de reconocimiento de las apoproteínas pudiera ser diferente.

7. CONCLUSIONES

- 1.- La expresión de *ccmI* se induce en la fase de crecimiento exponencial y se reprime hacia la fase final del crecimiento.
- 2.- La expresión de *ccmI* no es regulada por *ntrC*.
- 3.- La expresión de *ccmI* no es regulada por purinas.
- 4.- La expresión de *ccmI* es regulada por oxígeno.
- 5.- La expresión de *ccmI* es regulada por disposición del poder reductor.
- 6.- La fusión *ccmEF-LacZ* se expresa independientemente del promotor de *ccmI* en medio complejo (PY).
- 7.- El operón *ccmIEFH* es un operón complejo, conformado con por lo menos dos promotores, uno cuesta arriba de *ccmI* y otro cuesta abajo de *ccmI*.

8. REFERENCIAS

Appleby, C. A. (1984). Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Ann Rev. Plant. Physiol.* 35 443-478

Barquera, B., García-Horsman, A. y Escamilla, E. 1991a. Cytochrome d expression and regulation pattern in free living *Rhizobium phaseoli* *Arch. microbiol.* 115:114-119.

Barquera, B., García-Horsman, A. y Escamilla, E. 1991b. An alternative non-cytochrome containing branch in the respiratory system of free-living *Rhizobium phaseoli*. *Arch. Microbiol.* 155:428-435.

Batut, J., Deveran-Ningot, M.I. David, M., Jacobs, J. Garneione, A. M. and Kahn, D. 1989. *fixK*, a gene homologous with *fnr* and *crp* from *Escherichia coli*, regulates nitrogen fixation genes both positively and negatively in *Rhizobium meliloti*. *Embo Journal* 8(4):1279-1286.

Beckman, D. L., Trawick, D. R., and Kranz, R. G. 1992. Bacterial cytochrome c biogenesis. *Genes Dev.* 6:268-283.

Bergersen, F. J. 1984. Oxigen and the physiology of diazotrophic organisms. En: *Advances on Nitrogen Fixation Research* C. Veeger y W. E. Newton (eds.). pp.171-180. Nijhoff, Junk and Pudoc, The Hague and Wageningen, The Netherlands.

Bott, M., Bolliger, M. y Hennecke. 1990. Genetic analysis of the cytochrome c-aa₃ branch of the *Bradyrhizobium japonicum* respiratori chain. *Mol. Microbiol.* 4:2147-2157.

Bott, M., Ritz D., and Hennecke H. 1991. The *Bradhyrhizobium japonicum cycM* gene encodes a membrane-anchored homolog of mitochondrial cytochrome c. *J. Bacteriol.* 173:6766-6772.

Bott, M., Preising, O. y Hennecke, H. 1992. Genes for a second terminal oxidase in *Bradyrhizobium japonicum*. *Arch. Microbiol.* 158:335-343.

Brom S., A.García , T. Stepkowsky y R. Palacios. 1992. Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* are requerid for optimal symbiotic performance. *J. Bacteriology.* p5183-5189.

Cevallos, M. A., S. Encarnación, A Leija, Y. Mora, y J. Mora. 1996. Genetic and Physiological Characterization of a *Rhizobium etli* mutants strains unable to synthesize poly-β-hidroxybutyrate. *J. Bacteriol.* 178(6):1646-1654.

Cole J. (1996). Nitrate reduction to ammonia by enteric bacteria: redundancy, or a strategy for survival during oxygen starvation? *FEMS Microbiol. Lett.* 136:1-11.

Delgado, M.J. Yeomar, K.H. Wo.G., Vargas, C., Davies, A.E., Poole, R.K. Johnston, A.W.B. and Downy J.A. 1995. Characterization of the *cycHJKL* genes involved in cytochrome c biogenesis and symbiotic nitrogen fixation in *Rhizobium leguminosarum*. *J Bacteriol.* 1995 Sep;177(17):4927-34.

Djordjeric, D.P., Weinman, J.J. Redmond, J.W., Djordjevic, M.A. and Rolfe, B.G. 1995. The addition of 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside to nodulation-defective purine auxotrophs pf NGR234 restores bacterial growth but leads to novel root outgrowths on siratro. *MPMI* 9(2):114-124.

Dumont, M. E., Ernst, J. F., Hampsey, D. M., y Sherman, F. (1987). Identification and sequence of the gene encoding cytochrome c heme lyase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 6:235-241.

Drygas, M. E., Lambowitz, A. M. y Nargang, F. E. (1989). Cloning and analysis of the *Neurospora crassa* gene for cytochrome c heme lyase. *J. Biol chem* 264:17897-17906.

Gabel, C. y Maier, R. J. 1990. Nucleotide sequence of the *coxA* gene encoding subunit I of cytochrome aa3 of *Bradyrhizobium japonicum*. *Nucleic Acids Res.* 18:6143.

Gabbert K.K. Goldman B.S. y Kranz R. G. (1997) Differential levels of specific cytochrome c biogenesis proteins in response to oxygen: analysis of *ccl* operon in *Rhodobacter capsulatus*.

Gallon, J. R., 1992. Recociling the incompatible: N₂ fixation and O₂. *Tansley review No.44.* *New Phytol.* 122:571-609.

García-Horsman, J. A., E. Berry, J. P. Shapleigh, J. O. Albe, and R. B. Gennis. 1994. A novel cytochrome c oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* that lacks CuA. *Biochemistry.* 33:3113-3119.

Gray, K. L., Grooms, M., Myllykallio, H., Moomaw, C., Slaughter, C. y Dalda, F. 1994. *Rhodobacter capsulatus* contain a novel cb-type cytochrome c oxidase without a CuA center. *Biochemistry.* 33:3120-3127.

Goodchild, D. J. 1977. The ultrastructure of root nodules in relation to nitrogen fixation. p. 235-288. *In* G. H. Bourne, J. F. Danielli y K. W. Jeon (ed.), *International review of cytology.* Academic Press. New York.

Goodhew, C. F., Brown, K. R. and Pettigrew, G. W. 1986. Haem staining in gels, a useful tool in the study of c-type cytochromes. *Biochim Biophys Acta.* 852:288-294.

Goodhew, C. F., Wilson, I. B. H., Hunter, D. J. B., and Pettigrew, G. W. 1990. The cellular location and specificity of bacterial cytochrome c peroxidases. *Biochem. J.* 271:707-712.

Grove, J., S. Tanapongpipat, G. Thomas, L. Griffiths, H. Croke, y J. cole. (1996). *Escherichia coli* K-12 genes essential for the synthesis of c-type cytochromes and a third nitrate reductase located in the periplasm. *Mol. Microbiol.* 19:467-481.

Haaker, H. (1988). *Biochemistry and physiology of nitrogen fixation.* *Bio Essays.* 9:112-117.

Hirsh, A.M., M. Bang, y F. M. Ausubel. 1983. Ultrastructural analysis of ineffective alfalfa nodules formed by *nif*⁻Tn5 mutants of *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 155:367-380.

Hussain, H., Grove, L. Griffiths, S. Busby, y J. Cole. (1994). A seven gene operon essential for formate-dependent nitrite reduction to ammonia by enteric bacteria. Mol. Microbiol. 12:153-163.

Jones, C. W. 1988. En: Bacterial Energy Transduction. Academic Press. London. pp. 1-82.

Kahn, D., Batut, J., Daveran. M. L. y Fourment, J. (1993). Structure and regulation of the *fixNOQP* operon of *Rhizobium meliloti*. En: R. Palacios, J. Mora y W. E. Newton (eds). New horizons in nitrogen fixation. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher. pp. 393-398.

Karr, D. B., J. K. Waters, F. Suzuki, y D. W. Emerich. 1984. Enzymes of the poly- β -hydroxybutyrate and citric acid cycles of *Rhizobium japonicum* bacteroids. Plant Physiol. & 5:1158-1162.

Kereszt, A., K. Slaka-kiss, P. putnoky, Z. Banfalid, and A. Kondorosi. 1995. The *cycHJKL* genes of *Rhizobium meliloti* involved in cytochrome c biogenesis are required for respiratory nitrate reduction ex planta and for nitrogen fixation during symbiosis. Mol. Gen. Genet. 247:39-47.

Kranz, R. G., y D. L. Beckman. (1995). Cytochrome biogenesis, P. 709-723. In R. E. Blankenship, M. T. Madigan, y C. E. Bauer (ed), Anoxygenic photosynthesis bacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Lang, S. E., Jenney, F. E. y Daldal, F. (1996) *Rhodobacter capsulatus CycH*: a bipartite gene product with pleiotropic effects on the biogenesis of structurally different c-type cytochromes. J. Bacteriol. 1978, 5279-5290.

Lang BF, Burger G, O'Kelly CJ, Cedergren R, Golding GB, Lemieux C, Sankoff D, Turmel M, Gray MW (1997). An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. Nature 387(6632):493-7.

Mandon, K., P. A. Kaminski, and C. Elmerich. 1994. Functional analysis of the *fixNOQP* region of *Azorhizobium caulinodans*. J. Bacteriol. 176:2560-2568.

Maniatis T., E. F. Fritsch, y J. Sambrook. 1982. Molecular Cloning a Laboratory Manual (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory).

Morett, E., S. Moreno y G. Espín. 1985. Impaired nitrogen fixation and glutamine synthesis in methionine sulfoximine (MSs) mutants of *Rhizobium phaseoli*. Mol. gen. Genetics. 200:229-234.

Newman, J.D. Schultz, B.W. and Noel K.D. 1992. Dissection of nodule development by supplementation of *Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli* purine auxotrophs with 4-aminoimidazole-5-carboxamide riboside. Plant phisiol. 99:401-408.

Newman, J.D., Rosovitz, M. J. and Noel, K. D. 1995. Requirement for Rhizobial production of 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR) for infection of bean. *MPMI*, 8(3):407-414.

Nicholson, R.W., and W. Neupert. 1989. Import of cytochrome c into mitochondria: reduction of heme, mediated by NADH and flavin nucleotides, is obligatory for its covalent linkage to apocytochrome c. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86:4340-4344.

Nicholson, R. W., Stuart, R.A., y Neupert, W. 1989b. Biogenesis of cytochrome c₁. *J. Biol. Chem.* 264:281-298.

Ndoye, I., S.F. Debilly, J. Vasse, B. Dreyfus, y G. Truchet. 1994. Root nodulation of *Sesbania rostrata*. *J. Bacteriol.* 176:1060-1068.

Noel, K. D., A. Sánchez, L. Fernández, J. Leemans, y M.A. Cevallos. 1984. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *J. Bacteriol.* 158:148-155.

Noel K. D., R. J. Diebold, J. R. Cava y B.A. Brink. (1988). *Rhizobial* purine and pyrimidine auxotrophs: nutrient supplementation, genetic analysis, and the symbiotic requirement for de novo purine biosynthesis. *Arch. Microbiol.* 149:499-506.

Page, M. D., and Ferguson, S.J. 1989. A bacterial c-type cytochrome can be translocated to the periplasm as an apo form; the biosynthesis of cytochrome cd1 (nitrite reductase) from *Paracoccus denitrificans*. *Mol. Microbiol.* 3:653-661.

Page, M. D., and Ferguson, S.J. 1990. Apo forms of cytochrome cd1 are translocated to the periplasm of *Paracoccus denitrificans* in the absence of haem incorporation caused by either mutation or inhibition of haem synthesis. *Mol. Microbiol.* 4:1181-1192.

Page M. D. and Ferguson S. J. 1995. Cloning and sequence analysis of *cycH* gene from *Paracoccus denitrificans*: the *cycH* gene product is required for assembly of all c-type cytochromes, including cytochrome c₁. *Mol. Microbiol.* 15(2):307-318.

Page M. D., Sambongi Y., y Ferguson S. J. 1998. Contrasting routes of c-type cytochrome assembly in mitochondria, chloroplasts and bacteria. *TIBS* 23(marzo):103-108.

Pettigrew, G. W., Moore, . R. 1987. *Cytochromes c*. Springer Verlag, Berlin, pp. 160-179.

Preising, O., D. Anthamatten, and H. Hennecke. 1993. Genes for a microaerobically induced oxidase complex in *Bradyrhizobium japonicum* are essential for a nitrogen-fixing endosymbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:3309-3313.

Preising, O., Zufferey, R., Thony-Meyer, L., Appleby, C. A. y Hennecke, H. 1996. A high-affinity cbb₃-type cytochrome oxidase terminates the symbiosis-specific respiratory chain of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 178:1532-1538.

Quinto, C., H. de la Vega, M. flores, T. Ballado, G. Soberón, y R. Palacios. 1982. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. Nature (London) 299:724-726.

Raitio, M. y Wikström. M. 1994. An alternative cytochrome oxidase of *Paracoccus denitrificans* function as a proton pump. Biochem. Biophys. Acta. 1186:100-116.

Ramseier, T., Winteler, H. V., and Hennecke, H. 1991. Discovery and sequence analysis of bacterial genes involved in the biogenesis of c-type cytochromes. J. Biol. Chem. 266:7793-7803.

Reese, M.G., Reczko, M., Bohr, H. and Suhai, S. (1994). "Prediction of E.Coli Promoter Sites Utilizing the Transcription Geometry with Time Delay Neural Networks", internal report at the German Cancer Research Center.
Acceso internet: <http://www-hgc.lbl.gov/projects/promoter.html>

Reid E., Eaves, D. J. y Cole, J. A. 1998. The CcmE protein from *Escherichia coli* is a haem-binding protein. FEMS Microbiology Letters. 166:369-375.

Ritz, D., Bott, M., and Hennecke, H. 1993. Formation of several c-type cytochromes requires a novel membrane-anchored protein that faces the periplasm. Mol. Microbiol. 9:729-740.

Ritz, D. 1995. Genetics and biochemical studies on the proteins encoded by the *cycHJKL* gene cluster, esencial for the biogenesis of c-type cytochromes in *Bradyrhizobium japonicum*. Ph.D. dissertation ETH 11284. Eidgenös-sische Technische Hochschule, Zurich, Switzerland.

Ritz, D., L. Thöny-Meyer, and H. Hennecke. 1995. The *cycHJKL* gene cluster play an essential role in the biogenesis of c cytochromes in *Bradyrhizobium japonicum*. Mol. Gen. Genet. 247:27-38.

Simon, R., U. Priefer, y A. Pühler. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic-engineering:transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. Bio/Technology. 1:784-791.

Soberón, M., William, H. D. Poole, R. K. y Escamilla, E. 1989. Isolation of a *Rhizobium phaseoli* tn5-induced mutants with altered expression of cytochrome terminal oxidases o and aa₃. J. Bacteriol. 171:465-472.

Soberón, M. Membrillo-Hernández, Aguilar, G. R. y Sánchez, F. 1990. Isolation of a *Rhizobium phaeoli* Tn5-induced mutants with altered expression of cytochrome terminal oxidase o and aa₃. J. Bacteriol. 171:465-472.

Soberón, M., G. R. Aguilar, and F. Sánchez. 1993. *Rhizobium phaseoli* cytochrome c-deficient mutant induces empty nodules on *Phaseolus vulgaris* L. Mol. Microbiol. 8:159-166.

Soberón, M., López, O., Miranda, J., Tabche, M. L. and Morera, C. 1997. Genetic evidence for 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR) as a negative effector of cytochrome terminal oxidase *cbb3* production in *Rhizobium etli*. *Mol. Gen. Genet.* 254:665-673.

Spaink, H. P. R., J. H. Okker, C. A. Wiffelman, E. Pees y B. J. J. Lugtenberg. 1987. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. *Plant. Mol. Biol.* 9:27-39.

Spiro, S. y Guest, J. R. 1991. Adaptive responses to oxygen limitation in *Escherichia coli*. *Trends in Biochemical Sciences.* 16:310-314.

Surpin, M. A., Moshiri, F., Murphy, A. y Maier, R. J. 1994. Genetic evidence for a fourth terminal oxidase in *Bradyrhizobium japonicum*. *Gene.* 143:73-77.

Swamynathan, S. K., and Singh, A. 1992. *Rhizobium meliloti* purine auxotrophs are *nod*⁺ but defective in nitrogen fixation *J. Genet.* 71:11-21.

Tabche, M. L. 1995. Identificación de genes involucrados en la expresión de citocromos tipo c y la oxidasa terminal *aa₃* de *Rhizobium etli*. Tesis de Maestría.

Tabche, ML., García EG., Miranda J., Escamilla JE and Soberón M. 1998. *Rhizobium etli cycHJKL* gene locus involved in c-type cytochrome biogenesis: sequence analysis and characterization of two *cycH* mutants. *GENE* 208:215-219.

Tabche, ML., Reyes JD, y Soberón M. 1998. Análisis de la expresión y mutación del operón *ccmiEFH* en *Rhizobium etli*. p. 46. *En* : V CONGRESO NACIONAL DE LA FIJACION BIOLOGICA DE NITROGENO. Sociedad Nacional de la Fijación Biológica de Nitrógeno (ed.). Cuernavaca, Morelos, México.

Taniuchi, H., Basile, G., Taniuchi, H., y Velosos, D. 1983. Evidence for formation of two thioester bonds to link heme to apocytochrome c by partially purification cytochrome c synthetase. *J. Biol. Chem.* 258:10953-10966.

Thöny-Meyer, L., James, P., Hennecke, H. 1991 From one gene to two proteins: the biogenesis de cytochrome b and c₁ in *Bradyrhizobium japonicum*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88:5001-5005.

Thöny-Meyer, L., Ritz, D., and Hennecke, H. 1994. cytochrome c biogenesis in bacteria: a possible pathway begins to emerge. *Mol. Microbiol.* 12:1-9.

Thöny-Meyer L. 1997. Biogenesis of respiratory cytochromes in bacteria. *Microbiology and molecular biology Reviews.* 61(3) 337-376.

Tomb, J. F., White, O., Kerlavage, A. R., Clayton, R. A., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D. y col., (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388:539-547.

Tombolini R, Povo S, Buson A, Squartini A, Nuti MP. 1995. Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) biosynthetic genes in *Rhizobium meliloti* 41. *Microbiology.* 141 (Pt 10):2553-9.

Vargas, C., Wu, G., Davies, A.E., and Downie, J. A. 1994. Identification of a gene encoding a thioredoxin-like product necessary for cytochrome c biosynthesis and symbiotic nitrogen fixation in *Rhizobium leguminosarum*. J. Bacteriol. 176:4117-4123.

von Heijne, G. 1992. Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. J. Mol. Biol. 225:487-494.

Wong, P.P., y H.J. Evans. 1971. Poly-b-hydroxybutyrate utilization by soybean (*Glycine max Merr.*) nodules and assessment of its role in maintenance of nitrogenase activity. Plant Physiol. 47:750-755.

Zufferey, R., O. Preisig, H. Hennecke, and L. Thöny-Meyer. 1996. Assembly and function of the cytochromes *FixO* and *FixP* is essential for assembly of *Bradyrhizobium japonicum* cbb₃-type oxidase. FEBS Lett., in press.