

11281  
45



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

CENTRO DE INVESTIGACIÓN SOBRE  
FIJACIÓN DE NITRÓGENO

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS ADENIL  
CICLASAS DE *Rhizobium etli*”

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
P R E S E N T A :  
JUAN MAURICIO TÉLLEZ SOSA

DIRECTOR DE TESIS: DR. MIGUEL ANGEL CEVALLOS GAOS

CUERNAVACA, MORELOS

2002

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

Este trabajo fue desarrollado bajo la dirección del Dr. Miguel Angel Cevallos Gaos en el Programa de Evolución Molecular del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México.

Durante el desarrollo de proyecto conté con una beca para estudios de Posgrado otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), así como con una beca complementaria concedida por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA).

Algunos materiales y reactivos utilizados en parte de este proyecto fueron adquiridos gracias al apoyo de la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEPE).

## **DEDICATORIA**

**A Brenda, por todo cuanto es y pueda ser.  
A mis padres y hermanos.**

## AGRADECIMIENTOS

Mi gratitud mayor es para Brenda. Gracias por compartir conmigo esta parte de tu vida.

Agradezco al Dr. Miguel Angel Cevallos Gaos, mi maestro, sus enseñanzas en todos estos años. Sirva este espacio para reconocerle su gran entusiasmo y dedicación. Gracias MAC por todo el apoyo, la libertad y la confianza con la que hemos trabajado..

Agradezco a las Dras. Esperanza Martínez y Alicia Gonzáles, así como a los Dres. Jesús Aguirre, Otto Geiger, Michael Dunn y Mario Soberón, sus atinados comentarios al propósito de este trabajo.

Agradezco a las Dras. Esperanza Martínez y Yolanda López, así como a los Dres. David Romero y Enrique Morett, su valiosa participación como miembros de mi Comite Tutorial.

Agradezco a todos los miembros del Programa de Evolución Molecular su afable convivencia.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio: Nora, Javier, Angeles, Héctor, Silvia, Tania, Miguel, Gina, Victor, Angélica, Celia y Vania, por su amistad, sus consejos, sus discusiones, su solidaridad, su charla siempre interesante, su tiempo y sus oídos y por fortalecer mi necesidad por continuar aprendiendo. Pero sobre todo gracias por su gran disposición para lograr que la cotidianidad diste mucho de ser aburrida.

Agradezco a mis amigos del Programa de Ingeniería Metabólica, especialmente a Mere, Sergio, Sandra, Carmen, Victor, Humberto, Gisela y Mike, su ayuda siempre oportuna, desinteresada y sostenida durante todos estos años.

Agradezco la fraternidad de mis amigos y compañeros del CIFN y del IBT: José, Gama, Sony, Paty, Ismael, Charly, Ramón, Mario, Jesús, Eliza, Lucas, Luis Ernesto, Paulina, Chucho, Patrick, Agustino, Rodrigo, Josué, Filiberto, Dago, Aristides, Martin, Manolo.....y los que faltan.

Agradezco la amistad invaluable de mis viejos amigos: Beto, Cano, Neto, Nacho, Itzia, Vicente, Javier, Lalo, Caro, Elsa, Gume, Tiburcio y Viky.

Agradezco la ayuda de Dolores Cuellar en la elaboración de cartas y demás tramites para la obtención del grado.

Agradezco al CIFN y sobre todo a nuestra Universidad Nacional Autónoma de México por apoyar mi desarrollo académico.

Finalmente, este trabajo se une al esfuerzo de cientos y miles de personas que de manera obstinada continúan realizando ciencia desde México para el Mundo.

**La ciencia, no está en las instituciones, se encuentra en la curiosidad limpia de aquellos seres humanos estudiosos que noblemente desean conocer más el universo para el bien común de sus congéneres.**

**Alejandro Valderrama**

## CONTENIDO

|  |    |
|--|----|
| <b>ABSTRACT</b>  | 1  |
| <b>RESUMEN</b>   | 2  |
| <b>INTRODUCCIÓN</b>  | 3  |
| Las Adenil Ciclasas Bacterianas  | 4  |
| Las Adenil Ciclasas Enterobacterianas  | 5  |
| Regulación de la Actividad de las Adenil Ciclasas Enterobacterianas  | 6  |
| Las Adenil Ciclasas Tóxicas  | 7  |
| Las Adenil Ciclasas Universales  | 9  |
| Estructura del Centro Catalítico de las Ciclasas Universales   | 11 |
| Las Adenil Ciclasas Termofílicas   | 14 |
| Consideraciones Evolutivas de las Adenil Ciclasas  | 15 |
| El AMPc en Bacterias Entéricas   | 18 |
| Regulación Transcripcional Mediada por el Complejo AMPc-CRP  | 19 |
| Funciones Celulares Reguladas por el AMPc en Enterobacterias   | 19 |
| El AMPc en Bacterias No Entéricas  | 22 |
| <b>ANTECEDENTES Y OBJETIVOS</b>  | 25 |
| La Fijación Biológica del Nitrógeno  | 26 |
| Los Nucleótidos Cíclicos en las Rhizobiaceas   | 26 |
| Las Adenil Ciclasas de las Rhizobiaceas  | 28 |
| El AMPc en <i>Rhizobium etli</i>   | 30 |
| Objetivos  | 31 |
| <b>RESULTADOS</b>  | 32 |
| Antecedentes Directos  | 33 |
| Los plásmidos pEVSm, pE2 y p3310 Codifican Distintas Adenil Ciclasas   | 34 |
| CyaA y CyaB ¿Adenil o Guanil Ciclasas?   | 36 |
| Construcción y Evaluación Fenotípica de las Mutantes <i>cya</i> de <i>R. etli</i>                                      | 38 |
| Construcción de Mutantes   | 38 |
| Fenotipos en Vida Libre  | 38 |
| Fenotipos Simbióticos  | 39 |
| Los Genes <i>cya</i> de <i>R. etli</i> poseen patrones de expresión diferencial  | 40 |
| Construcción de Fusiones Transcripcionales <i>cya::LacZ</i>  | 40 |
| Análisis de la Expresión de los Genes <i>cya</i> de <i>R. etli</i>   | 42 |
| Manuscrito del artículo "The <i>Rhizobium etli cyaC</i> Product: Characterization of a Novel Adenylate Cyclase Class". | 44 |
| <b>DISCUSIÓN</b>   | 54 |
| <b>PERSPECTIVAS</b>  | 63 |
| <b>REFERENCIAS</b>   | 64 |

## ABSTRACT

The transcriptional pattern of *Rhizobium*, a legum plant endosymbiont, changes in response to external effectors even during nodule development. To date, the chemical nature of these effectors is not completely known. In other Gram-negative bacterial species, like *E. coli*, cAMP and its receptor protein (CRP) exert transcriptional control upon a large number of catabolic operons. Although cAMP has been shown to participate in several functions in *Rhizobium* like catabolic repression, the control of ammonium assimilation and hydrogen metabolism; the exact role of this nucleotide has not been elucidated, mainly due to the absence of mutant strains defective in its synthesis. The enzyme responsible for the cAMP synthesis is the adenylate cyclase, encoded by the *cya* gene. In this study, we present the characterization of three different *Rhizobium etli cya* genes: *cyaA*, *cyaB* and *cyaC*. The functionality of each gene was corroborated independently by their ability to restore cAMP accumulation of an *E. coli cya* mutant strain. Further analysis of the deduced protein products show that while CyaA and CyaB contains catalytic domains similar to those found in class III AC's, CyaC is unrelated to any known AC. Here we demonstrate that CyaC is the first member of a novel class of AC (class VI). The three *R. etli cya* genes are differentially expressed, whereas *cyaA* expression is induced during growth on glycolytic carbon sources, *cyaB* is constitutively expressed under all conditions tested, and *cyaC* is induced only in the presence of organic hydroperoxides. The physiological performance of *R. etli* null mutants in each of the three *cya* genes is indistinguishable from that of the wild type parent strain, both in free living conditions and during symbiosis. However, the nitrogenase activity of bean plant nodules elicited by a double *cyaA**cyaB* mutant strain is significantly reduced, suggesting a important role of cAMP during nitrogen fixation in *R. etli*.



## RESUMEN

Algunas bacterias de la familia Rhizobiaceae reducen el nitrógeno atmosférico mediante el establecimiento de una relación simbiótica con plantas leguminosas. Durante esta interacción el patrón de la expresión génica en ambos organismos sufre cambios drásticos. La naturaleza de las señales involucradas en este proceso aún no se han definido. En bacterias Gram negativas, como *E. coli*, el AMPc y su proteína receptora (CRP) regulan la transcripción de cuantiosos operones involucrados con importantes funciones celulares. En algunas rhizobiaceas, el AMPc se ha implicado en el control de funciones celulares, tales como: la represión catabólica, la regulación de la asimilación de amonio durante la simbiosis, y la regulación del metabolismo de hidrógeno. Sin embargo, la carencia de cepas de *Rhizobium* deficientes en la síntesis de AMPc ha impedido definir su papel en este grupo de bacterias. La adenil ciclasa (AC), producto del gen *cya*, es la enzima que sintetiza el AMPc. En este trabajo presentamos la caracterización molecular de tres genes *cya* (*cyaA*, *cyaB*, y *cyaC*) de *R. etli* que codifican distintas AC's. Nuestros resultados indican que, mientras CyaA y CyaB pertenecen a la clase Universal de las AC's, CyaC no muestra similitud con ninguna proteína antes descrita en las bases de datos. Nosotros demostramos que CyaC es el primer miembro de una nueva clase de AC's, la clase VI. Los tres genes presentaron patrones de expresión diferencial, mientras *cyaA* se induce preferentemente cuando *R. etli* crece en fuentes de carbono glucolíticas, *cyaB* se expresa constitutivamente en todas las condiciones de crecimiento analizadas, y *cyaC* solo expresa en presencia de hidroperóxidos orgánicos. El análisis fenotípico de las mutantes sencillas de *R. etli* nos muestra que las tres AC's son dispensables para el desarrollo de la bacteria en vida libre y en la simbiosis con el frijol. Sin embargo, la doble mutante *cyaA cyaB*, generó nódulos en las raíces del frijol que presentan una reducción notablemente (50%) de su actividad de nitrogenasa. Estos resultados sugieren que en *R. etli*, el AMPc tiene un papel importante en la fijación del nitrógeno.

## INTRODUCCIÓN

## LAS ADENIL CICLASAS BACTERIANAS

Las adenil ciclasas (AC's), también llamadas adenilil o adenilato ciclasas, son las enzimas que sintetizan el adenosin 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc), molécula que tiene un papel universal en la regulación de importantes procesos biológicos. En las bacterias, el AMPc participa en la regulación de numerosos fenómenos celulares. Particularmente en enterobacterias su función es mediada por el regulador transcripcional CRP ó CAP (proteína receptora del AMPc). En los eucariontes, el AMPc funciona como un segundo mensajero que media la respuesta celular a estímulos extracelulares como las hormonas, neurotransmisores, etc. En los mamíferos por ejemplo, las proteínas G, que se encuentran acopladas a receptores hormonales, estimulan la actividad de las AC's. Cuando el nucleótido alcanza cierta concentración crítica se une y activa a proteínas dependientes de AMPc, cuya función principal es fosforilar a diversas proteínas que actúan como efectores de enzimas metabólicas o reguladores de la expresión génica.

La importancia del AMPc y su presencia a lo largo de la escala evolutiva ha atraído el interés de muchos investigadores al estudio de las AC's. Estas enzimas sintetizan AMPc, utilizando ATP como sustrato, mediante la introducción de un enlace fosfodiéster entre los carbonos 3' y 5' del azúcar del nucleótido. La degradación del AMPc corre a cargo de las fosfodiesterasas de AMPc que rompen el enlace fosfodiéster para producir adenosin 5'-monofosfato (AMP). Los niveles intracelulares de AMPc están regulados por la actividad de ambas enzimas y por su excreción al medio. En las bacterias se asume que la síntesis, aún más que la degradación, es el factor determinante en la concentración intracelular de AMPc (Magasanik y Neidhardt, 1987), quizás por esta razón el estudio de fosfodiesterasas bacterianas es un campo casi inexplorado (Para información reciente sobre fosfodiesterasas revisar Conti y Jin, 1999).

No obstante que en un par de estudios recientes se nos presentan las primeras estructuras tridimensionales de los centros catalíticos de una AC de mamífero (Zhang *et al.*, 1997; Tesmer *et al.*, 1997), en lo general, son escasos los reportes que describen aspectos estructurales de las AC's, principalmente porque se sintetizan en bajas concentraciones, y su purificación es muy complicada debido a los dominios transmembranales que muchas de estas proteínas presentan. Se han clonado y secuenciado los genes *cya* que codifican para AC's en distintos organismos, desde bacterias hasta vertebrados superiores. Recientemente se aislaron los genes que codifican para AC's en las plantas de tabaco y maíz (Ichikawa *et al.*, 1997; Moutinho *et al.*, 2001). Sin embargo, la función del AMPc en las plantas continúa siendo fuente de controversia (Ichikawa *et al.*, 1998; Maathuis y Sanders, 2001). Las AC's descritas se clasifican en cinco clases de acuerdo a características comunes presentes en la secuencia proteica: (i) La clase I agrupa a las enzimas relacionadas con las AC's enterobacterianas. (ii) La clase II conjunta a las AC's tóxicas aisladas de bacterias patógenas como *Bacillus anthracis* o *Bordetella pertussis*. (iii) La clase III reúne a

las adenil y guanil ciclasas de eucariontes y de procariontes. (iv) La clase IV, distribuida principalmente en arqueobacterias, contiene AC's que muestran propiedades termofílicas. (v) La clase V representada únicamente por una AC de la bacteria anaerobia estricta *Prevotella ruminicola*. Este péptido no tiene similitud con ninguna proteína de las bases de datos, posee 593 residuos de aminoácidos, su peso molecular aproximado es 67 kD, su punto isoeléctrico es 6.49 y distintos análisis de predicción de estructura secundaria sugieren que es una proteína transmembranal (Danchin, 1993; Sismeiro *et al.*, 1998; Cotta *et al.*, 1999). Como parte de este trabajo presento la caracterización de una nueva clase de AC's, la clase VI. Hasta este momento, las ciclasas de esta clase parecen ser exclusivas de bacterias de la familia Rhizobiaceae. Mientras que en procariontes se han reportado miembros de todas las clases, en eucariontes las ciclasas descritas pertenecen a la clase III.

## CLASE I. LAS ADENIL CICLASAS ENTEROBACTERIANAS

Las AC's enterobacterianas están altamente conservadas y suelen ser representadas por la AC de *E. coli*, la cual consta de 848 residuos de aminoácidos y tiene un punto isoeléctrico de 6.1. Esta AC presenta dos dominios funcionales, el dominio catalítico ubicado en el extremo amino, y el dominio regulatorio en el extremo carboxilo. La predicción de estructura secundaria muestra que los primeros 395 residuos, que corresponden al dominio catalítico, presentan un 42% de  $\alpha$ -hélices, mientras que el resto de la proteína sólo presenta un 19% de  $\alpha$ -hélices. El perfil de hidropatía no revela características de proteínas transmembranales. Estas proteínas carecen del típico motivo de unión a ATP (P-loop), sin embargo, poseen en el extremo amino un motivo de unión a ATP alternativo propuesto por Peterkovsky y colaboradores (1993). Evidencias experimentales demostraron que esta región, que comprende los residuos 181 a 197, es importante para actividad de ciclasa (Amin y Peterkovsky, 1994).

Por otra parte, mientras que los genes *cya* de enterobacterias conservan características idénticas a las descritas para el gen de *E. coli*, como lo son: un atípico codón de inicio (TTG, que parece estar involucrado en algún tipo de control traduccional), dos promotores en la región reguladora (*cyaP1* y *cyaP2*), un probable sitio de metilación (GATC) situado en la región -10 del promotor *cyaP2*, así como el entorno genético, tanto corriente arriba como abajo (*hemC* y *cyaY*, respectivamente). Los genes *cya* de bacterias no entéricas, como *Aeromonas hydrophila*, carecen del promotor *cyaP1*, y presentan diferencias en el entorno genético. Probablemente, la regulación de la actividad de ciclasa de estas enzimas está conservada en las distintas bacterias, mientras que la regulación de la expresión de los genes podría ser diferente en las distintas bacterias (Trotot *et al.*, 1996).

**Tabla 1: Adenil Ciclasas de la Clase I.**

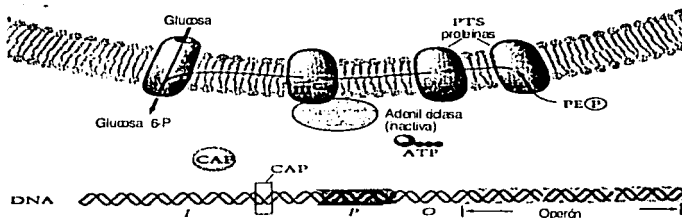
| Especie                       | Locus       | Longitud en aa | Referencias                     |
|-------------------------------|-------------|----------------|---------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i>       | <i>cya</i>  | 848            | Roy y Danchin (1982)            |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | <i>cya</i>  | 419            | Wang <i>et al.</i> , (1981)*    |
| <i>Erwinia chrysanthemi</i>   | <i>cya</i>  | 851            | Danchin y Lenzen (1988)         |
| <i>Yersinia intermedia</i>    | <i>cya</i>  | 848            | Trotot <i>et al.</i> , (1996)   |
| <i>Yersinia pestis</i>        | <i>cya</i>  | 850            | Trotot <i>et al.</i> , (1996)   |
| <i>Pasteurella multocida</i>  | <i>cya</i>  | 838            | Mock <i>et al.</i> , (1991)     |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | <i>cya</i>  | 843            | Dorocicz <i>et al.</i> , (1993) |
| <i>Proteus mirabilis</i>      | <i>cya</i>  | 865            | Trotot <i>et al.</i> , (1996)   |
| <i>Aeromonas hydrophila</i>   | <i>cyaA</i> | 843            | Trotot <i>et al.</i> , (1996)   |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>cyaA</i> | 950            | Stower <i>et al.</i> , (2000)   |

\*El reporte original tiene un error en la secuencia nucleotídica, la proteína real posee 850 residuos de aa.

### Regulación de la Actividad de las AC's Enterobacterianas

En *E. coli*, la adenil ciclasa se encuentra asociada a la membrana y su actividad se modula por una segunda proteína membranal denominada proteína III<sup>Glc</sup>, también conocida como proteína II<sup>A</sup> (producto del gen *crr*). Esta proteína es componente del sistema fosfotransporte de azúcares (PTS) del complejo fosfoenolpiruvato (PEP) y tiene por función introducir glucosa a la célula. Existen dos teorías que pretenden explicar la activación de la adenil ciclasa por la proteína III<sup>Glc</sup>. La primera propone que durante el transporte de la glucosa, la proteína III<sup>Glc</sup> en su estado fosforilado (III<sup>Glc-P</sup>) cede su grupo fosfato a las moléculas de glucosa entrantes, esto trae como consecuencia que la AC se inactive, debido a que hipotéticamente la adenil ciclasa se activa alostéricamente por la proteína III<sup>Glc</sup> en su estado fosforilado (III<sup>Glc-P</sup>) (Neidhardt *et al.*, 1990). La segunda teoría propone que tanto la adenil ciclasa como la glucosa son fosforiladas diferencialmente por la proteína III<sup>Glc</sup>. En presencia de glucosa en el medio, la proteína III<sup>Glc-P</sup> transfiere su grupo fosfato preferentemente al azúcar entrante, quedando la adenil ciclasa desfosforilada e inactiva. En ausencia de glucosa, la adenil ciclasa recibe el grupo fosfato de la proteína III<sup>Glc-P</sup> y en estas condiciones inicia la síntesis de AMPc. Lo antes descrito forma parte del fenómeno conocido como Represión Catabólica que nos describe la represión de la síntesis de enzimas catabólicas, aún en la presencia de sus inductores apropiados, por efecto del metabolismo de la glucosa (Fig. 1) (Saier, 1989).

A) Represión en presencia de glucosa



B) Activación en ausencia de glucosa

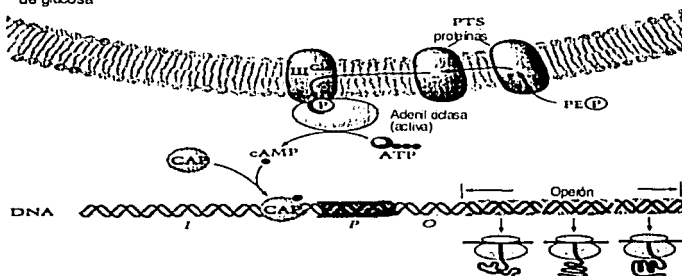


Figura 1. Modelo propuesto por Saier (1989) que esquematiza como la glucosa, al interferir en la síntesis del AMPc, regula indirectamente la expresión de enzimas catabólicas de fuentes de carbono secundarias (Tomado de Neidhardt *et al.*, 1990). (A) En presencia de glucosa, la adenil ciclasa se encuentra inactiva, no se sintetiza AMPc y por lo tanto no hay formación de complejos AMPc-CRP, lo que impide la activación de los operones blanco. (B) En ausencia de glucosa, la adenil ciclasa sintetiza AMPc, se forman complejos AMPc-CRP que se unen a secuencias específicas en el ADN, para activar la transcripción de los operones blanco.

## CLASE II. LAS ADENIL CICLASAS TÓXICAS

La clase II conjunta a las AC's tóxicas de las bacterias patógenas *Bacillus anthracis*, *Pseudomonas aeruginosa* y tres bacterias del genero *Bordetella* (Tabla 2). Estas AC's son excretadas de las bacterias e internalizadas en la célula hospedera, usualmente eucarionte (Lepla *et al.*, 1985). Los sistemas de excreción de estas toxinas son del tipo I, II, y III para *Bordetella*, *B. anthracis*, y *P. aeruginosa*, respectivamente. Mientras que las AC's de *Bordetella* y *B. anthracis*

poseen dominios catalíticos cuya activación depende de calmodulina (CaM), en el caso de la AC de *P. aeruginosa* se desconoce la molécula efectora que potencia su actividad. Dentro de la célula hospedera, la AC se activa y sintetiza AMPE de manera descontrolada, con lo que se desajustan distintos procesos celulares (Hanski y Forfel, 1985; Weis y Hewlett, 1986).

El gen *cyaA* de *B. pertussis* codifica una protefna de 1706 residuos con un peso aproximado de 200 kD. Los primeros 400 residuos del extremo amino contienen la actividad de ciclasa dependiente de CaM, mientras que el resto de la molécula contiene un dominio con actividad hemolítica, por esta razón se la ha dado el nombre de ciclolisina (AC-Hly)(Fig. 2)(Glaser *et al.*, 1988). Se desconoce el mecanismo por el cual la AC-Hly se introduce en su hospedero, sin embargo, se cree que existe un receptor en la membrana de la célula eucarionte que facilita su transporte. El gen *cyaA* de *B. bronchiseptica* codifica una protefna de 1705 residuos de aminoácidos que tiene un 98% de identidad con la AC-Hly de *B. pertussis*. Ambas AC's conservan dominios idénticos para la actividad ciclasa y para la unión a CaM (Betsou *et al.*, 1995). El gen *cya* de *B. anthracis*, que codifica la toxina conocida como factor de edema (EF), se encuentra en un plásmido junto con los genes que codifican la toxina llamada factor letal (LF) y la protefna acarreadora "antígeno protector" (PA). PA es una protefna extracelular de 83 kD que se requiere para la internalización de EF y LF en la célula hospedera. Se supone que PA se une a un receptor en la membrana de la célula eucarionte y que posteriormente contacta a LF o EF formando un complejo que es internalizado por endocitosis. La AC de *B. anthracis* es una protefna de 800 residuos, con un punto isoelectrico de 5.9 y un peso aproximado de 89 kD. Esta AC muestra tres segmentos definidos: i) el primero, localizado en el extremo amino, es un péptido señal que permite la excreción de la protefna; ii) el segundo corresponde al dominio de unión a PA y iii) el tercero, ubicado al centro del péptido, comprende el dominio responsable de la actividad de AC. (Fig. 2) (Tippets y Robertson, 1988; Danchin, 1993).

**Tabla 2. Adenil Ciclasas de la Clase II.**

| Especie                          | Locus       | Longitud en aa | Referencias                     |
|----------------------------------|-------------|----------------|---------------------------------|
| <i>Bacillus anthracis</i>        | <i>cya</i>  | 800            | Escuyer <i>et al.</i> , (1988)  |
| <i>Bordetella pertussis</i>      | <i>cyaA</i> | 1,706          | Glaser <i>et al.</i> , (1988)   |
| <i>Bordetella parapertussis</i>  | <i>cyaA</i> | 1,706          | Boursaux**                      |
| <i>Bordetella bronchiseptica</i> | <i>cyaA</i> | 1,705          | Betsou <i>et al.</i> , (1995)   |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>    | <i>exoY</i> | 378            | Yahr <i>et al.</i> , (1998)     |
| <i>Yersinia pestis</i>           | 15980309*   | 874            | Parkhill <i>et al.</i> , (2001) |

\*Clave de acceso a las bases de secuencias del GenBank. \*\*Sin publicar.

El gen *exoY* de *P. aeruginosa* codifica una proteína (ExoY) de 378 residuos con un peso aproximado de 42 kD. Esta proteína forma parte del regulón ExoS, cuyos miembros son factores de virulencia necesarios para la propagación de la bacteria en el torrente sanguíneo. Esta AC, a diferencia de las proteínas de *B. pertussis* y *B. subtilis*, carece del dominio de unión a CaM, sin embargo, su activación depende de un factor desconocido que es provisto por la célula hospedera (Yahr *et al.*, 1998).

Tres motivos conservados se presentan en el dominio catalítico de estas ciclasas. El motivo I contiene un sitio de unión para ATP/GTP del tipo P-loop (K(A/G)X4GK(S/T)), que es esencial para la actividad de estas enzimas, ya que mutantes de AC-Hly en las lisinas 58 y 65, abaten la síntesis de AMPc, sugiriendo que estos aminoácidos están involucrados en la unión del ATP. El motivo II también está conservado y se ha demostrado que mutantes de AC-Hly en los ácidos aspárticos 212 y 214 también abaten la síntesis de AMPc. Se propone que esta región forma parte del sitio activo de la enzima. Esta región muestra similitud con proteínas que unen nucleótidos como lo son algunas cinasas. El dominio III sólo lo conservan EF y AC-Hly, en este sitio se encuentra el motivo de unión a CaM. Se ha demostrado que mutantes de AC-Hly en el triptofano 242, ubicado en esta región, abate la unión de CaM y por lo tanto reduce pero no abate la síntesis de AMPc (Fig. 2) (Glaser *et al.*, 1989).

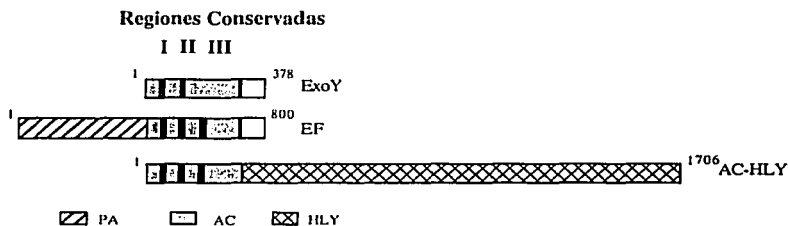


Figura 2. Representación esquemática de las AC's tóxicas. Se muestran los motivos presentes en cada AC y las regiones conservadas entre ellas.

### CLASE III. LAS CICLASAS UNIVERSALES

La clase III, también conocida como la clase "Universal", conjunta a las adenil y a las guanil ciclasas (AC's/GC's) de procariontes y eucariontes. La topología general de los centros catalíticos de esta clase de ciclasas se define por dos dominios con actividad de ciclasa asociados de manera antiparalela (Tesmer *et al.*, 1997; Zang *et al.*, 1997). Este dímero puede ser formado



por dominios idénticos o distintos. En el segundo caso, estos dominios pueden pertenecer al mismo o a distintos polipéptidos. En eucariontes superiores, cuatro subgrupos pueden identificarse (Hurley, 1999): (i) Las AC's con 12 dominios transmembranales, poseen dos dominios citoplasmáticos distintos con actividad de ciclasa y son regulados por proteínas G. (ii) Las GC's con un dominio transmembranal, poseen solo un dominio con actividad de ciclasa, por lo que se conforman como homodímeros y son estimulados por péptidos natriuréticos (péptidos extracelulares de tamaño variable, entre 28 y 152 residuos, que funcionan como hormonas y cuyo papel se vincula a la regulación de fluidos corporales). (iii) Las GC's solubles y sensibles a óxido nítrico, se conforman por la interacción de dos proteínas distintas, cada una de las cuales aporta un dominio con actividad de ciclasa. (iv) La AC soluble de mamífero posee dos dominios con actividad de ciclasa y es regulada por bicarbonato (Buck *et al.*, 1999). En términos generales, las AC's de mamíferos son las ciclasas más estudiadas, actualmente se han clonado los genes de 10 isoformas de AC's (tipos I al X). Las 10 proteínas difieren en su regulación por efectores como la calmodulina y las proteína-quinasas A y C. Todas son activadas por proteínas G y todas, excepto las ACIX y ACX, son activadas por "forskolin". Este diterpeno fue originalmente aislado de la planta *Coleus forskohlii* y tiene la propiedad de inducir la actividad de estas enzimas (Buck *et al.*, 1999; Hurley, 1999).

Las AC's de microorganismos eucariontes, como levaduras y protozoarios, usualmente presentan solo un dominio con actividad de ciclasa por péptido y en algunos casos también poseen dominios transmembranales. En algunos de estos microorganismos, también se han descrito AC's similares a las ciclasas de mamífero con dos dominios citoplasmáticos con actividad de ciclasa y doce regiones transmembranales (Pitt *et al.*, 1992).

Las ciclasas de la clase III se encuentran ampliamente distribuidas entre los distintos grupos bacterianos. La obtención de la secuencia nucleotídica de numerosos genomas bacterianos ha permitido identificar proteínas homólogas en Proteobacterias, Cianobacterias, Firmicutas y Espiroquetas. La generalidad es poseer más de una ciclasa, como es el caso de las bacterias *Stigmatella aurantiaca*, *Anabaena sp.*, *Spirulina platensis*, *Synechocystis sp.*, *Mycobacterium leprae*, *Nostoc sp.*, *Agrobacterium tumefaciens*, etc. Sorprendentemente, las bacterias *Mycobacterium tuberculosis*, *Mesorhizobium loti* y *Sinorhizobium meliloti* llegan a tener más de 12 AC's/GC's diferentes (15, 12, y 26, respectivamente) (Cole *et al.*, 1998; Kaneko *et al.*, 2000; Galibert *et al.*, 2001). Debido a que las AC's/GC's bacterianas poseen solo un dominio con actividad de ciclasa por péptido, que puede ubicarse en el extremo amino o carboxilo, se supone estas proteínas se estructuran de manera homodimérica. Experimentalmente esta conclusión ha sido corroborada en el caso de la AC Rv1625c de *M. tuberculosis* (Guo *et al.*, 2001). Algunas AC's bacterianas presentan dominios transmembranales, como es el caso de la AC1 de *S. aurantiaca*, la AC1 de *S. platensis*, la AC2 de *S. meliloti* y de seis AC's/GC's de *M. tuberculosis*.

Algunas otras presentan dominios accesorios similares a los sistemas de dos componentes, como es el caso de la CyaC de *S. platensis* y la AC2 de *S. aurantiaca* (Yashiro *et al.*, 1996; Coudart-Cavalli *et al.*, 1997). Varias AC's/GC's de *S. meliloti* y *M. loti* presentan secuencias repetidas similares a las tetratricopeptidos (TPR's) presentes en proteínas eucariontes involucradas en la división celular. Los TPR's son motivos de 34 residuos de aminoácidos, usualmente repetidos en tandem, y que participan en interacciones inter e intraproteína (Kaneko *et al.*, 2000; Galibert *et al.*, 2001). La proteína Cya2 de *Synechocystis sp* cepa PCC6803 es la única GC bacteriana caracterizada. Esta proteína presenta solo un dominio con actividad de ciclasa y varias regiones transmembranales (Ochoa de Alda *et al.*, 2000).

A diferencia de las AC's eucariontes, se conoce muy poco acerca del mecanismo que regula la actividad de las AC's bacterianas. En este sentido, una de las proteínas más estudiadas es la CyaC de *S. platensis*, esta proteína posee dos dominios, uno responsable de la actividad de ciclasa y el otro es similar al que presentan proteínas de los sistemas bacterianos de dos componentes (Kasahara *et al.*, 1997). Se sabe que CyaC es capaz de autofosforilarse en la histidina 572, utilizando ATP como sustrato, y después transferir el grupo fosfato al ácido aspártico 895, con lo cual, autoestimula su actividad de ciclasa (Kasahara y Ohmori, 1999).

### Estructura del Centro Catalítico de las Ciclasas Universales

Las típicas AC's de mamíferos poseen dos regiones transmembranales (M1 y M2) y dos regiones citoplásmicas (C1 y C2). Cada una de las regiones transmembranales contiene seis hélices que atraviesan la membrana. Los dominios C1 y C2 miden en promedio 230 residuos de aminoácidos son homólogos entre sí, pero no idénticos, y contienen todos los determinantes catalíticos (Fig. 3). Estos dominios pueden formar homodímeros u heterodímeros en solución e incluso, dominios catalíticos de distintas isoformas de AC's pueden unirse para formar heterodímeros quiméricos activos (Tang y Gilman, 1995). La estructura tridimensional de los centros catalíticos de esta clase de ciclasas se dedujo a partir de dos estructuras cristalográficas de fragmentos solubles de AC's de mamífero. La primera estructura se obtuvo a partir de cristales de homodímeros inactivos del dominio C2 de rata (IIC2) (Zang *et al.*, 1997). La segunda estructura se generó a partir de cristales heterodímeros quiméricos activos, combinación de los dominios C1 de la isoforma V (VC1) y C2 la isoforma II (IIC2) (Tesmer *et al.*, 1997). En ambas estructuras cristalográficas, los dominios catalíticos, cada uno constituido por las subestructuras  $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ , se asocian de manera antiparalela formando un espiral. El centro catalítico se conforma en la interfase entre C1 y C2, de manera que ambos dominios contribuyen con distintos residuos para la generación del sitio activo. En esta interfase se generan dos sitios activos capaces de unir el sustrato (ATP). Sin embargo, en las AC's de mamífero solo uno de estos sitios conserva los residuos esenciales para

unir ATP y para la catálisis, mientras que el otro sitio funciona como receptor de una molécula de "forskolin" (Fig. 3)(Tesmer *et al.*, 1997; Zang *et al.*, 1997).

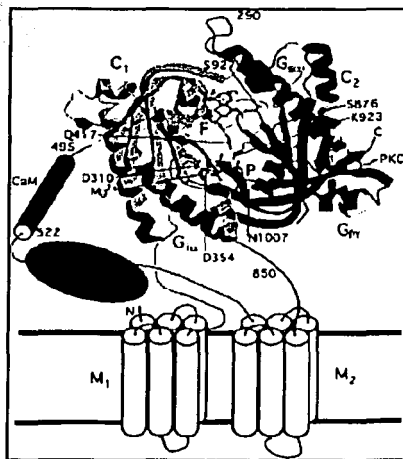


Figura 3. Estructura tridimensional del centro catalítico de las AC's de la clase III. El modelo esta basado en los datos cristalograficos del heterodímero formado por el dominio C1 de la AC tipo V de ratón (gris) y el dominio C2 de la AC tipo II de rata (negro). La numeración de los aminoácidos corresponden a la AC del tipo I. Se muestran los sitios de interacción con varias proteínas reguladoras (proteína G, proteína cinasa C, y calmodulina), así como los sitios de unión a ATP (P) y a "forskolin" (F). En este modelo, la orientación del centro catalítico con respecto a las regiones transmembranales (M1 y M2) es arbitraria. Tomado de James H. Hurley (1999).

Hipóticamente el diterpeno "forskolin" funciona como un activador de las AC's, porque fomenta y estabiliza la interacción de ambos dominios catalíticos. Este modelo predice que las AC's/GC's que poseen solo un dominio catalítico por péptido, se estructuran de manera homodimérica formando dos sitios activos capaces de unir dos moléculas de ATP.

La elaboración de modelos de los sitios activos de estas ciclasas, basados en las estructuras cristalográficas antes mencionadas, aunado a la elaboración y al análisis de distintas mutantes en los presuntos sitios activos, permitió identificar los residuos de aminoácidos esenciales para la unión del sustrato y para la catálisis. Tres residuos se requieren para formar un sitio catalítico, un ácido aspártico (D) de un dominio y una asparagina (N) y una arginina (R) del otro (Fig. 4)(Liu *et al.*, 1997).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En las ciclasas heterodiméricas, los dos dominios forman solo un sitio catalítico, mientras que en las ciclasas homodiméricas cada dominio contribuye con los tres residuos para formar dos sitios catalíticos activos (Fig. 3 y 4)(Liu *et al.*, 1997). Las adenil y las guanil ciclasas catalizan conversiones análogas, ambas utilizan un nucleótido trifosfatado, ATP o GTP, como sustrato y lo ciclan, generando como producto AMPc o GMPc más pirofosfato, respectivamente.

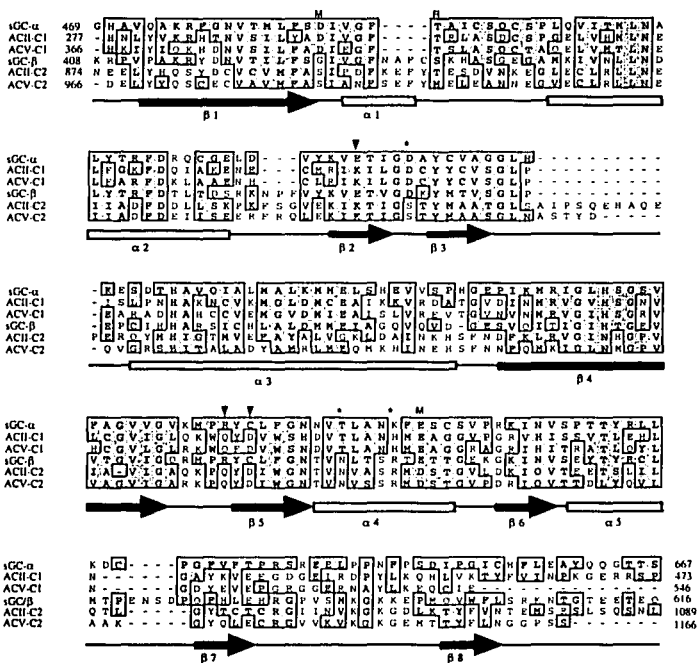


Figura 4. Estructura secundaria y alineamiento de las secuencias de dominios catalíticos de ciclasas de la clase III. Las primeras tres secuencias corresponden a dominios C1 y el resto a dominios C2. En el alineamiento se utilizaron las secuencias de la AC tipo II (ACII-C1 y ACII-C2) de rata, de la AC tipo V (ACV-C1 y ACV-C2) de ratón, y la subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la GC soluble de rata (sGC- $\alpha$  y sGC- $\beta$ ). Las cajas grises contienen aminoácidos conservados. Los aminoácidos esenciales para la actividad de ciclasa están marcados con asteriscos. Las flechas señalan a los residuos involucrados con la discriminación del sustrato. Los residuos que coordinan a los 2 átomos de Mg están marcados (M) al igual que el residuo que interacciona con la ribosa del nucleótido (R).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El alineamiento de las secuencias protéicas de los dominios catalíticos de ambos tipos de ciclasas muestran una gran conservación, especialmente en aquellas posiciones que son esenciales para la catálisis (Fig. 4). El modelo de los sitios activos de estas ciclasas, puso en evidencia los residuos involucrados con la unión y selectividad del sustrato. Tres residuos, una lisina (K) y un ácido aspártico (D) de un dominio y una glutamina (Q) del otro, son invariantes en los sitios activos de las AC's. Estos residuos determinan la especificidad de la enzima ya que interactúan con la base nitrogenada de la purina. En las GC's estos residuos son sustituidos por glutamina (Q) y cisteína (C) en uno de los dominios y arginina (R) en el otro (Fig. 4).

Mutantes de adenil y guanil ciclasas en las que estos residuos fueron intercambiados, modificaron su especificidad por el sustrato. La guanil ciclasa mutante utilizó exclusivamente ATP como sustrato, mientras que la adenil ciclasa mutante se convirtió en una ciclasa no selectiva, es decir, fue capaz de utilizar tanto ATP como GTP. Hasta el momento no ha sido posible intercambiar totalmente la selectividad de sustrato de las adenil ciclasas, por lo que se piensa que existen algunos otros residuos involucrados con la selectividad de sustrato (Sunahara *et al.*, 1998). Ambas ciclasas mutantes retuvieron la capacidad de la proteína parental para ser reguladas por las correspondientes moléculas activadoras (Sunahara *et al.*, 1998). En la GC RetGC-1, únicamente la sustitución de dos residuos (Q y C) por sus contrapartes en AC's (K y D), fue suficiente para permutar su especificidad de GTP a ATP (Tucker *et al.*, 1998).

#### CLASE IV. LAS ADENIL CICLASAS TERMOFILICAS

Inicialmente esta clase incluía exclusivamente a la adenil ciclasa 2 (AC2), codificada por el gen *cyaB*, de *Aeromonas hydrophila* y a tres proteínas hipotéticas codificadas en los genomas de las arqueobacterias *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum* y *Archeoglobus fulgidus* (Sismeiro *et al.*, 1998). Sin embargo, nuestra búsqueda de homólogos en las bases de datos, identificó proteínas similares, algunas anotadas como proteínas hipotéticas de función desconocida, codificadas en varios genomas bacterianos totalmente secuenciados, particularmente del grupo de las arqueobacterias (Tabla 4).

Las proteínas de esta clase son las adenil ciclasas más pequeñas que se han descrito, tienen una longitud de entre 165 y 191 residuos de aminoácidos. La secuencia proteica deducida no presenta regiones transmembranales ni tampoco sitios de unión a ATP canónicos como el tipo P-loop. ni del tipo propuesto por Peterkovsky y colaboradores (1993). La caracterización bioquímica de la AC2 de *A. hydrophila* mostró sorprendentemente que los óptimos de actividad de esta proteína se obtienen en condiciones inusuales de temperatura (65°C) y pH (9.5), condiciones que son extremas e inadecuadas para la mayoría de las AC's descritas (Sismeiro *et al.*, 1998).

**Tabla 3: Adenil Ciclasas de la Clase IV.**

| Especie                           | Locus       | Longitud en aa | Referencias                         |
|-----------------------------------|-------------|----------------|-------------------------------------|
| <i>Aeromonas hydrophila</i>       | <i>cyab</i> | 191            | Sismeiro <i>et al.</i> , (1998)     |
| <i>Yersinia pestis</i>            | <i>cyab</i> | 179            | Parkhill <i>et al.</i> , (2001)     |
| <i>Ralstonia solanacearum</i>     | 17546108*   | 172            | Salanoubat <i>et al.</i> , (2002)   |
| <i>Clostridium perfringens</i>    | 18310334*   | 187            | Shimizu <i>et al.</i> , (2002)      |
| <i>Clostridium acetobutylicum</i> | 15893938*   | 180            | Nolling <i>et al.</i> , (2001)      |
| <i>Borrelia burgdorferi</i>       | 15595068*   | 177            | Fraser <i>et al.</i> , (1997)       |
| <i>Methanococcus jannaschii</i>   | 15668415*   | 175            | Bult <i>et al.</i> , (1996)         |
| <i>M. thermoautotrophicum</i>     | 7447791*    | 177            | Smith <i>et al.</i> , (1997)        |
| <i>Archeoglobus fulgidus</i>      | 11499570*   | 175            | Klenk <i>et al.</i> , (1997)        |
| <i>Pyrococcus horikoshii</i>      | 14991570*   | 183            | Kawarabayasi <i>et al.</i> , (1998) |
|                                   | 14590852*   | 165            | Kawarabayasi <i>et al.</i> , (1998) |
| <i>Pyrococcus abyssi</i>          | 14520591*   | 183            | Heilig **                           |
|                                   | 14521172*   | 170            | Heilig **                           |
| <i>Pyrococcus furiosus</i>        | 18978231*   | 183            | Roob <i>et al.</i> , (2001)         |
| <i>Pyrobaculum aereophilum</i>    | 18312214*   | 176            | Fitz-Gibbon <i>et al.</i> , (2002)  |
| <i>Methanosarcina acetivorans</i> | 20092837*   | 176            | Galagan <i>et al.</i> , (2002)      |
| <i>Sulfolobus solfataricus</i>    | 15897197*   | 186            | She <i>et al.</i> , (2001)          |
| <i>Sulfolobus tokodaii</i>        | 15920492*   | 185            | Kawarabayasi <i>et al.</i> , (2001) |
| <i>Archaeophylum pernix</i>       | 146011609*  | 169            | Kawarabayasi <i>et al</i> (1999)    |
| <i>Methanopyrus kandleri</i>      | 20094307*   | 181            | Slesarev <i>et al.</i> , (2002)     |

\*Clave de acceso a las bases de secuencias del Genbank . \*\* Sin publicar.

### CONSIDERACIONES EVOLUTIVAS DE LAS ADENIL CICLASAS

Dentro de las adenil ciclasas, sin duda las enzimas de la clase I son las proteínas que tienen mayor similitud en cuanto a organización estructural y secuencia. A nivel de ADN los cambios ocurren principalmente en la tercera posición de los codones, predominando las transversiones sobre las transiciones. La comparación de las secuencias proteicas de los dominios catalíticos contra las secuencias reportadas en los bancos de datos no revela similitudes significativas con alguna proteína descrita. Únicamente se detecta una similitud escasa con la subunidad  $\alpha$  de ATPasas y en sus primeros 112 residuos se parecen ligeramente a proteínas que unen pirofosfato

(como ARNt sintetasas). Estas similitudes son insuficientes para proponer que las AC's de esta clase tiene su origen en las proteínas que unen ATP. Sin embargo, en un estudio realizado recientemente por Aravind y Koonin (1999) encuentran una región en el extremo amino de estas AC's, entre los residuos 76 y 140, que muestra similitud con el sitio catalítico de nucleotidiltransferasas. Estos estudios sugieren que esta clase de AC's son homólogos remotos de la superfamilia de las nucleotidiltransferasas, tipificada por la ADN  $\beta$  polimerasa de eucariontes. Nuestra búsqueda de proteínas homólogas en las bases de datos muestran que esta clase de AC's solo están presentes en bacterias Gram negativas del grupo de las Proteobacterias (Tabla 1).

En el caso de las AC's de la clase II, se han descrito únicamente cuatro proteínas provenientes de las bacterias patógenas *B. anthracis* (Gram positiva), *B. pertussis*, *B. bronchiseptica* y *P. aeruginosa* (Gram negativas). Con excepción de la AC de *P. aeruginosa*, estas AC's se activan por CaM, proteína típicamente eucarionte y cuya existencia en bacterias aún es muy limitada. Esta dependencia por CaM las hace muy interesantes ya que podría sugerirse que las AC de la clase II tienen un origen eucarionte (Danchin, 1993). Desafortunadamente y pese a que se han descrito numerosas proteínas eucariontes dependientes de CaM, se conoce muy poco acerca del mecanismo de activación por CaM. Por otra parte, no obstante que las AC's de esta clase no presentan gran similitud a lo largo de todo el péptido, la comparación de las regiones catalíticas ha permitido identificar tres regiones conservadas que aparentemente están involucradas con la catálisis y la activación por CaM. La primera región tiene una secuencia similar a la encontrada en estructuras de tallos y asas típica de proteínas que unen ATP o GTP y se le involucra con la unión del nucleótido. La segunda región, tiene similitud con la región catalítica de las enzimas cinasas. La tercera región conservada presenta el dominio de unión a CaM, este dominio no lo presenta la AC de *P. aeruginosa*. Nuestra búsqueda de proteínas homólogas en las bases de datos identificó una proteína hipotética de la enterobacteria *Yersinia pestis* que muestra similitud con el dominio responsable de la actividad de ciclasa en esta clase de AC's (Parkhill *et al.*, 2001)(Tabla 2). En todos los casos descritos, las AC's de esta clase participan de alguna manera en la patogenicidad de la bacteria portadora, por lo que es posible la AC de *Y. pestis* forme parte de su bacteria patogénica.

Sin duda, las enzimas de la clase III conforman el grupo más amplio y diverso dentro de la familia de las adenil ciclasas ya que incluye a las AC's/GC's eucariontes y procariontes. A diferencia de las ciclasas eucariontes, las enzimas bacterianas poseen solo un dominio catalítico asociado a diversos dominios accesorios que presentan distintas funciones. Encontramos desde regiones transmembranales sencillas o múltiples, hasta dominios similares a los sistemas de dos componentes. Interesantemente, la AC Rv1625c de *M. tuberculosis* presenta seis hélices transmembranales en el extremo amino y un dominio catalítico en el extremo carboxilo cuya secuencia es más parecida a los dominios catalíticos de las AC's de mamíferos que a sus

contrapartes bacterianas. La topología de esta AC corresponde exactamente a la mitad de una AC de mamífero y las propiedades bioquímicas de la AC bacteriana asemejan a las propiedades de las AC's de mamífero. Lo anterior sugiere que la AC Rv1625c de *Mycobacterium* es el progenitor de las AC's de mamífero, adquirida posiblemente por transferencia horizontal (Guo *et al.*, 2001).

La comparación inicial de los dominios catalíticos de estas ciclasas, permitió identificar cuatro regiones altamente conservadas (Danchin, 1993). La resolución de las estructuras tridimensionales del centro catalítico de una AC de mamífero nos indica que estas regiones contienen residuos de aminoácidos esenciales para la actividad de estas enzimas (Zang *et al.*, 1997; Tesmer *et al.*, 1997). Beuve y Danchin (1992) demostraron que mutaciones puntuales que abaten la síntesis de AMPc en la AC1 de *S. meliloti* le confieren la capacidad de sintetizar GMPc. Los autores suponen que los residuos mutados están involucrados con la reacción de ciclización más que con la discriminación del sustrato (ATP o GTP) ya que estos residuos se conservan en las adenil y guanil ciclasas. En trabajos posteriores se identificaron los residuos involucrados con la especificidad del sustrato (Sunahara *et al.*, 1998; Tucker *et al.*, 1998). Mutantes de adenil o guanil ciclasas que sustitúan estos residuos por sus contrapartes en las adenil o guanil ciclasas, permutan su preferencia por el sustrato. Una situación similar se presentó en el caso de la proteína CyaG de *S. platensis*, a la cual se le permutó su especificidad de sustrato al intercambiar los tres residuos específicos de ATP por los específicos para GTP. La CyaG mutante fue capaz de sintetizar GMPc y perdió la capacidad de síntesis de AMPc (Kasahara *et al.*, 2001). Danchin (1993) hipotetiza que las adenil y las guanil ciclasas pudieron haberse originado de un ancestro común que presentaba actividad de ciclasa de nucleótidos purínicos trifosfatados. Por lo que probablemente existió una proteína ciclasa con actividad dual que sintetizaba tanto AMPc como GMPc y que precede a la separación de eubacterias y eucariontes. Kasahara y colaboradores (2001) proponen otro escenario en el que las GC's de mamífero se originaron a partir de algún tipo de AC. Si bien es cierto que la CyaG de *S. platensis* contiene los determinantes propios de una AC, su secuencia global se asemeja más a las GC's que a las AC's. Además, posee cerca del extremo amino un dominio de dimerización, que no lo presenta ninguna AC, pero que esta altamente conservado en las GC's eucariontas. Es probable que la CyaG de *S. platensis* sea un antecesor de las GC's de mamíferos. Hasta el momento todas las guanil ciclasas descritas pertenecen a la clase Universal, incluyendo la única GC bacteriana caracterizada (Ochoa de Alda *et al.*, 2000, para información reciente sobre GC's revisar a Lucas *et al.*, 2000). Es probable que las GC's efectivamente hayan sido originadas a partir de adenil ciclasas, lo que indicaría que los mecanismos regulados por AMPc anteceden a aquellos regulados por GMPc. Las enzimas de la clase IV se describieron por primera vez en *A. hydrophila* (Sismeiro *et al.*, 1998). Esta bacteria es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, del grupo de las



enterobacterias que vive en estuarios y es un patógeno oportunista de mamíferos incluyendo al hombre. Inicialmente se especuló que este tipo de enzimas estaban distribuidas casi exclusivamente en Arqueobacterias, y que incluso *A. hydrophila* podría haber adquirido el gen *cyaB*, que codifica a esta AC, por transferencia horizontal (Sismeiro *et al.*, 1998). Sin embargo, nuestra búsqueda de homólogos en las bases de datos encontró proteínas similares en los genomas de distintos grupos de bacterianos, particularmente en las Proteobacterias, Espiroquetas y Firmicutas (Tabla 3). Por lo que podemos pensar que estas proteínas están distribuidas más ampliamente de lo que se había especulado. Como se mencionó anteriormente, las enzimas de esta clase tienen óptimos de actividad en condiciones de temperatura y pH extremos. Dado que estas condiciones distan mucho de ser óptimas para el crecimiento de la mayoría de las bacterias surge la pregunta ¿Cuál es el papel de estas AC's en estas bacterias?. Sabemos que mutantes *cyaB* de *A. hydrophila* no tienen fenotipo y que este gen no se expresa en condiciones de laboratorio (Sismeiro *et al.*, 1998). Sin embargo, es posible que en el ambiente donde *A. hydrophila* vive se presenten condiciones extremas de temperatura y pH, en las que esta proteína funciona óptimamente.

Algunas bacterias poseen AC's que pertenecen a distintas clases, por ejemplo *A. hydrophila* posee AC's de las clases I y IV; *Yersinia pestis* posee AC's de la clase I, II y IV; y *Pseudomonas aeruginosa* posee ciclasas de las clases I, II, y III.

Finalmente, las AC's constituyen una familia heterogénea de proteínas multidomínios agrupadas en cinco clases perfectamente definidas por sus características presentes en la secuencia proteica. En algunas de estas clases, existe una gama de dominios accesorios a los segmentos catalíticos cuya función probable sea la de ejercer algún tipo de regulación sobre la actividad de la ciclasa. Lo anterior ha llevado a postular que evolutivamente las adenil ciclasas son un claro ejemplo de la construcción modular de proteínas. Así mismo, resulta controversial el establecer relaciones filogenéticas entre las distintas clases de AC's, alternativamente se puede proponer que no existe ninguna relación filogenética dentro de esta familia de proteínas y que se trata de un caso particular de evolución convergente, en el que las distintas clases de AC's se originaron independientemente (Danchin, 1993; Barzu y Danchin, 1994).

## EL AMPc EN BACTERIAS ENTÉRICAS

La función del AMPc se ha estudiado más extensamente en enterobacterias que en ningún otro grupo bacteriano. Se ha descrito que el AMPc se une a CRP formando un complejo que tiene la capacidad de interactuar con el ADN de manera específica y regular la transcripción de numerosos genes (Kolb *et al.*, 1993).

### **Regulación Transcripcional Mediada por el Complejo AMPc-CRP**

La proteína CRP es un homodímero constituido por subunidades de 209 residuos con una masa de 23.6 kD. Cada subunidad posee dos dominios. El dominio amino, que comprende los primeros 135 residuos, contiene tres hélices  $\alpha$  y 8 hojas  $\beta$  plegadas en las que se encuentran los sitios de unión al AMPc (McKay *et al.*, 1982; Weber *et al.*, 1987). El dominio carboxilo, que comprende del residuo 136 al 209, está constituido por 3 hélices  $\alpha$  y 4 hojas  $\beta$ -plegadas; en este dominio se encuentra el motivo hélice-vuelta-hélice (HTH) que interacciona específicamente con el ADN (Steiz *et al.*, 1982; Schultz *et al.*, 1990). Cada dímero interacciona con dos moléculas de AMPc, producto de esta interacción se producen cambios conformacionales que alteran la orientación relativa de ambas subunidades, permitiendo que el complejo AMPc-CRP se una al ADN (Kyrp y Mrazek, 1985). Los motivos HTH de cada subunidad se unen a dos secuencias simétricas palindrómicas de 22 pb en dos surcos mayores consecutivos. Los operones activados por el complejo AMPc-CRP presentan estas secuencias a distancias que varían entre 40 y 200 pb corriente arriba del inicio de la transcripción (Berg y VonHippel, 1988).

El complejo AMPc-CRP activa la transcripción de algunos genes y reprime la de otros. Los genes activados presentan en su región promotora sitios de unión a CRP cercanos al inicio de transcripción, tal es el caso de los promotores *galP1*, *lacP1*, y *malTP1*, donde el sitio de unión de CRP se sitúa en las posiciones 41, 65, y 70 corriente arriba del inicio de la transcripción, respectivamente. En otros casos, los sitios de unión a CRP se encuentran a mayor distancia corriente arriba del inicio de transcripción, como es el caso de los promotores *araB*, *malE* y *papL*. En estos casos la activación depende de la función coordinada de CRP y un segundo regulador. CRP activa la transcripción alterando uno ó más parámetros del inicio de la transcripción: por ejemplo, participa en la captura de la polimerasa, lo que favorece la formación del complejo cerrado; y posteriormente acelera la isomerización del complejo cerrado a complejo abierto y finalmente estimula la tasa de escape de la polimerasa, dando paso a la formación de un complejo de inicio estable que se acompaña de la pérdida de la subunidad sigma (Kolb *et al.*, 1993).

Los genes que se reprimen por el complejo AMPc-CRP presentan sitios de unión a CRP sobrelapados con los sitios de unión de la ARN polimerasa. La unión de CRP al ADN bloquea la unión de la polimerasa a la región promotora. Este tipo de represión se presenta en la expresión del gen *cya* y del operón *gal* (Kolb *et al.*, 1993).

### **Funciones Celulares Reguladas por el AMPc en Enterobacterias**

Si bien es cierto que el complejo AMPc-CRP se describió inicialmente por su papel en el control de la Represión Catabólica en *E. coli*, actualmente son cuantiosos los reportes que involucran al complejo en la regulación de genes que participan en diversos procesos celulares (Tabla 4).

**Tabla 4: Genes y Funciones Reguladas por el AMPc en *E. coli* y *S. typhimurium*.**

| Genes        | Función                                      | Criterio         |
|--------------|--|------------------|
| <i>ansB</i>  | L-Asparaginasa II                            | B, D, F, G       |
| <i>appR</i>  | Fosfatasa ácida                              | D                |
| <i>cat</i>   | Cloranfenicol acetiltransferasa              | D                |
| <i>ccd</i>   | Deoxicitidina deaminasa                      | F                |
| <i>cidA</i>  | Catabolismo de <i>N</i> -Acetilglucosamina   | D                |
| <i>cir</i>   | Receptor del colicina                        | D                |
| <i>cpdB</i>  | Fosfodiesterasa 2',3'-cíclica                | A, F             |
| <i>crp</i>   | Proteína receptora del AMPc                  | A, B, C, D, E, F |
| <i>cup</i>   | Transporte de carbohidratos                  | B                |
| <i>cya</i>   | Adenil ciclasa                               | A, B, C, D, E, F |
| <i>dnaA</i>  | Regulación de la replicación                 | E                |
| <i>exuT</i>  | Metabolismo de galactosidos                  | D                |
| <i>fadBC</i> | Utilización de ácidos grasos                 | B, F, G          |
| <i>fic</i>   | Filamentación                                | D                |
| <i>flaAB</i> | Síntesis de flagelo                          | D                |
| <i>flaD</i>  | Síntesis de flagelo                          | D                |
| <i>fru</i>   | Expresión del regulón de la fructosa         | D                |
| <i>fur</i>   | Expresión del regulón para la toma de hierro | D, F, G          |
| <i>glpD</i>  | Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa            | B, F             |
| <i>glgC</i>  | Síntesis de glucógeno                        | E, G             |
| <i>ilvA</i>  | Expresión de la treonina desaminasa          | D, F, G          |
| <i>ilvB</i>  | Acetohidroxiácido sintasa I                  | D                |
| <i>melR</i>  | Síntesis del activador de la melibiósa       | E, F             |
| <i>pck</i>   | Expresión de la PEP carboxicinasa            | A, B, G          |
| <i>sdh</i>   | Operón de la succinato deshidrogenasa        | F                |
| <i>speC</i>  | Ornitina decarboxilasa                       | B, E             |
| <i>tdc</i>   | Treonina deshidratasa                        | B                |
| <i>toxAB</i> | Producción de enterotoxinas                  | A, B, D, F, G    |
| <i>tra</i>   | Genes de transferencia en el plásmido F      | C                |
| <i>tsx</i>   | Proteína de la membrana exterior             | C, D, G          |
| <i>ubiG</i>  | Síntesis de la ubiquinona                    | A, D, G          |
| <i>uxaCA</i> | Metabolismo de galactósidos                  | D                |
|              | Respuesta al "Heat shock"                    | C                |
|              | Promotor P4 del pBR322                       | A, B             |
|              | Número de copias del plásmido P4             | B                |
|              | Formación del pili                           | D, F             |
|              | Reducción del tiosulfato                     | A                |

Esta tabla es una modificación de la Tabla 1 presentada por Botsford y Harman (1992). Criterios: A. Función sensible a represión catabólica; B. Función afectada por la adición de AMPc; C. Cuantificación de nucleótidos cíclicos; D. Evidencias genéticas a partir de cepas mutantes *cya* y *crp*; E. Evidencias bioquímicas *in vitro*; F. Sitios de unión para CRP presentes en las regiones promotoras; G. Estudios de expresión utilizando genes reporteros.

**Motilidad.** En bacterias entéricas, el complejo AMPc-CRP activa la transcripción del operón *flaAB* y del gen *flaD*. El producto de estos genes es indispensable para la síntesis del flagelo, por esta razón, mutantes de *E. coli* en los genes *cya* o *crp* son totalmente inmóviles (Kutsukake *et al.*, 1990).

**Represión Catabólica.** En *E. coli*, la represión catabólica describe la represión permanente de la síntesis de enzimas catabólicas aún en la presencia de sus inductores apropiados por efecto del metabolismo de la glucosa. El complejo AMPc-CRP regula, a nivel transcripcional, la síntesis de muchas enzimas que intervienen en el catabolismo de fuentes secundarias de carbono.

**Anaerobiosis.** Cuando *E. coli* crece en condiciones anaeróbicas expresa *de novo* más de 50 proteínas, algunas de las cuales se requieren para la respiración anaeróbica y otras son específicas del metabolismo fermentativo. Se demostró que el complejo AMPc-CRP regula la expresión de algunas de estas proteínas, por ejemplo, la expresión de la enzima L-asparaginasa II depende de FNR y CRP (Russell y Yamazaki, 1978).

**Virulencia.** Cepas mutantes de *S. typhimurium cya* y *crp*, obtenidas mediante inserciones del Tn10, crecieron más lentamente que la cepa silvestre y son completamente avirulentas en células intestinales de ratón en cultivo. Esto indica que se requiere del complejo AMPc-CRP para el desarrollo de la virulencia en esta bacteria (Curtiss y Kelly, 1987).

**División Celular.** Distintos reportes proponen que el complejo AMP-CRP intervienen en el proceso de la división celular en *E. coli*, ya que se observó que la expresión de genes vitales involucrados en este proceso, tales como *sfiA*, *sfiC* y *fis*, requieren del complejo (Holtje y Nanninga, 1984; Kumar *et al.*, 1981).

**Fase Estacionaria.** Las bacterias entran en fase estacionaria cuando se encuentran en condiciones ambientales adversas, como lo es la limitación de algún nutrimento esencial. Durante la privación de carbono se induce la síntesis *de novo* de treinta proteínas con distintos patrones temporales de expresión, algunas de las cuales son de importancia para la sobrevivencia de la bacteria. Veinte de estas proteínas están bajo el control del complejo AMPc-CRP. Los genes que codifican a estas proteínas se han llamado genes *est*. Se piensa que están relacionados con la preparación de la bacteria para escaparse de la privación, puesto que muchos de estos genes codifican para proteínas catabólicas y transportadoras de fuentes de carbono (Siegele y Kolter, 1992).

Finalmente, cabría mencionar que algunos reportes acreditan al AMPc papeles independientes de CRP. Por ejemplo, Unden y Guest (1984) describen que *E. coli* requiere de AMPc pero no de CRP cuando crece en condiciones de anaerobiosis en un medio con glucosa. Observan que mutantes *cya* de *E. coli* detienen su crecimiento bajo estas condiciones, mientras que mutantes

*crp* continúan creciendo. Por otra parte, los estudios de Hughes y colaboradores (1988) involucran al AMPc con la replicación del genoma de *E. coli*. En estos trabajos se describe como la unión del AMPc a DnaA (proteína iniciadora de la replicación de ADN) estimula su unión al origen de replicación (*oriC*) favoreciendo de esta manera la replicación del cromosoma de *E. coli*.

## EL AMPc EN BACTERIAS NO ENTÉRICAS

Biville y Guiso (1985) presentan evidencias de la existencia de AMPc en doce diferentes bacterias Gram negativas, algunas de las cuales no son entéricas, y reportan que la concentración del AMPc varía en función de las condiciones del crecimiento, de manera similar a la descrito para *E. coli*. También, mediante el empleo de ensayos radioinmunológicos, describen la presencia de CRP en algunas de las bacterias empleadas en su estudio. Excepcionalmente en bacterias no entéricas como *Haemophilus influenzae* y *Vibrio fischeri*, el complejo AMPc-CRP regula el desarrollo de la competencia y la luminiscencia, respectivamente (Tabla 5).

**Luminiscencia.** Cepas mutantes *cya* ó *crp* de *V. fischeri* reducen los niveles de luminiscencia. Adicionalmente, el análisis de secuencia de la región reguladora de los genes *lux* (encargados de la luminiscencia) revelan un sitio de unión de CRP. Ambas observaciones sugieren que el complejo AMPc-CRP regula el desarrollo de la luminiscencia en esta bacteria (Dunlap, 1989).

**Desarrollo de la Competencia.** La bacteria *H. influenzae* es un bacilo Gram negativo capaz de desarrollar competencia y ser transformable de manera natural. Mutantes de *H. influenzae* deficientes en la síntesis de AMPc ó CRP no desarrollan competencia, además de que presentan un fenotipo pleiotrópico en la fermentación de carbohidratos (Dorocicz, 1993).

**Motilidad.** La adición de AMPc a cultivos de la cianobacteria filamentosa *S. platensis* estimula la motilidad celular. Algunas evidencias sugieren que el AMPc participa en la formación de la capa mucilaginoso que permite el deslizamiento de la bacteria (Ohmori *et al.*, 1993).

**Patogénesis.** Algunas bacterias patógenas como *B. pertussis*, causante de la tosferina, y *B. anthracis*, responsable de la enfermedad conocida como ántrax, sintetizan una AC tóxica. Esta toxina se libera y posteriormente se internaliza en las células hospederas, aumentando indiscriminadamente los niveles de AMPc que desajustan distintos procesos en las células eucariotas. Mutantes de *B. pertussis* en la síntesis de la AC son avirulentas. Por otra parte, no se ha definido si el AMPc tiene algún papel en la fisiología de estas bacterias.

**Síntesis de Celulasas.** Mutantes de la bacteria termofila *Thermomonospora curvata*, que sobreproducen celulasas presentan niveles elevados de AMPc, y la adición de este nucleótido a células en cultivo estimula la producción de celulasas. Ambas observaciones sugieren que en *T. curvata*, el AMPc está involucrado en la síntesis de celulasas (Wood *et al.*, 1984).

**Tabla 5: Papel del AMPc en Bacterias No Entéricas.**

| Bacteria                            | Función   | Criterio         |
|-------------------------------------|---|------------------|
| <i>Salmonella typhimurium</i>       | Virulencia  | A, B, C, D, E, F |
| <i>Erwinia chrysanthemi</i>         | Expresión de la pectato liasa                                       | A, B             |
| <i>Chlamydia trachomatis</i>        | Regulación del desarrollo   | B                |
| <i>Klebsiella aerogenes</i>         | Inducción del operón <i>hut</i>                                     | B, E             |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>        | Metabolismo de nitrógeno y regulación de enzimas del ciclo de Krebs | A, B             |
| <i>Serratia marcescens</i>          | Catabolismo de carbono  | B, C             |
| <i>Bordetella pertussis</i>         | Patogenicidad   | D                |
| <i>Bordetella bronchiseptica</i>    | Patogenicidad   | D                |
| <i>Bacillus anthracis</i>           | Patogenicidad   | D                |
| <i>Legionella pneumophila</i>       | Desarrollo celular  | B                |
| <i>Vibrio spp.</i>                  | Bioluminiscencia y producción de proteasas                          | A, B, C, D       |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i>      | Producción de antibióticos  | A, B             |
| <i>Rhodocyclus gelatinosus</i>      | Regulación de genes fotosintéticos                                  | B, C             |
| <i>Anabaena spp.</i>                | Formación del aparato fotosintético                                 | B, C, D          |
| <i>Streptomyces spp.</i>            | Esporulación y síntesis de celulosa                                 | B, C             |
| <i>Thermomonospora curvata</i>      | Producción de celulosa  | B, C             |
| <i>Clostridium botulinum</i>        | Esporulación  | A, B, C          |
| <i>Photobacterium spp.</i>          | Expresión del gen <i>ampH</i>                                       | A, B             |
| <i>Spirulina platensis</i>          | Movilidad   | B, C, D          |
| <i>Mycoplasma pneumoniae</i>        | Represión catabólica  | B                |
| <i>Mycobacterium smegmatis</i>      | Síntesis de ácidos grasos   | B                |
| <i>Nocardia salmonicolor</i>        | Regulación de la isocitrato liasa                                   | B, C             |
| <i>Alcaligenes eutrophicus</i>      | Expresión de la hidrogenasa   | B                |
| <i>Arthobacter crystallopoietes</i> | Morfogénesis  | B, C             |
| <i>Myxobacterias</i>                | Formación de esporas y del cuerpo fructífero                        | B, C             |
| <i>Nostoc mucorum</i>               | Morfogénesis  | B                |

Esta tabla es una modificación de la Tabla 2 presentada por Botsford y Harman (1992). Criterios: A. La glucosa reprime la síntesis de enzimas; B. Función afectada por la adición de AMPc; C. Cuantificación de nucleótidos cíclicos; D. Evidencias genéticas, locus *cya* *y/o* aparentes mutantes *cya* y *crp*; E. Evidencias de la expresión de genes *in vitro*; F. Sitios de unión para CRP presentes en las regiones promotoras.

**Fotosíntesis.** En la bacteria fotosintética *Rhodocyclus gelatinosus*, el AMPc reduce la cantidad de pigmentos involucrados en la fotosíntesis, lo que sugiere que el nucleótido participa en la regulación de la expresión de genes involucrados con el proceso fotosintético (Murray *et al.*, 1988). En la cianobacteria *Anabaena cylindrica*, los niveles de AMPc se incrementan

notablemente cuando las células crecidas en condiciones de luz se cambian a la oscuridad (Ohmori *et al.*, 1988). En *Anabaena variabilis*, el AMPc interfiere con la formación de aparato fotosintético (Smith *et al.*, 1981).

**Morfogénesis.** Bacterias del género *Arthrobacter* presenta formas circulares cuando crecen en fase exponencial y cambian su morfología a bastones al entrar en fase estacionaria. El AMPc inhibe este cambio de morfología cuando se adiciona a cultivos celulares (Hamilton *et al.*, 1977). Concomitantemente, mutantes que no presentan esta transición de morfología producen reducidos niveles de AMPc. Tales evidencias sugieren que el AMPc participa en la regulación de la morfología en estas bacterias (Hamilton *et al.*, 1978).

## **ANTECEDENTES Y OBJETIVOS**



## LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

La fijación biológica del nitrógeno es el proceso mediante el cual el dinitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) es reducido a amonio ( $NH_4^+$ ), por la acción de la enzima nitrogenasa. Este proceso está restringido a los procariontes y lo encontramos tanto en eubacterias como en arqueobacterias. Algunas bacterias de los generos *Klebsiella*, *Azotobacter* y *Anabaena*, por citar algunas, fijan nitrógeno en vida libre para satisfacer sus propios requerimientos (Diazótrofos). Otras bacterias, particularmente de la familia Rhizobiaceae, reducen el dinitrógeno mediante asociaciones simbióticas con plantas leguminosas y algunas como *B. japonicum*, son capaces de fijar nitrógeno tanto en vida libre como en simbiosis. La fijación simbiótica de nitrógeno requiere de la formación de nódulos, estructuras especializadas en las raíces de las leguminosas, que albergan a las tipos bacterianos directamente encargados de la reducción del  $N_2$ , denominados bacteroides. Durante está interacción la bacteria cede a la planta el nitrógeno fijado a cambio de una serie de metabolitos necesarios para el funcionamiento del bacteroide. El establecimiento de un relación simbiótica efectiva que culmine con la formación de nódulos y la consecuente fijación de nitrógeno es un proceso altamente específico, en algo casos una leguminosa solo es capaz de interactuar con un grupo muy reducido de bacterias. Por ejemplo, *Phaseolus vulgaris* (frijol) interactúa con *Rhizobium etli*, *Pisum sativa* (chícharo) con *Rhizobium leguminosarum*, *Medicago sativa* (alfalfa) con *S. meliloti* y *Glycine max* (soya) lo hace con *B. japonicum* y *S. fredii*. La fijación simbiótica de nitrógeno suministra cada año más del 50% del nitrógeno que es reintegrado a los seres vivos. Evidentemente, el estudio de este fenómeno tiene gran importancia desde el punto de vista ecológico y agronómico, pero también el establecimiento de la simbiosis entre *Rhizobium* y leguminosa ha probado ser un excelente modelo del estudio de las interacciones planta-microorganismo.

## LOS NUCLEÓTIDOS CÍCLICOS EN LAS RHIZOBIACEAS

En procariontes, los nucleótidos cíclicos como el AMPc y el GMPc, son señales intracelulares que controlan diversos fenómenos. Mientras que el AMPc se ha detectado casi en todas las bacterias, la presencia de GMPc se ha reportado principalmente en cianobacterias (Botsford y Harman, 1992; Ochoa de Alda *et al.*, 2000). Durante la fijación de nitrógeno el patrón de la expresión génica en ambos organismos sufre cambios drásticos. La naturaleza de las señales involucradas en este proceso de expresión génica diferencial no están del todo aclaradas. Distintos reportes describen la presencia de AMPc y GMPc en algunas especies de la familia

Rhizobiaceae, e involucran a estas moléculas con funciones celulares tales como: la represión catabólica, la regulación de la asimilación de amonio durante la simbiosis y la regulación del metabolismo de hidrógeno.

En vida libre las rhizobiaceas se confrontan con una gran variedad de fuentes de carbono, cuya cantidad y calidad son un factor limitante para su crecimiento. Por esta razón, es de suma importancia contar con un mecanismo eficiente de represión catabólica. En algunas rhizobiaceas se han descrito fenómenos de represión catabólica similar al de *E. coli*, con la diferencia de que en *Rhizobium* son ácidos dicarboxílicos, como el succinato o malato, en lugar de la glucosa, las moléculas que ejercen el efecto represor. Numerosas investigaciones se han enfocado en esclarecer los mecanismos que controlan la represión catabólica en estas bacterias. Ucker y Signer (1978) reportan por vez primera, la existencia de un fenómeno de represión catabólica en *Sinorhizobium meliloti* (antes *Rhizobium meliloti*). Describen como la adición de succinato a células cultivadas en medios suplementados con lactosa, como única fuente de carbono, causa una inmediata reducción de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa. Arias y colaboradores (1982) reportan que en *S. meliloti*, ácidos dicarboxílicos, como el succinato y el malato, reprimen el catabolismo de la manosa. Rohm y colaboradores (1985) demuestran que el succinato reprime la respiración de fenol de bacteroides y de células en vida libre de *B. japonicum*. Stowers y Elkan (1985) describen que en *B. japonicum*, el succinato regula los niveles de distintas enzimas del catabolismo de hexosas pertenecientes a las rutas metabólicas de Entner-Doudoroff (ED) y Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). En *B. japonicum*, las enzimas encargadas de la utilización del formato (formato deshidrogenasa y RuBP carboxilasa) están sujetas a represión catabólica por ácidos dicarboxílicos, según reportes de Simpson (1979) y Manian (1982). En las investigaciones realizadas por McGetrick (1985) se plantea que distintas fuentes de carbono, entre ellas intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, ejercen represión sobre la fijación de CO<sub>2</sub> al reducir la actividad de la enzima RuBP carboxilasa de *S. meliloti*. Mandal y Chakrabarty (1993A) reportan que las enzimas de las rutas ED y EMP encargadas del metabolismo de hexosas en *M. ciceri* son inducibles por glucosa y están sujetas a represión catabólica por el succinato. Extrañamente, en ninguno de estos estudios fue posible involucrar al AMPc en la regulación de la represión catabólica.

Por otra parte, durante la simbiosis, los bacteroides activan la síntesis de la nitrogenasa al mismo tiempo que reprimen la síntesis de las enzimas encargadas de asimilar el amonio. Upchurch y Elkan (1978) observan que en *B. japonicum*, la expresión de tres enzimas involucradas en la asimilación de amonio (glutamino sintetasa, glutamato sintasa y glutamato deshidrogenasa) se reduce drásticamente por la adición de AMPc a cultivos celulares crecidos en medios suplementados con NH<sub>4</sub>Cl. Basados en este hecho, los autores sugieren que en *B. japonicum* el AMPc puede tener algún papel durante la simbiosis. Catenese y colaboradores (1989) reportan

que en bacteroides de *B. japonicum*, la AC y la fosfodiesterasa de AMPc presentan distintos patrones de actividad. Los autores analizan la actividad de ambas enzimas en bacteroides y concluyen que mientras la actividad de fosfodiesterasa disminuye conforme el nódulo se desarrolla, la actividad de AC se incrementa. Lo anterior sugiere que el AMPc tiene un papel durante la simbiosis. Lim y Shanmugam (1979A) reportan que en *B. japonicum* la presencia de algunos intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, como malato o succinato, reducen la utilización de hidrógeno molecular ( $H_2$ ), y que en células crecidas en medios suplementados con malato como única fuente de carbono, la adición de AMPc alivia la inhibición ejercida por el malato sobre la toma de  $H_2$ . Ambas observaciones concluyen que el AMPc participa en la regulación del metabolismo del  $H_2$ . En el mismo reporte se demuestra que las pozas de AMPc intracelular varían dependiendo de la fuente de carbono disponible. Los niveles del nucleótido fueron bajos cuando las células se crecieron en malato, pero altos cuando se crecían en glutamato. Posteriormente MacGetrick (1985) introduce una copia del gen *cya1* de *S. meliloti* en *B. japonicum* y observa como el efecto represor del malato sobre la toma de  $H_2$  es totalmente abatido. Cuando *M. ciceri* crece en acetato, la adición de succinato causa represión de la actividad de la isocitrato liasa, enzima de la ruta del glioxilato. La adición de AMPc a este cultivo alivia substancialmente la represión ejercida por el succinato (Mandal y Chakrabarty, 1993B). Por otra parte, Lim y colaboradores (1979B) involucran al GMPc con la fijación de nitrógeno en la vida libre de *B. japonicum*. Los autores observan que la adición de GMPc, en concentraciones menores de 100  $\mu$ M, a cultivos de *B. japonicum* abaten completamente la actividad de nitrogenasa y reducen la actividad de hidrogenasa y nitrato reductasa. En el mismo reporte se describe como los niveles intracelulares de GMPc de *B. japonicum* disminuyeron cuando la actividad de nitrogenasa se indujo. En un trabajo posterior se observó que la adición de GMPc a cultivos de *B. japonicum* inhibía el crecimiento de la bacteria. Esta inhibición fue independiente de la fuente de carbono y nitrógeno utilizada en el medio de cultivo (Jones *et al.*, 1985).

## LAS ADENIL CICLASAS DE LAS RHIZOBIACEAS

En los genomas, recientemente secuenciados, de *M. loti*, *S. meliloti* y *A. tumefaciens* se identificaron 12, 26, y 3 genes, respectivamente, cuyos productos poseen regiones homólogas a las dominios catalíticos de las AC's de la clase III. Así mismo, no se identificaron genes que codificaran AC's de otra clase (Kaneko *et al.*, 2000; Galibert *et al.*, 2001; Wood *et al.*, 2001). Sorprendentemente, *S. meliloti* es la bacteria que posee mayor cantidad de genes que codifican para AC's/GC's. En trabajos anteriores se habían clonado y secuenciado 3 de los 26 genes *cya* de

*S. meliloti* (Kiely *et al.*, 1983; Beauve *et al.*, 1990; Archdeacon *et al.*, 1995; Shapyrova *et al.*, 1999). Los productos de estos genes (*cya1*, *cya2* y *cya3*), se agruparon en la clase III debido a que poseen regiones similares a los dominios catalíticos de las ciclasas eucariontas. Las AC's/GC's de *S. meliloti* fueron clasificadas en dos tipos. Las ciclasas del tipo I (19 proteínas) presentan un dominio responsable de la actividad de ciclasa ubicado en el extremo carboxilo y solo algunas de estas poseen dominios transmembranales ubicados en el extremo amino. Las ciclasas del tipo II (7 proteínas) tienen un dominio catalítico en el extremo amino asociado a secuencias repetidas similares a las tetracoceptidos (TPR's) ubicadas en el extremo carboxilo. Los TPR's son motivos degenerados de 34 residuos de aminoácidos, usualmente repetidos en tándem, y que están involucrados en interacciones intra e intermoleculares entre proteínas. Particularmente, la *Cya3* posee cuatro secuencias TPR's muy similares a las que presentan las proteínas TfuA y CycH de *Rhizobium leguminosarum* y *S. meliloti*, respectivamente. La proteína TfuA esta involucrada con la producción del antibiótico trifolioxina (Tfx) y CycH participa con la biogénesis del citocromo C (Shapyrova *et al.*, 1999). Mientras que 4 de las 12 ciclasas de *M. loti* presentan secuencias TPR's, ninguna de las ciclasas de *A. tumefaciens* presenta éste tipo de secuencias.

Por otra parte, la complementación de una mutante *cya* de *E. coli* permitió la clonación de una región de ADN de *B. japonicum* que posiblemente codifica para una AC. No existe secuencia de este fragmento de ADN, sin embargo, experimentos de hibridación tipo Sourthen demostraron que el probable gen *cya* de *B. japonicum* no muestra similitud con su contraparte en *E. coli* (Guerinot y Chelm, 1984).

La clonación de los 3 genes *cya* de *S. meliloti* permitió la construcción de cepas mutantes *cya*. Tanto las mutantes sencillas (*cya1* y *cya2*) como la doble mutante (*cya1cya2*), reducen la producción de AMPc, con respecto a la cepa parental (F34), pero no la abaten. Ninguna de estas cepas presentó alteraciones en sus propiedades simbióticas o en vida libre (Boesten *et al.*, 1988; Archdeacon *et al.*, 1995). Una situación similar se presentó en el caso de la mutante *cya* de *B. japonicum*. (Guerinot y Chelm, 1985). Sorprendentemente, la mutante *cya3* de *S. meliloti* (T482), generada por la inserción de un transposón Tn5, incrementó su capacidad simbiótica en comparación con la cepa parental CXM1-105 (Shapyrova *et al.*, 1999).

### **La proteína CRP en Rhizobiaceas**

No obstante que algunas evidencias experimentales sugieren la presencia de una proteína homóloga a CRP en rhizobiaceas (McGetrick *et al.*, 1985B) y que incluso la involucran de manera directa en el control de la expresión del operón *dctABD* de *S. meliloti* (Wang *et al.*, 1993). La búsqueda de proteínas homólogas a CRP en las secuencias de los genomas de *M. loti*, *S. meliloti* y *A. tumefaciens*, no arroja ninguna proteína que presente una similitud superior al 20%.

## EL AMPc EN *Rhizobium etli*

El sistema modelo de estudio en el laboratorio es el endosimbionte del frijol, *Rhizobium etli*. Esta bacteria es la que más frecuentemente se encuentra asociada a raíces de frijol en la región central de México (Martínez *et al.*, 1985). Son bacilos Gram negativos, aeróbicos, capaces de crecer en medio mínimo suplementados con ácidos dicarboxílicos como la mejor fuente de carbono. La cepa CE3, cepa tipo de ésta especie, se caracteriza por poseer seis plásmidos denominados p42a, p42b, p42c, p42d, p42e y p42f (cuyos tamaños varían entre 120 y 750 kb), y por la presencia de 2 copias de los genes *nifDK* y 3 de *nifH*, que codifican las enzimas nitrogenasa y nitrogenasa reductasa, respectivamente. Las copias de estos genes *nif* se localizan, junto con la mayoría de los genes necesarios para la fijación de nitrógeno, en el p42d, también llamado plásmido simbiótico o pSym (Segovia *et al.*, 1993).

Mora y colaboradores (1993A) reportaron como distintas rhizobiáceas al ser subcultivadas consecutivamente en medio mínimo (MM) disminuyen su crecimiento con un patrón característico de cada especie. Particularmente, la cepa CE3 de *R. etli* al ser subcultivada en MM presenta un metabolismo que asemeja al fermentativo, ya que excreta aminoácidos, ácidos orgánicos (algunos son intermediarios de ciclo de Krebs), y acumula poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) en grandes cantidades. El crecimiento de la cepa CE3 se mantiene constante cuando se inocula a baja densidad o cuando el O<sub>2</sub> se mantiene al 20%. De igual manera, la adición al MM de suplementos como tiamina, biotina o AMPc permiten que la cepa CE3 continúe creciendo ininterrumpidamente (Encarnación *et al.*, 1995). Estos datos permiten suponer que el AMPc es una señal involucrada con el cambio del metabolismo aeróbico a fermentativo en *R. etli*. Por otra parte, Mora y colaboradores (1993B) describen que en la cepa CE3 de *R. etli*, el succinato reprime la utilización de glutamina en cultivos crecidos en presencia de ambas fuentes de carbono y que la adición de AMPc en este medio de cultivo provoca que la glutamina sea utilizada en mayor proporción que el succinato. Así mismo, los niveles de AMPc acumulados por *R. etli* cuando crece en medio mínimo glutamina fueron seis veces mayores que cuando crece en medio mínimo succinato-amonio, indicando que el AMPc puede ser una señal de privación de carbono en esta bacteria.

## OBJETIVOS

No obstante que el AMPc se ha implicado en el control de diversas funciones celulares en distintas especies de la familia Rhizobiaceae, la carencia de mutantes deficientes en la síntesis de AMPc ha impedido discernir en forma precisa el papel del nucleótido en este importante grupo de bacterias. El trabajo de mis estudios de la maestría y del doctorado se enfocan en el aislamiento y la caracterización de los elementos genéticos encargados de la síntesis del AMPc en *Rhizobium etli*, así como a la construcción y al análisis de las cepas mutantes consecuentes.

## **RESULTADOS**

## ANTECEDENTES DIRECTOS

En el trabajo desarrollado durante el Doctorado retomé los avances obtenidos durante mis estudios de Maestría. En seguida hago una breve reseña de algunos de los resultados más relevantes: Con la finalidad de aislar e identificar genes de *R. etli* que codificaran para AC's, complementamos el fenotipo *lac* de una mutante *cya* de *E. coli* con ADN procedente de un banco de cósmidos de la cepa CE3. Esta estrategia nos permitió aislar los cósmidos pTS933, pTS934, pTS1179 y pTS1190. Experimentos de hibridación tipo Southern nos confirmaron que dos de estos (pTS933 y pTS1190) están sobrelapados y que comparte dos fragmentos *EcoRI* de 2 y 1 kb. A partir de los cósmidos pTS1179, pTS933, y pTS934 generamos las clonas recombinantes pEVSm, pE2, y p33.10, que contienen fragmentos *EcoRV/SmaI* de 2.3, *EcoRI* de 2, y *Sall* de 2.8 kb, respectivamente. Las tres clonas recombinantes le permitieron a la mutante *cya* de *E. coli* crecer en lactosa, ser móviles y recuperar la sensibilidad a fosfomicina y serina. Así mismo, las cepas complementadas fueron capaces de sintetizar y acumular AMPc en distintas concentraciones (Tabla 7). Con estos resultados concluimos que habíamos aislado tres genes *cya* que codifican distintas AC's en *R. etli*. La secuencia nucleotídica de la clona pE2 nos reveló la existencia de un marco de lectura abierto que nombramos *cyaB* porque codifica una proteína de 364 residuos que tiene gran similitud con la AC2 (Cya2) de *S. meliloti*. Ambas AC's conservan los motivos característicos de las AC's/GC's de la clase III. La inserción de un interposón dentro de *cyaB*, nos permitió construir la mutante en *R. etli*. Esta mutante no presentó diferencias con la cepa silvestre en los fenotipos analizados. Estos resultados nos permiten suponer CyaB es dispensable para el crecimiento del rhizobio tanto en vida libre como en simbiosis.

**Tabla 7. Niveles de AMPc en las cepas *cya* de *E. coli* complementadas.**

| Cepas                      | AMPc<br>(pmol/mg prot) |
|----------------------------|------------------------|
| W3110 (silvestre)          | 318 (±32)              |
| CON1 ( <i>cya</i> )        | ND                     |
| CON1/pRKACec               | 650 (±42)              |
| CON1/pEVSm ( <i>cyaA</i> ) | 1265 (±113)            |
| CON1/pE2 ( <i>cyaB</i> )   | 833 (±98)              |
| CON1/p3310 ( <i>cyaC</i> ) | 125 (±13)              |

El AMPc se cuantificó a partir de crecimientos exponenciales de las distintas cepas cultivadas en medio mínimo M9 lactosa-causaminóidos, empleando el kit "Cyclic AMP [<sup>3</sup>H] Assay System" de Amersham. El pRKACec contiene un fragmento de ADN de 2.8 kb que codifica a la adenil ciclasa de *E. coli* (Tabla 10). Cada valor es el promedio de tres estimaciones independientes. La desviación estandar se muestra entre paréntesis. ND=No detectado.



## LOS PLÁSMIDOS pEVSm, pE2 y p3310 CODIFICAN DISTINTAS ADENIL CICLASAS

### Plásmido pEVSm

En la secuencia nucleotídica de esta clona identificamos dos ORF's (Fig. 5A). El ORF1 codifica una proteína de 457 residuos y tiene una masa molecular calculada de 50.8 kD. El producto de este ORF, particularmente la región carboxilo, muestra gran similitud con el dominio catalítico de AC's/GC's de la clase III. El ORF2 orientado en el mismo sentido que el ORF1, codifica un péptido de 83 residuos de aminoácidos que tiene 40% de identidad con el extremo amino de proteínas de la familia de los transportadores tipo ABC, particularmente con la proteína OppD de *B. subtilis*. Este ORF está truncado al término de la clona pEVSm. La inserción de un interposon ( $\Omega$ Tc) dentro del ORF1 abate la capacidad del pEVSm para complementar a la mutante *cya* de *E. coli*, confirmando que éste ORF es el responsable del fenotipo de complementación. Estos resultados nos indican que el ORF1 codifica una AC que pertenece a la clase III y a la cual hemos llamado CyaA. Ninguna secuencia similar a un sitio de unión a ribosoma (RBS) o a un promotor pudo reconocerse corriente arriba de *cyaA*. Distintos análisis *in silico* (DAS, TopPred2) nos indican que CyaA es una proteína citoplásmica. Los cuatro motivos altamente conservados en los dominios catalíticos de las AC's/GC's de la clase III están presentes en CyaA. En experimentos de hibridación tipo Southern, utilizando como sonda un fragmento interno de *cyaA* e hibridando contra el perfil plasmídico de la cepa CE3 de *R. etli*, se demostró que *cyaA* se localiza en el p42e. Así mismo, este experimento evidenció la presencia de una segunda señal de hibridación menos intensa localizada en el cromosoma y que probablemente corresponde a un nuevo gen *cya*.

### Plásmido pE2

Como se había mencionado anteriormente, la secuencia nucleotídica de la clona pE2 muestra dos ORF's (Fig. 5B). El ORF1 codifica una proteína de 353 residuos de aminoácidos con una masa molecular calculada de 39.2 kD, que muestra gran similitud con AC's/GC's de la clase III. El ORF2, orientado en el mismo sentido que el ORF1, se encuentra truncado en su extremo 3'. Este ORF codifica un péptido de 291 residuos de aminoácidos que tiene similitud con una proteína hipotética de *Campylobacter jejuni*. La región central de ambas proteínas presenta similitud con glicerolfosfodiesterasas. El producto del ORF1 tiene un 55% de identidad con la AC2 codificada por el gen *cya2* de *S. meliloti*. La inserción de un interposón ( $\Omega$ Km) dentro del ORF1 abate la capacidad de la clona pE2 para complementar a la mutante *cya* de *E. coli*, confirmando que este ORF es el responsable del fenotipo de complementación. Aunados ambos resultados nos indican que el ORF1 codifica una AC que pertenece a la clase III y que hemos llamado CyaB. Un probable RBS está ubicado a 7 bp corriente arriba del codón de inicio de CyaB. Ninguna secuencia similar a un promotor se reconoce corriente arriba de *cyaB*. Distintos análisis *in silico*

predicen que CyaB presenta tres dominios transmembranales en el extremo amino, estos dominios también están conservados en la Cya2 de *S. meliloti* (Archdeacon *et al.*, 1995). Los motivos altamente conservados en las AC's/GC's de la clase III están también presentes en ambas ciclasas. Experimentos de hibridación tipo Southern mostraron que *cyaB* se localiza en el cromosoma de *R. etli* como copia única.

### Plásmido p3310

La secuencia nucleotídica de la clona p3310 presenta tres ORF's (Fig. 5C). Ninguno de estos tiene similitud con alguna AC descrita en las bases de datos, ni conservan dominios característicos de alguna de las distintas clases de AC's. Nosotros demostramos que el ORF3, al cual llamamos *cyaC*, codifica una adenil ciclasa nunca antes descrita y proponemos que representa una nueva clase de AC's, la clase VI. La caracterización de esta nueva clase, aunado al análisis fenotípico y de expresión de *cyaC* se presenta en el artículo anexo.

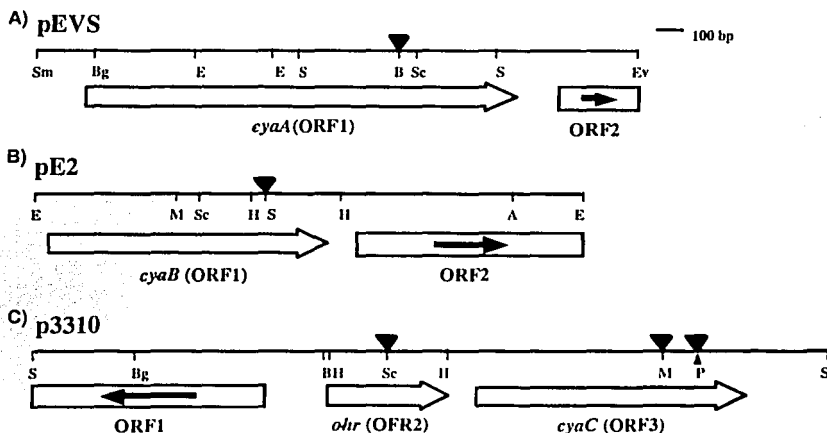


Figura 5. Mapa físico de los plásmidos pEVSm (A), pE2 (B) y p3310 (C). Las flechas representan la orientación de los marcos de lectura abiertos. Los rectángulos con una flecha negra representan marcos de lectura abiertos pero truncados en su extremo 3'. Todos los marcos señalados tienen similitud con alguna proteína en las bases de datos excepto el marco 3 del panel C (ver el texto para los detalles). Los triángulos negros indican los sitios donde se insertará el interposon omega ( $\Omega$ ) o el cassette *Km-lacZ*. Los sitios de restricción señalados son: S (*Sall*), Sm (*Sma*I), Bg (*Bgl*I), B (*Bam*HI), M (*Mlu*I), P (*Pst*I), A (*Apa*I), II (*Hind*III), Sc (*Sac*I), E (*Eco*RI), Ev (*Eco*RV).

## CyaA y CyaB ¿ADENIL o GUANIL CICLASAS?

El alineamiento de las secuencias de los dominios catalíticos de las ciclasas CyaA y CyaB de *R. elli* y de las ciclasas Cya1, Cya2 y Cya3 de *S. meliloti*, nos demuestra la gran similitud que tienen las ciclasas rhizobianas con el dominio C2 de la ACII de rata (Fig. 6). Las ciclasas rhizobianas, al igual que todas las AC's bacterianas de la clase III, poseen solo un dominio catalítico que conserva los tres residuos esenciales para la actividad de ciclasa (D, N y R). Por esta razón, es probable que estas AC's se conformen de manera homodimérica generando dos sitios catalíticos.

|                         |     |   |
|-------------------------|-----|---|
| CyaA <i>R. elli</i>     | 234 | Q <b>B</b> ST I R A A L V M Q D M R E S T M V A E K E G R Q . . . . . A Y I D T L N Q F |
| CyaB <i>R. elli</i>     | 152 | P V R E E R V F L F I D L V D S T A F A E K H G D L . . . . . R A Q I L S S L L         |
| Cya1 <i>S. meliloti</i> | 1   | . . . . . M F T D I Y D F T T I S E G R S P E . . . . . E V V A M L S E V Y             |
| Cya2 <i>S. meliloti</i> | 151 | P V Q E E R V F L F I D L A G S T S L A E R F Q D L . . . . . R M H E Y L G K L         |
| Cya3 <i>S. meliloti</i> | 6   | I R R R L A A T L A A D T V G Y S R L M E R D E K S . . . . . T H L L M A R W           |
| ACII-C2                 | 879 | Q S Y D C V G V M F A S I P D F K E F Y T E S D V N K E G L E C L R L L N E I I A D     |

|                         |  |   |
|-------------------------|--|---|
| CyaA <i>R. elli</i>     |  | F D I A I T A A F F N R N G G E I L S E L O D Q F L A Y V P C G R . . . . . H X D P S K I |
| CyaB <i>R. elli</i>     |  | F I A T F A I F V R R R H K G M I N D Y V G D A I I T W P L A R . . . . . G V             |
| Cya1 <i>S. meliloti</i> |  | P D L E S E V Y A A H D G T I I O E H G D S V F A N W N A P V . . . . . A D F R H         |
| Cya2 <i>S. meliloti</i> |  | F E A M A D P V L R Y G G S I D D Y V G D A V A I T W P Y D R . . . . . A Q               |
| Cya3 <i>S. meliloti</i> |  | K E V L E L V G I H Q R V R V K R T G D G V L V E F G S A V N A V E C A A L Q V           |
| ACII-C2                 |  | F D D L L S K P F S Q V E K I K T I G S T Y M A A T G L S A I P S Q E H A Q E P E         |

|                         |  |   |
|-------------------------|--|---|
| CyaA <i>R. elli</i>     |  | A C B T A A L S A V H Q A Q A R V A E L N G E R E Q K G L S K I G Y G I G L H V Q N V   |
| CyaB <i>R. elli</i>     |  | K D A R C V R C I F D T I I A D R I D A N A A G W R K N Y G Q V P K L R A A L H G Q E I |
| Cya1 <i>S. meliloti</i> |  | A E H A C R C L A L A V E E R L E A E N S A Q R A S O L P E F R T R F Q T I T G T A     |
| Cya2 <i>S. meliloti</i> |  | A D A A C R C V F D I L E Q T E A D A H R W Q K D Y G E V P R L R A A L H G G T I       |
| Cya3 <i>S. meliloti</i> |  | M A A A R R . . . D . . . . . I P E D R A T I V L R V G V N L G D I                     |
| ACII-C2                 |  | R Q Y M H T G T M V E E A Y A L V G K L D A I N K H S F N D F K L R V G I N R G P V     |

|                         |  |   |
|-------------------------|--|---|
| CyaA <i>R. elli</i>     |  | M F Q N V G L S K D R L T F S A F G S A V N E V O R L Q I L T K K Y Q R E V Y A S Q A E |
| CyaB <i>R. elli</i>     |  | I T A E V G V J D H I I K I S Y F G D T V N T T A R L E T L C R S L N R O V L J S A E   |
| Cya1 <i>S. meliloti</i> |  | V V G S V A K E R L Q Y T A M G D T V N V A S R L E G M N K D Y G T S V L S G A         |
| Cya2 <i>S. meliloti</i> |  | V A E I G V D K H K I T Y F G D T V N T T A R L E G L C R T L N R O V L J S A D         |
| Cya3 <i>S. meliloti</i> |  | M V L E . . . . . D S D L F E G D G V N V A A R I E A L A D P G G . . . V A I S .       |
| ACII-C2                 |  | I A G V I G A Q K P . Q Y D I W G N T V N V A S R M D S T G V L D K I Q V T E E T S     |

|                         |  |  |
|-------------------------|--|--|
| CyaA <i>R. elli</i>     |  | F A G Y C . . . . G G E W T R L G E E K . L R C I R Q K V T V L Q P R - 430      |
| CyaB <i>R. elli</i>     |  | L A R R M T F P D I S C D D L G I H A . V K G R G Q A L L G V N A L S - 316      |
| Cya1 <i>S. meliloti</i> |  | V Y A Q C K . . . D M V F R D L F G T A R . A K G R S T A L D I H E V V - 178    |
| Cya2 <i>S. meliloti</i> |  | R L R R L R P P V F V A E D L I G E H E . V K G R G Q K L A V L S L T - 315      |
| Cya3 <i>S. meliloti</i> |  | . . . . . D G I H E Y V H G R T D I D F G S G Y - 158                            |
| ACII-C2                 |  | L I L . . . . Q T L G Y T C T C R G T I L N . V K G K G D L K T Y E V N . - 1076 |

Figura 6. Alineamiento de las secuencias de los dominios catalíticos de las ciclasas CyaA y CyaB de *R. elli* y de las tres ciclasas de *S. meliloti* más estudiadas. También se incluye el dominio catalítico C2 de la AC tipo II de rata. Las cajas grises contienen residuos de aminoácidos conservados. Los residuos esenciales para la actividad de ciclasas están marcados con asteriscos. Las flechas señalan a los residuos involucrados con la especificidad por el sustrato.

Sorprendentemente ninguna de las ciclasas de *R. etli*, al igual que las ciclasas Cya1 y Cya2 de *S. meliloti*, conservan los residuos involucrados con la unión y selectividad de sustrato propios de AC's (K, Q y D). Pero tampoco conservan los residuos característicos de GC's (Q, R y C) (Fig. 6). En el alineamiento presentado en la figura 6, la flechas nos indican los residuos involucrados con selectividad de sustrato. Como puede observarse CyaA y CyaB de *R. etli* no conservan ninguno de los tres residuos propios de AC's o GC's. Es probable que estas proteínas en realidad son ciclasas duales, es decir, que tienen la capacidad de sintetizar AMPc y GMPc. Por esta razón, cuantificamos las pozas de GMPc producidas en crecimientos exponenciales de las mutantes *cya* de *E. coli* complementadas con los plásmidos pEVSm, pE2 y p3310.

Las distintas cepas se cultivaron en medio mínimo M9 suplementado con lactosa y casaminoácidos, es decir, en las mismas condiciones empleadas para cuantificar el AMPc. Únicamente las cepas complementadas con pEVSm y pE2 sintetizaron GMPc. Ni en la cepa silvestre, ni en la mutante *cya* y tampoco en la cepa complementada con el p3310 fue posible detectar GMPc (Tabla 8). Los niveles de GMPc sintetizado por las cepas complementadas con pEVSm y pE2 fueron menores en comparación con los niveles de AMPc alcanzados por las mismas cepas. Al igual que en el caso del AMPc, la cepa complementada con el pEVSm presentó niveles de GMPc más altos que los niveles alcanzados por la cepa complementada con el pE2. Es sabido que *E. coli* no posee guanil ciclasas, por lo cual no produce GMPc. Por esta razón, es muy probable que el GMPc detectado haya sido generado por la actividad de guanil ciclasas de las proteínas CyaA y CyaB. El kit "Cyclic GMP-[<sup>3</sup>H] Biotrak Assay" de Amersham, empleado para cuantificar el GMPc, se basa en un inmunoensayo altamente específico, por lo que según los fabricantes no es posible una reacción cruzada con AMPc.

**Tabla 8. Niveles de GMPc en las cepas *cya* de *E. coli* complementadas**

| Cepas                      | GMPc<br>(pmol/mg prot) |
|----------------------------|------------------------|
| W3110 (silvestre)          | ND                     |
| CON1 ( <i>cya</i> )        | ND                     |
| CON1/pEVSm ( <i>cyaA</i> ) | 435 (±35)              |
| CON1/pE2 ( <i>cyaB</i> )   | 210 (±27)              |
| CON1/p3310 ( <i>cyaC</i> ) | ND                     |

El GMPc se cuantificó de manera similar que el AMPc pero empleando el kit "Cyclic GMP-[<sup>3</sup>H] Biotrak Assay" de Amersham. Cada valor es el promedio de tres estimaciones independientes. La desviación estándar se muestra entre paréntesis. ND=No detectado.

## CONSTRUCCION Y EVALUACIÓN FENOTÍPICA DE LAS MUTANTES *cya* DE *R. elli*

### Construcción de Mutantes

A partir de la cepa CE3 de *R. elli* generamos las mutantes sencillas CON13 (*cyaA*) y CON23 (*cyaB*), y la doble mutante CON43 (*cyaA* y *cyaB*). Estas mutantes fueron construidas utilizando los plásmidos pEVSm y pE2 que portan los fragmentos de ADN que codifican los genes *cyaA* y *cyaB*, respectivamente. Dentro de las regiones codificantes de CyaA y CyaB insertamos un interposon omega con resistencia a los antibióticos tetraciclina y kanamicina, respectivamente (Fig. 5). Estas inserciones abaten la capacidad de los plásmidos pEVSm y pE2 para complementar a la mutante *cya* de *E. coli*. Estas construcciones fueron posteriormente subclonadas en el vehículo movilizable y suicida en *Rhizobium*, pWS233. Este vehículo posee los genes *sacRB*, cuyos productos protéicos resultan tóxicos para algunas bacterias Gram negativas, exclusivamente cuando estas son cultivadas en presencia de altas concentraciones de sacarosa (Selbitschka *et al.*, 1993). Los plásmidos resultantes, pWSE2Km y pWSEVSmTc (Tabla 10), fueron movilizados de la cepa S17.1 de *E. coli* a la cepa CE3 de *R. elli*. Estas construcciones nos permitieron seleccionar de manera directa a aquellas cepas de *R. elli* en las que el gen silvestre fue sustituido, mediante un doble evento de recombinación, por el gen mutante. El genotipo de las distintas cepas seleccionadas se analizó a través de experimentos de hibridación tipo Southern.

### Fenotipos en Vida Libre

El fenotipo de las cepas mutantes CON13 (*cyaA*), CON23 (*cyaB*), y CON43 (*cyaAcyb*) se evaluó en las siguientes condiciones de crecimiento: medio rico (PY), medio mínimo (MM) suplementado con distintas fuentes de carbono glucolíticas (glucosa, galactosa, maltosa, lactosa, sacarosa) o gluconeogénicas (glutamina, piruvato, succinato, acetato). Así mismo, cultivos exponenciales de las tres mutantes se sometieron a condiciones estresantes tales como: estrés por peróxido de hidrógeno (200 mM), estrés osmótico (NaCl 100 mM), y estrés por calor (42°C durante 2 min). También examinamos la motilidad de las mutantes en placas de agar suave. En ninguna de las condiciones antes mencionadas observamos diferencias entre el comportamiento de la cepa silvestre (CE3) y las cepas mutantes. Posteriormente, cuantificamos las pozas de AMPc y GMPc en crecimientos exponenciales de las distintas mutantes cultivadas en medio mínimo suplementado con succinato o glucosa como única fuente de carbono (Tabla 9). Las pozas de AMPc producidas por la cepa silvestre fueron similares en ambas condiciones de crecimiento. Todas las cepas mutantes sintetizan niveles de AMPc similares a los alcanzados por la cepa silvestre en el medio suplementado con succinato. Sin embargo, en el medio

suplementado con glucosa, las cepas CON13 (*cyaA*) y CON43 (*cyaAcyab*) presentaron niveles de AMPc menores a los niveles producidos por la cepa silvestre, aproximadamente un 50% y 60%, respectivamente. Por otra parte, los niveles de GMPc producidos por las distintas cepas fueron en lo general muy reducidos en comparación con los niveles de AMPc alcanzados por las mismas cepas. Incluso las desviaciones estandar en todos los casos fueron iguales o mayores que las cantidades presentadas en la tabla 9, por esta razón, en este caso las desviaciones fueron omitidas.

**Tabla 9. Niveles de AMPc y GMPc en las mutante *cya* de *R. etli*.**

| Cepas                     | AMPc<br>(pmol/mg prot) |                     | GMPc<br>(pmol/mg prot) |
|---------------------------|------------------------|---------------------|------------------------|
|                           | Succinato              | Glucosa             | Succinato              |
| CE3                       | 17.63 ( $\pm 1.9$ )    | 22.14 ( $\pm 1.7$ ) | 0.459                  |
| CON13 ( <i>cyaA</i> )     | 17.34 ( $\pm 1.1$ )    | 12.26 ( $\pm 1.6$ ) | 0.931                  |
| CON23 ( <i>cyaB</i> )     | 18.41 ( $\pm 1.6$ )    | 21.41 ( $\pm 2.5$ ) | ND                     |
| CON31 ( <i>cyaC</i> )     | 17.15 ( $\pm 2.2$ )    | 19.99 ( $\pm 1.5$ ) | 1.582                  |
| CON43 ( <i>cyaAcyab</i> ) | 18.10 ( $\pm 2.1$ )    | 8.10 ( $\pm 1.7$ )  | 0.66                   |

Las pozas de nucleótidos fueron cuantificadas a partir de crecimientos exponenciales de las distintas cepas cultivadas en medio mínimo suplementado con succinato o glucosa para el caso del AMPc y succinato en el caso del GMPc. Cada valor es el promedio de tres estimaciones independientes. La desviación estandar se muestra entre paréntesis. ND=No detectado.

### Fenotipos Simbióticos

Finalmente, analizamos el comportamiento de las distintas mutantes en la simbiosis con plantas de frijol. Inicialmente, germinamos semillas de frijol previamente esterilizadas y las cultivamos en invernadero hasta generar plántulas que posteriormente fueron inoculadas con cada una de las cepas mutantes. A los 25 días postinoculación retiramos los sistemas radiculares para evaluar, mediante el ensayo de reducción de acetileno, la actividad de nitrogenasa. Todas las cepas fueron capaces de inducir la generación de nódulos en las raíces de frijol. Como se observa en la figura 7, la actividad específica de nitrogenasa de los nódulos generados con las mutantes sencillas CON13 (*cyaA*), CON23 (*cyaB*) y CON31 (*cyaC*) no presentan diferencias significativas con respecto a la actividad de nitrogenasa alcanzada por los nódulos generados con la cepa silvestre (CE3). Por otra parte, la actividad de nitrogenasa de los nódulos producidos con la cepa doble mutante CON43 (*cyaAcyab*) fue aproximadamente el 50% de la actividad que presentaron los nódulos generados con la cepa silvestre (Fig. 7). No obstante esta disminución en los niveles de actividad, no observamos diferencias en cuanto al número, tamaño y forma de los nódulos generados en las raíces de las plantas inoculadas con la cepa CE3 o con la cepa CON43.

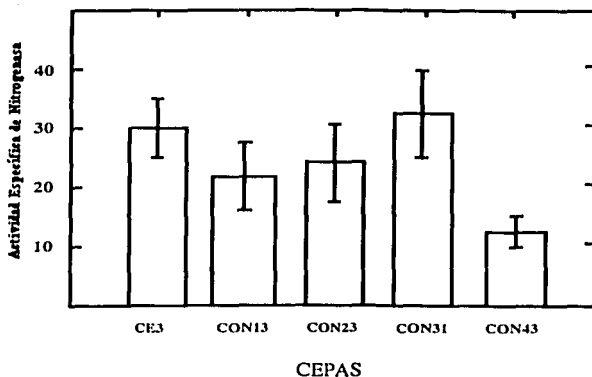


Figura 7. Actividad específica de nitrogenasa de nódulos de frijol generados con las cepas de *R. etli* CE3, CON13 (*cyaA*), CON23 (*cyaB*), CON31 (*cyaC*) y CON43 (*cyaAcyA*). La actividad de nitrogenasa fue analizada mediante el ensayo de reducción de acetileno en nódulos de plantas de 25 días postinoculación. La actividad específica se reporta como micromoles de etileno producidos por hora por gramo de peso seco de nódulos. Los valores graficados corresponden al promedio de la actividad de los nódulos de 10 plantas analizadas en el caso de las cepas CE3 y CON43 y de 5 plantas para el caso de las cepas CON13, CON23 y CON31.

## LOS GENES *cya* DE *R. etli* POSEEN PATRONES DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL

### Construcción de fusiones transcripcionales *cya::LacZ*

Para estudiar el patrón de expresión de los genes *cya* de *R. etli*, generamos fusiones transcripcionales de los tres genes con el gen reportero *lacZ* de *E. coli* e integramos dichas fusiones en el genoma de la cepa CE3 de *R. etli*. Las fusiones transcripcionales se construyeron empleando los plásmidos pEVSm y pE2 e insertando un cassette Km-*lacZ*, en ambas orientaciones, dentro de las regiones codificantes de las AC's. El gen *lacZ* de este cassette carece de un promotor, por lo que solo puede ser transcrito cuando se encuentra orientado en la posición adecuada con respecto a un promotor externo (Kokotek y Lotz, 1989). La figura 5 muestra los sitios donde el cassette fue insertado dentro de los distintos genes. Las distintas construcciones se subclonaron en el vehículo pWS233 y posteriormente se transfirieron de la cepa S17.1 de *E. coli* a la cepa CE3 de *R. etli*. El pWS233 nos permitió seleccionar aquellas cepas en las que el gen silvestre fue sustituido por la fusión transcripcional (Selbitschka *et al.*, 1993). El genotipo de las distintas cepas fue analizado mediante hibridaciones tipo Southern.

### **Análisis de la expresión de los genes *cya* de *R. elli***

La actividad de  $\beta$ -galactosidasa se ensayó a partir de crecimientos exponenciales de las distintas mutantes cultivadas en las siguientes condiciones de crecimiento: medio rico (PY), MM suplementado con fuentes de carbono glucolíticas o gluconeogénicas. Inicialmente notamos que tanto la cepa parental (CE3) como las cepas CON22 y CON32, que poseen el cassette insertado en contrasentido de la transcripción de *cyaA* y *cyaB*, respectivamente, presentaron niveles actividad de  $\beta$ -galactosidasa muy reducidos en todas las condiciones ensayadas. Incluso en los crecimientos en presencia de lactosa como única fuente de carbono, la actividad generada por la cepa parental fue muy baja (Fig. 8). Por esta razón asumimos que la actividad de  $\beta$ -galactosidasa producida por el resto de las cepas refleja la actividad del promotor de *cyaA* y *cyaB*. Los niveles de actividad de  $\beta$ -galactosidasa de las cepas CON11 y CON21, que tienen insertado el cassette *Km-lacZ* en el sentido de la transcripción de *cyaA* y *cyaB*, respectivamente, fueron consistentemente más elevados que los niveles que presentó la cepa parental. En la figura 8 observamos como los niveles de actividad de  $\beta$ -galactosidasa que exhibió la cepa CON11 oscilaron dependiendo de la fuente de carbono suplementada al MM. Cuando la cepa CON11 se cultivó en medios con fuentes de carbono glucolíticas, como galactosa y maltosa, presentó mayores niveles de actividad de  $\beta$ -galactosidasa (~750 unidades) en comparación con los niveles de actividad que mostró cuando se creció en fuentes de carbono gluconeogénicas como succinato o piruvato (~350 unidades). Por otra parte, los niveles de actividad de  $\beta$ -galactosidasa que exhibió la cepa CON21 se mantuvieron constantes (~300 unidades) en todos los medios de cultivo empleados. Estos resultados nos indican que los genes *cyaA* y *cyaB* de *R. elli* poseen patrones de expresión diferencial. Mientras que la expresión del gen *cyaA* depende de la fuente de carbono empleada en el medio de cultivo, la expresión del gen *cyaB* es constitutiva.



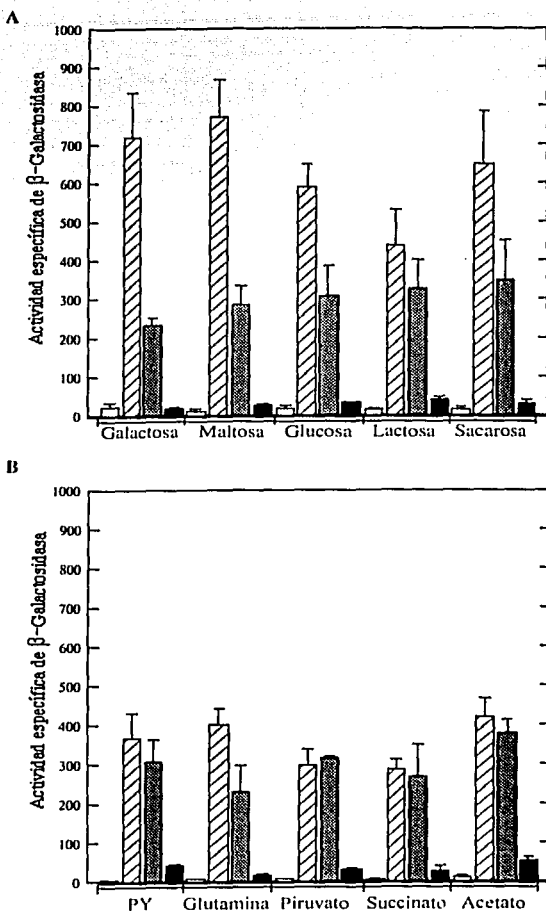


Figura 8. Expresión de los genes *cya* de *R. etli*. Las cepas CE3 (WT) □, CON11 (*cyaA-lacZ*) ▨, CON21 (*cyaB-lacZ*) ▩ y CON31 (*cyaC-lacZ*) ■ fueron crecidas en medio mínimo suplementado con fuentes de carbono glucolíticas (A) o gluconeogénicas (B). La actividad específica de  $\beta$ -galactosidasa se reporta como nanomoles de o-nitrofenol producidos por minuto por microgramo de proteína.

Tabla 10. Cepas bacterianas y plásmidos empleados en este trabajo.

| Cepas y Plásmidos | Descripción   | Referencia                       |
|-------------------|---|----------------------------------|
| <i>E. coli</i>    |   |                                  |
| HB101             | F-, <i>hsdS20, leuB6, proA2, thy-1, lacY1, supE44, ara14, galK2, xyl5, rps120, recA13</i>                               | Boyer y Roullan-Dussoix (1969)   |
| DH5 $\alpha$      | F-, <i>hsdR17, thi-1, gyrA, <math>\Delta</math>(lacZYA-argF), supE44, recA1, (f80d<math>\Delta</math>lacZM15), relA</i> | Hanahan (1983)                   |
| S17-1             | <i>thi-1, proA2, recA, hsdR, hsdM</i> RP4, 2-Tc::Mu-Km::Tn  | Simon <i>et al.</i> (1983)       |
| W3110             | Silvestre   | Dra. Carmen Gómez                |
| CON1              | W3110, <i>cya</i> $\Delta$ Km.  | Este trabajo                     |
| <i>R. etli</i>    |   |                                  |
| CE3               | Silvestre CFN42, Sm <sup>r</sup>  | Noel <i>et al.</i> (1984)        |
| CON11             | CE3, <i>cyaA-lacZ</i> (sentido)   | Este trabajo                     |
| CON12             | CE3, <i>cyaA-lacZ</i> (contrasentido)   | Este trabajo                     |
| CON13             | CE3, <i>cyaA</i> $\Omega$ Tc  | Este trabajo                     |
| CON21             | CE3, <i>cyaB-lacZ</i> (sentido)   | Este trabajo                     |
| CON22             | CE3, <i>cyaB-lacZ</i> (contrasentido)   | Este trabajo                     |
| CON23             | CE3, <i>cyaA</i> $\Omega$ Km  | Este trabajo                     |
| CON43             | CE3, <i>cyaA</i> $\Omega$ Tc, <i>cyaB</i> $\Omega$ Km   | Este trabajo                     |
| Plásmidos         |   |                                  |
| pBluescriptIIISK  | Replicón ColEI, Ap <sup>r</sup>   | Stratagene                       |
| pWS233            | Replicón mobilizable ColEI, Gm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> , <i>sacRB</i>  | Selbitschka <i>et al.</i> (1993) |
| pKOK6             | Donador del cassette <i>lacZ</i> -Km <sup>r</sup>   | Kokotek <i>et al.</i> (1989)     |
| pBLS193           | Donador del $\Omega$ Tc   | Alexeyev <i>et al.</i> (1995)    |
| pBLS128           | Donador del $\Omega$ Km   | Alexeyev <i>et al.</i> (1995)    |
| PRKACEc           | pRK415 /frag. <i>EcoRI</i> de 2.8 kb, codifica a <i>cya</i> de <i>E. coli</i>   | Este trabajo                     |
| pEVSm             | pSK/frag. <i>EcoRV/SmaI</i> de 2.3 kb, codifica a <i>cyaA</i> de <i>R. etli</i>   | Este trabajo                     |
| pWSEVSmTc         | pWS233/frag. del pEVSm, pero <i>cyaA</i> $\Omega$ Tc  | Este trabajo                     |
| pWSEVSmLacZs      | pWS233/frag. del pEVSm, pero <i>cyaA-lacZ</i> (sentido)   | Este trabajo                     |
| pWSEVSmLacZc      | pWS233/frag. del pEVSm, pero <i>cyaA-lacZ</i> (contrasentido)   | Este trabajo                     |
| pE2               | pSK/frag. <i>EcoRI</i> de 2 kb, codifica a <i>cyaB</i> de <i>R. etli</i>  | Este trabajo                     |
| pWSE2Km           | pWS233/frag. del pEVSm, pero <i>cyaB</i> $\Omega$ Km  | Este trabajo                     |
| pWSE2LacZs        | pWS233/frag. del pEVSm, pero <i>cyaB-lacZ</i> (sentido)   | Este trabajo                     |
| pWSE2LacZc        | pWS233/frag. del pEVSm, pero <i>cyaB-lacZ</i> (contrasentido)   | Este trabajo                     |

**Manuscrito del artículo:**

**“The *Rhizobium etli* *cyaC* Product: Characterization of a Novel  
Adenylate Cyclase Class”**

## The *Rhizobium etli* *cyaC* Product: Characterization of a Novel Adenylyate Cyclase Class

Juan Téllez-Sosa,<sup>1</sup> Nora Soberón,<sup>1</sup> Alicia Vega-Segura,<sup>2</sup> María E. Torres-Márquez,<sup>2</sup> and Miguel A. Cevallos<sup>1\*</sup>

Programa de Evolución Molecular, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, C.P. 62210, Cuernavaca, Morelos,<sup>1</sup> and Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, C.P. 04510, Distrito Federal,<sup>2</sup> México

Received 18 December 2001/Accepted 7 April 2002

Adenylyate cyclases (ACs) catalyze the formation of 3',5'-cyclic AMP (cAMP) from ATP. A novel AC-encoding gene, *cyaC*, was isolated from *Rhizobium etli* by phenotypic complementation of an *Escherichia coli* *cya* mutant. The functionality of the *cyaC* gene was corroborated by its ability to restore cAMP accumulation in an *E. coli* *cya* mutant. Further, overexpression of a *malE::cyaC* fusion protein allowed the detection of significant AC activity levels in cell extracts of an *E. coli* *cya* mutant. *CyaC* is unrelated to any known AC or to any other protein exhibiting a currently known function. Thus, *CyaC* represents the first member of a novel class of ACs (class VI). Hypothetical genes of unknown function similar to *cyaC* have been identified in the genomes of the related bacterial species *Mesorhizobium loti*, *Sinorhizobium meliloti*, and *Agrobacterium tumefaciens*. The *cyaC* gene is cotranscribed with a gene similar to *ohr* of *Xanthomonas campestris* and is expressed only in the presence of organic hydroperoxides. The physiological performance of an *R. etli* *cyaC* mutant was indistinguishable from that of the wild-type parent strain both under free-living conditions and during symbiosis.

Cyclic AMP (cAMP) is widely distributed in prokaryotic and eukaryotic organisms and plays a central role in the regulation of diverse cellular functions. In eukaryotic cells, increased levels of cAMP regulate enzyme activities, channel activities, and gene expression, mainly via cAMP-dependent protein kinases (22). In some prokaryotes, such as *Escherichia coli* and other enterobacteria, cAMP regulates gene expression when bound to its receptor protein (CRP) (for a review, see reference 27). In other bacteria, however, the mechanism through which cAMP acts remains unclear.

Adenylyate cyclases (ACs) are the enzymes responsible for the synthesis of cAMP from ATP and have been classified into five classes according to their evolutionary relationships. Class I embraces the ACs of enterobacteria, the enzyme from *E. coli* being the best-known member of this class. Class II includes the calmodulin-activated toxins from *Bacillus anthracis* and *Bordetella pertussis*. Class III (the universal class) contains ACs or guanylate cyclases (GCs) from eukaryotic and prokaryotic organisms, and class IV encompasses AC2 of *Aeromonas hydrophila* encoded by the *cyaB* gene, which has close sequence similarities to proteins of hyperthermophilic archaeobacteria (13, 46). The recently identified class V is comprised of one AC from the strict anaerobic bacterium *Prevotella ruminicola* (11). All five classes of enzymes are present in bacteria, while in eukaryotes, only enzymes belonging to class III have been described. Recently, the crystal structures of the catalytic domains of mammalian class III ACs have been solved (50, 60). Based on these structures, on modeling studies, and on other

mutational analyses, essential residues required for substrate binding (ATP) and catalysis have been identified (32, 51).

In rhizobia, cyclic nucleotides such as cAMP and cyclic GMP (cGMP) have been implicated in some metabolic functions. In *Bradyrhizobium japonicum*, it has been suggested that cAMP participates in regulating ammonia assimilation, since the addition of this compound to cultures decreased the specific activities of glutamate synthase and glutamine synthetase (54). In the same organism, malate and other tricarboxylic acid cycle intermediates repressed hydrogen uptake and glutamate utilization when glutamate is utilized as the sole source of carbon and nitrogen. The addition of exogenous cAMP alleviates this inhibition (30). In *B. japonicum*, growth and ex planta nitrogenase activity were inhibited when 100  $\mu$ M cGMP was added to the culture media (23, 31). In *Sinorhizobium meliloti*, an apparent catabolite repression-like phenomenon has been described in which the addition of succinate (the preferred carbon source) causes the immediate repression of  $\beta$ -galactosidase activity in cells growing in lactose. Unexpectedly, cAMP is not involved in this repression (53).

The elucidation of the physiological role of cAMP and cGMP in *Rhizobium* has been difficult, since multiple ACs have been identified: two in *B. japonicum* (10, 19) and three in *S. meliloti* (5, 6, 44). However, analysis of the recently sequenced genomes of *S. meliloti* and *Mesorhizobium loti* has shown that these organisms contain genes coding for 26 and 12 different ACs/GCs, respectively. All of these predicted proteins present catalytic domains similar to those found in class III enzymes (18, 24).

With the aim of reaching a deeper insight into the role of cAMP in *Rhizobium*, we have isolated several AC (*cya*) genes from *Rhizobium etli* by functional complementation of an *E. coli* *cya* mutant strain with a genomic library. In this study, we present the isolation, sequencing, functional characterization,

\* Corresponding author. Mailing address: Programa de Evolución Molecular, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, A. P. 565-A, C. P. 62210, Cuernavaca, Morelos, México. Phone: 52(777)3114663. Fax: 52(777)3175581. E-mail: mac@cifn.unam.mx.

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

| Strain or plasmid       | Genotype  | Source or reference |
|-------------------------|---|---------------------|
| <b>Strains</b>          |   |                     |
| <i>Escherichia coli</i> |   |                     |
| W3110                   | Wild type   | C. Gómez            |
| CON1                    | W3110, $\Delta(\text{cya-1400})::\text{Km}$   | This work           |
| SPR50                   | <i>relA1 spoT</i> $\Delta(\text{cya-1400})::\text{Km}$ <i>thi-1 e14<sup>-</sup> <math>\lambda</math><sup>-</sup></i>                        | 43                  |
| H1B101                  | F <sup>-</sup> <i>hsdS20 leuB6 proA2 thi-1 lacY1 supE44 ara14 galK2 xyl5</i><br><i>rps120 recA13</i>  | 8                   |
| DH5 $\alpha$            | F <sup>-</sup> <i>hsdR17 thi-1 gyrA</i> $\Delta(\text{lacZYA-argF})$ <i>supE44 recA1</i><br>( $\phi$ 80 $\Delta$ lacZM15) <i>relA</i>       | 21                  |
| S17-1                   | <i>thi-1 proA2 recA hsdR hsdM</i> RP4.2-Tc::Mu-Km::Tn7  | 45                  |
| <i>Rhizobium etli</i>   |   |                     |
| CE3                     | Wild-type Sm <sup>r</sup> derivative of CFN42   | 37                  |
| CON31                   | CE3 <i>cyaC::lacZ</i>   | This work           |
| CON32                   | CE3 <i>cyaC::lacZ</i>   | This work           |
| CON40                   | CE3 <i>ohr</i> $\Omega$ Km  | This work           |
| <b>Plasmids</b>         |   |                     |
| pLAFR1                  | Broad-host-range <i>IncP2</i> , cosmid, Tc <sup>r</sup>   | 17                  |
| pRK2073                 | Helper plasmid, Sp <sup>r</sup>   | 15                  |
| pRK415                  | Broad-host-range <i>IncP</i> cloning vector, Tc <sup>r</sup>  | 25                  |
| pBluescriptHSK+         | ColEI replicon, cloning vector, Ap <sup>r</sup>   | Stratagene          |
| pWS233                  | Mobilizable replicon ColEI1, Gm <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> <i>sacRB</i>   | 42                  |
| pKK233-3                | ColEI replicon, expression vector, Ap <sup>r</sup>  | Stratagene          |
| pMAL-c2X                | ColEI replicon, expression vector, Ap <sup>r</sup>  | New England Biolabs |
| pKOK6                   | <i>lacZ</i> -Km <sup>r</sup> interposon in pKOK4, Km <sup>r</sup> Cb <sup>r</sup>   | 26                  |
| pBLS128                 | $\Omega$ Km donor   | 1                   |
| pRKOhr                  | pRK415 derivative containing PCR product with <i>ohr</i> gene and its upstream region   | This work           |
| p3310                   | pBluescriptHSK+ derivative carrying 2.9-kb <i>Sall</i> fragment containing the <i>R. etli cyaC</i> gene                                     | This work           |
| p3310m                  | pBluescriptHSK+ derivative carrying 2.9-kb <i>Sall</i> fragment containing <i>R. etli cyaC</i> gene, but with single base mutation (G2316C) | This work           |
| p3310CyaCKm             | p3310 derivative, but with <i>R. etli cyaC</i> gene interrupted by a $\Omega$ Km  | This work           |
| p3310OhrKm              | p3310 derivative, but with <i>R. etli ohr</i> gene interrupted by $\Omega$ Km   | This work           |
| pKKCyaC                 | pKK233-3 derivative containing PCR product with <i>R. etli cyaC</i> gene  | This work           |
| pMALCyaC                | pMAL-c2X derivative containing PCR product with <i>R. etli cyaC</i> gene fused to <i>E. coli malE</i> gene                                  | This work           |
| pRKACEc                 | pRK415 derivative carrying 2.8-kb <i>EcoRI</i> fragment containing <i>E. coli</i> W3110 <i>cya</i> gene                                     | This work           |
| pWSACEcKm               | pWS233 derivative carrying genomic fragment of 8 kb from SPR50 strain with $\Delta(\text{cya-1400})::\text{Km}$                             | This work           |
| pWSYcACLacI             | pWS233 derivative carrying same insert as p3310m, but with <i>cyaC</i> gene fused to <i>lacZ</i> in direct orientation                      | This work           |
| pWSYcACLac2             | pWS233 derivative carrying same insert as p3310m, but with <i>cyaC</i> gene fused to <i>lacZ</i> in inverse orientation                     | This work           |

and expression analysis of the *cyaC* gene of *R. etli* CE3. The deduced protein product of *cyaC* gene does not contain canonical motifs or signatures resembling those of any other ACs reported, indicating that it defines a new class of ACs, class VI.

#### MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains, plasmids, and media.** The plasmids and strains used in this study are described in Table 1. *E. coli* strains were grown at 37°C in Luria-Bertani, MacConkey's, or M9 minimal medium with different sugars (fructose, maltose, galactose, or arabinose at 1%). *Rhizobium* strains were grown at 30°C in PY (37) or minimal medium (MM) (16) containing 10 mM NH<sub>4</sub>Cl as a nitrogen source and the sole carbon source at a concentration of 10 mM. Batch cultures of *R. etli* cells were grown according to the method of Encarnación and coworkers

(16). Culture growth was estimated as the total protein content by using the Lowry method (33). Swarming soft-agar plates for *E. coli* contained 1% yeast extract, 0.8% NaCl, and 0.3% agar. Swarming soft-agar plates for *R. etli* contained MM plus 0.005% yeast extract, 0.028% agar, and 10 mM succinate as the carbon source. When required, antibiotics were added in the following final concentrations: tetracycline, 10  $\mu$ g/ml; carbenicillin, 100  $\mu$ g/ml; kanamycin, 30  $\mu$ g/ml; gentamicin, 30  $\mu$ g/ml; fosfomycin, 25  $\mu$ g/ml; spectinomycin, 100  $\mu$ g/ml; streptomycin, 100  $\mu$ g/ml.

DNA manipulations. Standard DNA manipulations were carried out as described previously (41). Restriction enzymes, T4 DNA ligase, and Taq DNA polymerase were purchased from Amersham-Pharmacia Biotech. All enzymes were used according to the supplier's recommendations. Cosmids were introduced into *E. coli* by electroporation as reported by Kubicka and Kramarcik (28).

Construction of an *E. coli* W3110 *cya* mutant. In the *E. coli* SPR50 strain, most of the *cya* coding sequence has been replaced by a kanamycin resistance inter-

poson ( $\Delta$ cyu-1400::Km) (43). To create the *E. coli* W3110 *in situ* mutant, the genomic DNA of SP850 was digested with *EcoRI*, and a mutation ( $\Delta$ cyu-1400::Km) was subcloned into the conditionally lethal plasmid pWS233 (42), exploiting the kanamycin resistance. The resulting plasmid, pWSACE::Km, which harbors a genomic fragment of 8 kb, was transformed into *E. coli* strain W3110, and one-step double recombinants were selected by the method described by Selbitshka and coworkers (42). The *cyu* mutants were selected as golden colonies able to grow in MacConkey medium plates supplemented with lactose as the carbon source. The genotype of the resultant strain, CON1, was verified by PCR and Southern analyses. Strain CON1 showed the expected phenotype for a *cyu* mutant (data not shown).

The *cyu* gene of *E. coli* strain W3110 was isolated by PCR amplification with specific primers derived from the published *E. coli* *cyu* nucleotide sequence (GenBank accession no. K02969) (5'-GTCAATTATCATCGTGGT-3' and 5'-A GTTCCCGCTAAGATT-3'). The amplification product of 2,957 bp, harboring the whole *cyu* gene and its promoter region, was cloned into the medium-copy-number plasmid pRK415 (15) to generate plasmid pRKACE.

Complementation analyses. Individual clones from *R. eli* strain CE3 genomic library cloned in pLARRY1 were conjugally mated into *E. coli* *cyu* strain SP850 with plasmid pRK0203 as a helper. A mixture of overnight cultures of *E. coli* SP850 and H1101(pRK0203) strains (50  $\mu$ l each) was spread onto Luria-Bertani agar plates. Approximately 1,200 clones from the library were then individually streaked onto these plates and incubated overnight at 37°C. The mated clones were subsequently replicated onto selective agar plates (M9 plus lactose as carbon source) and incubated at 37°C until colony development. Positive transconjugants were retested in the *E. coli* *cyu* mutant strain CON1.

DNA sequencing and bioinformatics. Double-stranded templates were sequenced manually by the dideoxy method with the Thermoquest kit from Amersham-Pharmacia Biotech. Sequencing reaction mixtures were electrophoresed in 6% polyacrylamide-8 M urea gels in a Bio-Rad Sequi-gene sequencing apparatus. Routine sequence analysis was accomplished with the Genetics Computer Group suite (version 8) and the GeneWorks suite (release 2.5; IntelliGenetics). Nucleotide and deduced amino acid sequences were compared to those deposited in the Genbank nonredundant database by using the Blast 2.1 algorithm at the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (4) The assessment of transmembrane regions in the predicted *CyaC* protein was carried out with the programs PSORT (36) (<http://psort.nibb.ac.jp/>), TMHMM (47) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-1.0/>), HMMTOP (52) (<http://www.ezlab.uhmnj.org/>), DAS (12) (<http://www.biokemi.us.se/~server/DAS/>), and TopPred (56) (<http://www.biokemi.us.se/~server/toppred/toppredServer.cgi>).

Localization of the *cyu* gene. Genomic DNA from *R. eli* strains cured of each one of the endogenous megaplasmids was digested with the appropriate restriction enzymes, electrophoresed in 1% agarose, blotted onto nitrocellulose, and hybridized against a *cyu*C internal probe with the Rediprime kit and Rapid-hyb buffer from Amersham-Pharmacia Biotech. *R. eli* plasmid probes were obtained by the in-gel lysis method of Wheeler and coworkers (57), blotted onto nitrocellulose, and hybridized as described above.

cAMP determination and estimation of cAMP activity. The cAMP content in cell extracts was determined by using the cyclic AMP <sup>3</sup>H Assay System kit from Amersham-Pharmacia Biotech (48). To determine the cAMP content in *E. coli*, cells were grown in M9 MM supplemented with 1% lactose and 0.1% Casamino Acids. To determine the cAMP content in *R. eli*, cells were grown in MM supplemented with succinate. In both cases, 10-ml samples from exponentially growing cultures were boiled for 10 min. Extracts were then centrifuged to remove cell debris and lyophilized. Dried residues were resuspended in 0.5 ml of assay buffer and assayed for cAMP according to the supplier's protocol.

The AC activity of *CyaC* was measured in cell extracts of the *E. coli* CON1 strain overexpressing MBP-*CyaC*, a fusion protein formed by the maltose binding protein and *CyaC*. The *CyaC* coding sequence was amplified by PCR with the oligonucleotides 5'-GGAATTCATGAGCAACAGCCAG-3' and 5'-GGAAGC TTGATCCAGCGCGCGTGGCG-3', which contain the restriction sites *EcoRI* and *HindIII*, respectively. The PCR product was digested and then cloned into the pMAL-c2X expression vector (New England Biolabs), yielding the plasmid pMAL-*CyaC*, which contained the intact *cyu*C gene fused to *malE*, thus encoding the MBP-*CyaC* fusion protein. CON1 cells harboring pMAL-c2X or pMAL-*CyaC* were grown in 100 ml of LB medium supplemented with 0.2% glucose or to an optical density at 600 nm ( $OD_{600}$ ) of 0.5, and then 0.5 mM isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranoside (IPTG) was added to the medium. After 2 h, the bacterial cells were harvested by centrifugation and washed with 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer containing 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, and 1 mM dithiothreitol and disrupted by sonication in 10 ml of the same buffer. The cell extract was centrifuged for 20 min at 14,000 rpm with a F1630 rotor in a

Beckman GS-1R centrifuge (Beckman Instruments), and the supernatant was kept frozen for further AC assay.

AC was estimated by the two-column method described by Salomon and coworkers (40) by incubating aliquots of 50  $\mu$ g of protein for 30 min at 37°C. For the optimum pI1 determination, combinations of buffers containing either 40 mM Tris, 20 mM morpholinethanesulfonic acid (MES), or 20 mM morpholinopropanesulfonic acid (MOPS) were adjusted to the desired pH and used during the incubation.

Construction of *cyu*:*lacZ* transcriptional fusions. A promoterless *lacZ*-Km interposon (26) was inserted in both orientations into the coding regions of the mutant *R. eli* *cyu*C gene harbored in plasmid p3310. Because this plasmid lacked a suitable single restriction site for the insertion of the interposon, a *PvuII* site was introduced by oligonucleotide-driven mutagenesis near the termination codon of *cyu*C according to the method of Ali and Steinkasserer (2). In the oligonucleotides used (5'-GGTTCCTCGCAGTTCGGG-3' and 5'-CCGAACTC CAGGCAACC-3'), the Ser 250 TCC codon was replaced with a *Cys* TGC codon. The resulting gene was sequenced to ensure that only the desired change had been introduced. Finally, the *lacZ*-Km interposon was inserted in this site in both orientations. These constructions were then subcloned into the mobilizable suicide vector pWS233. The resulting plasmids (pWS*CyaC*1 and pWS*CyaC*2) were conjugally transferred from the broad-host-range-mobilizing *E. coli* strain 517-1 (45) into *R. eli*. Double recombinant derivatives were obtained as described by Selbitshka and coworkers (42). The correct genotype of the resultant mutant strains was verified by Southern analysis.

Estimation of  $\beta$ -galactosidase activity. The  $\beta$ -galactosidase activity from samples (1 ml) of bacterial cultures was estimated as previously recommended (55). Specific activities are reported as nanomoles of *O*-nitrophenol produced per minute per microgram of culture protein. Activity values are the mean of three independent samples.

Expression of the *cyu*:*ClacZ* fusions in the presence of cumene hydroperoxide. The MIC of cumene hydroperoxide was determined by evaluating the growth of the wild-type CE3 strain at concentrations of this compound ranging from 50 to 600  $\mu$ M. An inhibitory effect was observed when cumene hydroperoxide concentrations above 300  $\mu$ M were used (data not shown). Cultures of *R. eli* strains growing exponentially in MM succinate plus ammonium chloride (150 ml) were challenged with 300  $\mu$ M cumene hydroperoxide (50%). Samples of the cultures (1 ml) were taken at different times after the challenge, their  $\beta$ -galactosidase activity and protein content were estimated as previously described, and protein content was estimated as previously described.

Nodulation and nitrogen fixation assays. Sterile *Phaseolus vulgaris* cv Negro Jamapa seedlings inoculated with the *R. eli* strain were grown in pots with vermiculite-Fraunhaus medium, free of combined nitrogen. *R. eli* strains used as inocula were grown for 18 h in PY medium, washed twice with 100 mM MgSO<sub>4</sub> and diluted to an  $OD_{540}$  of 0.05. Groups of four plants were examined to determine nitrogenase activity by the acetylene reduction method at 24 days after inoculation (9).

Nucleotide sequence accession number. The nucleotide sequence of the plasmid p3310 insert was determined and deposited in GenBank under accession no. AF299113.

## RESULTS

Isolation of the *R. eli* *cyu* genes. To isolate the *cyu* genes of *R. eli*, a cosmid library was introduced by conjugation in to an *E. coli* SP850 strain ( $\Delta$ cyu-1400::Km) (43). Four transconjugant colonies were selected based on their ability to grow on M9-lactose agar plates (*cyu*<sup>+</sup> phenotype). To confirm the *cyu*<sup>+</sup> phenotype conferred by the cosmids, they were isolated and introduced into another *E. coli* *cyu* mutant strain, CON1. Transformants were tested for three unrelated cAMP-dependent traits: growth on MacConkey plates supplemented with different sugars, motility in swarm plates, and sensitivity to fosfomicin and serine (3, 14). All four cosmids were able to rescue the *cyu* phenotype of the *E. coli* CON1 strain (data not shown), indicating that all of them encode at least one protein with AC activity. Restriction analyses confirmed that all cosmids were different (data not shown). In this communication, we present the characterization of one of them, which we named e934.

To localize the *cyu* gene encoded in clone c934, pure cosmid was fragmented with different endonucleases, and all fragments were individually cloned into the pBlueScriptIIISK+ vector. Recombinant plasmids were transformed into the *E. coli* CON1 *cyu* strain and spread onto MacConkey-lactose agar plates. Several red clones were selected, and one of them, p3310, which harbored the smallest insert (a 2.8-kb *Sall* fragment), was selected for further analysis. Moreover, the complemented strain with p3310 was able to produce up to 40% of the cAMP level detected in the W3110 wild-type strain, demonstrating that this plasmid encodes a *cyu* gene (Table 1). No cGMP accumulation could be detected in the complemented strain (data not shown). Hybridization experiments indicated that this gene is maintained as a single copy in the chromosome.

ORFC encodes an AC gene. Figure 1A shows a scheme of the three (ORFs) identified within the nucleotide sequence of the plasmid p3310 insert fragment: two of them are on the same DNA strand (ORFB and ORFC), while the third one was encoded in the opposite strand (ORFA). ORFA, which lays truncated at the 5' end of the p3310 insert, encodes a polypeptide that shows weak similarity to proteins having methyltransferase activity. ORFB encodes a protein of 131 amino acid residues. The ORF was named *ohr*, given its significant similarity to the gene coding for the organic hydroperoxide resistance *Ohr* protein of *Xanthomonas campestris* (34). Similarity searches with the predicted product of ORFC against translated GenBank sequences revealed a high similarity to hypothetical genes that code for proteins of unknown function in the recently published genome sequences of the related bacteria *M. loti*, *S. meliloti*, and *Agrobacterium tumefaciens*. None of the three ORFs identified in p3310 showed similarity to any known AC.

To identify which of the ORFs in plasmid p3310 encodes an AC, an  $\Omega$ Km cassette was inserted within ORFB (*ohr*) or within ORFC; no insertion into ORFA was performed, since it was naturally inactivated by truncation. Both insertions prevented the complementation of the *E. coli* CON1 strain by p3310, suggesting both ORFs are organized in a single transcriptional unit. A plasmid containing only *ohr* and its upstream region (pRK $\Omega$ hr) was unable to complement the *E. coli* *cyu* phenotype, indicating that ORFC is the gene responsible for the complementation.

To further demonstrate that ORFC encodes an AC, a PCR product containing the coding region of ORFC downstream from a consensus *E. coli* ribosomal binding sequence was cloned into the expression vector pKK223-3 under the control of the *P<sub>tac</sub>* promoter, yielding plasmid pKK $\Omega$ CyAC. This plasmid was able to complement the *E. coli* CON1 strain under both induced and noninduced conditions. This result indicates that ORFC encodes an AC and that the background expression level under noninduced conditions suffices to rescue the genetic defect of the *E. coli* CON1 strain. Accordingly, ORFC was designated *cyu*C.

The *Cyu*C homologs were identified in the chromosome of *M. loti* (24), in the circular chromosome of *A. tumefaciens* (58), and in the *S. meliloti* symbiotic plasmid B (18). These sequences were highly similar to that of *Cyu*C, as can be seen in Fig. 1B (42 to 45% identity). Conservation is especially evident over discrete regions, one of them being the sequence

GEIDFGLHROS (positions 288 to 298 in *Cyu*C), which is almost identical to the ATP binding motif previously proposed by Peterkofsky and coworkers (39), suggesting that this region could be involved in ATP binding. None of five different computational prediction methods that were used to assess the existence of transmembrane elements in *Cyu*C reported significant results, which suggests *Cyu*C is cytoplasmic.

Catalytic properties of *Cyu*C. To investigate the biochemical properties of *Cyu*C, we overexpressed an MBP-*Cyu*C fusion protein in the *E. coli* CON1 *cyu* strain, and the AC activity was estimated in cell extracts (as described in Materials and Methods). Extract samples were electrophoresed on a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gel (8% polyacrylamide) and stained with Coomassie blue, and an induced band at the position corresponding to the predicted molecular weight of the MBP-*Cyu*C fusion protein was visible (data not shown). No AC activity was detected in cell extracts from *E. coli* CON1 harboring the pMAL-c2X vector. The optimal pH for *Cyu*C activity was 9.5. The initial velocity of cAMP production by MBP-*Cyu*C was dependent on  $Mg$ -ATP concentration (data not shown), with an affinity ( $K_m$ ) of  $0.97 \pm 0.08$  mM and a maximal specific rate of  $3.2 \pm 0.14$  nmol  $min^{-1}$  ng of protein $^{-1}$ . GTP was found to be a competitive inhibitor for the ATP binding site. These data substantiate the identity of *Cyu*C as an authentic AC.

Transcriptional analysis of *cyu*C. To determine the expression profile of *cyu*C, transcriptional fusions of this gene with *lacZ* were constructed and integrated into the *R. etli* CE3 chromosome by homologous marker exchange, as described in Materials and Methods, producing strain CON31 (*cyu*C:*lacZ*) and the control strain CON32, which harbors the fusion in inverse orientation. The  $\beta$ -galactosidase activities of strains CON31 and CON32 were estimated in MM supplemented with lactose, maltose, galactose, sucrose, glucose, pyruvate, succinate, acetate, or glutamine as the sole carbon source. The  $\beta$ -galactosidase activities of fusion strains CON31 and CON32 were low and indistinguishable from the endogenous activity of the wild-type strain, CE3, under all conditions tested. To further explore other conditions that might result in *cyu*C induction, strains CE3 and CON31 were cultured in MM supplemented with succinate and subjected to diverse stress conditions, such as heat shock (42°C for 2 min), osmotic shock (300 mM NaCl), or oxidative insult (200  $\mu$ M hydrogen peroxide). The biomass yields and growth rates of both strains were similar in all treatments. The  $\beta$ -galactosidase activities of both strains were estimated at different times after exposure to stress conditions; no differences between the activities of cultures with treatment and those without treatment were found (data not shown).

We suggested above that *cyu*C forms an operon with *ohr*, the product of which has been shown to confer resistance to organic hydroperoxides in *X. campestris* (34). Furthermore, the expression of the *X. campestris* *ohr* gene is induced in the presence of organic hydroperoxides (34). In order to evaluate the expression profile of the *R. etli* *ohr*-*cyu*C operon, the  $\beta$ -galactosidase activities of mid-exponential cultures of the wild-type CE3 and the CON31 (*cyu*C:*lacZ*) strains were determined in the presence of 300  $\mu$ M cumene hydroperoxide (Fig. 2). As expected, the  $\beta$ -galactosidase activity was induced in the CON31 strain culture, but not in the wild type. The response of

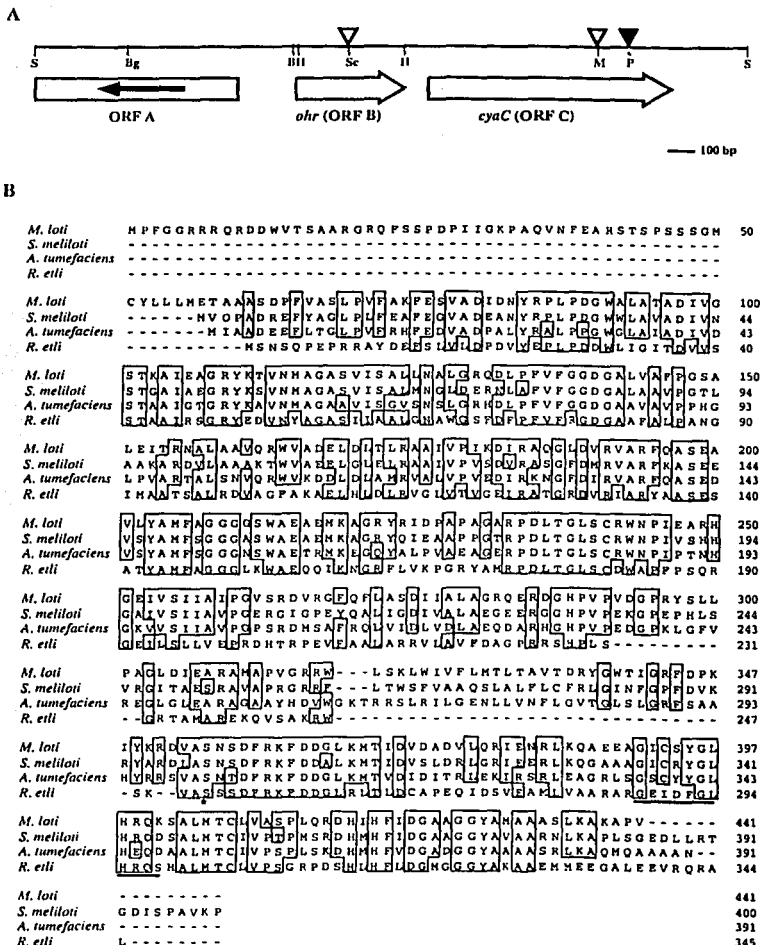


FIG. 1. (A) Physical and genetic map of the insert in p3310. Open arrows indicate the positions of complete ORFs. The position of the incomplete ORF is indicated by an open rectangle, and the arrow located within indicates the direction of transcription. Open triangles indicate the positions at which *fl* interposons were inserted. A black triangle indicates the position at which *lacZ*-Km cassettes were inserted. A small gray black triangle marked with letter P indicates the position where *PstI* was generated. (B) Protein sequence alignment of the *R. etli* CyaC and the three homologous proteins found in the databases: *M. loli*, protein identification no. BA850193.1; *S. meliloti*, protein identification no. CAC49159.1; *A. tumefaciens*, protein identification no. AA488018.1; and *R. etli*, accession no. AF299113. Amino acid residues identical in at least three of the sequences are shown in open boxes, and conservative substitutions are shaded in gray. The asterisk indicates the position of a serine in CyaC, which was changed to cysteine by site-specific mutagenesis. The amino acid residues that potentially confirm an ATP binding site, as described by Peterkofsky and coworkers (35), are underlined.



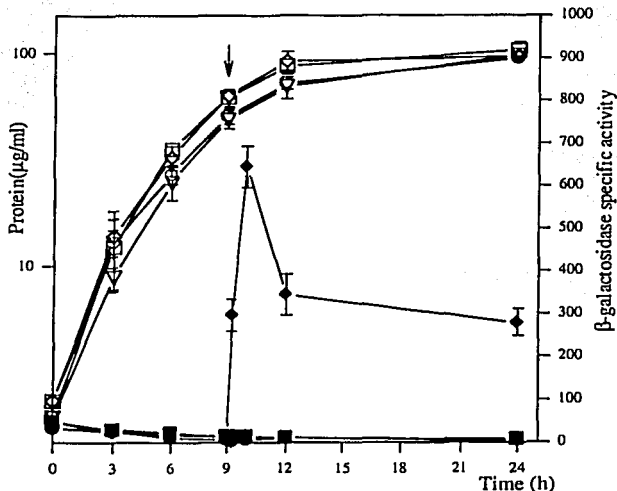


FIG. 2. Induction of the *cyaC-lacZ* fusion in the presence of 300  $\mu$ M cumene hydroperoxide (CHP). Open symbols represent protein yields as a measure of growth:  $\square$ , CE3;  $\circ$ , CE3 with CHP;  $\nabla$ , CON31;  $\diamond$ , CON31 with CHP. Solid symbols represent specific  $\beta$ -galactosidase activities (nanomoles per minute per milligram of protein):  $\blacksquare$ , CE3;  $\bullet$ , CE3 with CHP;  $\blacktriangledown$ , CON31;  $\blacklozenge$ , CON31 with CHP. The arrow marks the addition of CHP.

the *cyaC-lacZ* fusion to cumene hydroperoxide was very fast; 10 min after exposure, the  $\beta$ -galactosidase activity increased 5-fold and within 1 h had risen up to 10-fold. There was no significant difference between the growth rates of the cumene hydroperoxide-treated and control cultures.

Taken together, these data suggest that while *cyaC* is induced by cumene hydroperoxide, it does not seem to participate in the resistance phenotype against this compound. To assess the physiological role of Ohr-CyaC in *R. etli*, we evaluated the effect of different cumene hydroperoxide concentrations upon the growth rates of the wild-type CE3, CON31, and CON40, an *ohr*  $\Delta$ Km mutant strain. No differences were found among the biomass yields and growth rates of all three strains when subjected to the same treatment (data not shown). Exposure to organic hydroperoxides during the *R. etli* life cycle might be limited, with the exception of nodule establishment, when the bacteria get contact with plant roots, which excrete hydrogen peroxide and organic hydroperoxides as a defense strategy against pathogens (7). The effect of bean plant root exudates upon *ohr-cyaC* operon expression was evaluated. Unexpectedly, no difference was found between the  $\beta$ -galactosidase activities of strain CON31 whether in the presence or absence of bean root exudates (data not shown).

Physiological role of *R. etli* CyaC. To assess the physiological role of CyaC in free-living *R. etli* cells, several approaches were undertaken. In the first place, the requirement of CyaC for the

utilization of glycolytic (maltose, glucose, lactose, galactose, and sucrose) or nonglycolytic (pyruvate, succinate, acetate, and glutamine) carbon sources was evaluated. Strain CON31 grew in all of these carbon sources at the same rate as the wild-type strain, suggesting CyaC is dispensable for carbon source utilization, in contrast to *E. coli*, in which Cya is necessary for the utilization of carbon sources other than the preferred source, glucose (38; data not shown). In *E. coli*, Cya is also required for motility; however, when strain CON31 was tested in swarm plates, no differences were observed in comparison to the wild-type strain.

To assess if the symbiotic abilities of the *cyaC* mutant were affected, bean plant seedlings were inoculated with strain CON31 or the wild-type strain. After 24 days, nodule morphology and nitrogen-fixing activity were evaluated. No significant differences were found between the nodules induced by the mutant strains and those elicited by the wild-type strain nor between the nitrogenase activities of root systems inoculated with either strain (data not shown).

Succinate is the preferred carbon source for rhizobia and exerts catabolic repression over other carbon sources, including glucose (36). In the wild-type *R. etli* strain CE3, cAMP accumulation is similar, whether grown with succinate or glucose as the carbon source, suggesting cAMP levels are not involved in catabolic repression, in contrast to *E. coli*, in which cAMP levels mediate the catabolic repression of glucose (the

TABLE 2. cAMP levels in different strains of *E. coli* and *R. etli*

| Strain*                     | Carbon source | cAMP levels<br>(pmol/mg of protein) |
|-----------------------------|---------------|-------------------------------------|
| <i>E. coli</i>              |               |                                     |
| W3110 (wild type)           | Lactose       | 318.18 ± 32.3                       |
| CON1 ( <i>cyuC</i> mutant)  | Lactose       | ND <sup>b</sup>                     |
| CON1(pRKACEc)               | Lactose       | 650.25 ± 42.8                       |
| CON1(p3310)                 | Lactose       | 125.91 ± 13.1                       |
| <i>R. etli</i>              |               |                                     |
| CE3 (wild type)             | Succinate     | 17.63 ± 1.9                         |
|                             | Glucose       | 22.14 ± 1.7                         |
| CON31 ( <i>cyuC</i> mutant) | Succinate     | 17.15 ± 2.2                         |
|                             | Glucose       | 19.99 ± 1.5                         |

\* *E. coli* strains were grown in mm M9 supplemented with 1% lactose and 0.1% Casamino Acids. *R. etli* strains were grown in mm supplemented with succinate or glucose as carbon sources. The cAMP content was determined from samples of exponential growing cultures. Each value is the average of three independent experiments.

<sup>b</sup> ND, not detected.

preferred carbon source) over other carbon sources (Table 2). To estimate the role of CyaC on cAMP accumulation, strain CON31 was grown on MM supplemented either with succinate or glucose as the carbon source, and the cAMP content was determined. No differences were found between both carbon sources or between strain CON31 and the wild-type cAMP values, suggesting that CyaC is not required for cAMP synthesis under the conditions tested (Table 2).

## DISCUSSION

ACs make up a large and complex family of proteins that can be classified into five classes according to their evolutionary relationships (11, 13, 46). Representatives of all five classes have been identified in bacteria. In this work, we present the isolation and characterization of a new class of AC, class VI, encoded by *cyuC* of *R. etli*. The *cyuC* gene was isolated by functional complementation of an *E. coli cyuC* mutant strain with a cosmid library of *R. etli* CE3. Several cosmids were isolated by this method: one of them encodes three ORFs. ORFA, which lays truncated at the 5' end of the p3310 insert, encodes a polypeptide that shows weak similarity to proteins having methyltransferase activity. The other two ORFs are located in the same strand. The upstream ORF, named ORFB, encodes a protein that is 36% identical to Ohr of *X. campestris*, which is involved in the resistance to organic hydroperoxides (34). The downstream ORF, named ORFC, encodes a protein that has no significant similarity to other ACs or to signatures related to this broad family of proteins. In this work, we present evidence that ORFC encodes a novel AC. First, ORFC was able to rescue different unrelated phenotypes of two different *E. coli cyuC* mutant strains. This ability was abolished when ORFC was disrupted by insertion. Second, ORFC restored the synthesis of cAMP in an *E. coli cyuC* mutant strain. Third, cell extracts of an *E. coli cyuC* mutant strain complemented with ORFC presented AC activity. For these reasons, ORFC was named "*cyuC*," which allowed us to propose its product, CyaC, as the first member of a new class of ACs, class VI.

The catalytic properties of class I AC from *E. coli* (59), class

II AC from *Bordetella pertussis* (29), class III AC from *Mycobacterium tuberculosis* (20), and class IV AC from *A. hydrophila* (46) have been published. Here we report the preliminary characterization of the novel class VI AC activity as an MBP-CyaC fusion protein in cell extracts. Compared to members of other AC classes, MBP-CyaC showed a reduced specific activity, although this might be due to the lack of purity of our preparations. MBP-CyaC shares with the class IV AC from *A. hydrophila* the peculiarity of having an alkaline optimum pH of 9.5 (46), but not its thermophilic properties, since incubation at 40°C sharply decreased the MBP-CyaC activity (data not shown). GTP was found to be a competitive inhibitor for the MBP-CyaC AC activity; whether it is a substrate, it is yet to be characterized.

The carboxy-terminal region of CyaC is probably involved in its catalytic function. An S252C missense mutation abolished the CyaC complementation ability (data not shown). This position is invariant in the four homologous proteins mentioned above. Also, a region highly similar to the ATP binding site proposed by Peterkofsky and coworkers (39) is conserved in the carboxy-terminal region of CyaC and its homologs (Fig. 1). To date, six different classes of ACs have been described. The complexity of proteins with nucleotide cyclase activity suggests that they arose by convergent evolution rather than by divergence from an ancestral protein, as was previously described (13, 46).

The physiological role of cAMP in members of the family *Rhizobiaceae* remains elusive, despite the continuous efforts of several research groups. Genetic approaches have been hampered by the presence of multiple *cyA* genes. The recently published genomic sequences of *M. loti* and *S. meliloti* allowed the identification of at least 12 and 26 different ACs/GCs, respectively (18, 24). The physiological relevance of harboring multiple nucleotide cyclases is poorly understood; however, it is possible to argue that the activity and expression of each one of these cyclases might be regulated in response to specific external signals or to particular growth conditions, probably as a consequence of belonging to different signal transduction pathways. This complexity might be the reason we were not able to find a discernible phenotype for our *cyuC* mutant under any condition tested.

The expression of *cyuC* could only be detected in the presence of cumene hydroperoxide, which triggers a significant induction (approximately 10-fold) (Fig. 2). This result was not totally unexpected, since *cyuC* is cotranscribed with a gene named *ohr*, the product of which is highly similar to the Ohr protein of *X. campestris*, which is induced in the presence of organic hydroperoxide (34). Plants increase the production of oxygen-reactive species as part of their defense strategy against pathogens (7). Early node establishment stages can be considered similar to early phytopathogenesis. Although this assumption suggests that the transcription of the *ohr-cyuC* operon might be activated by bean root exudates, we found no evidence to support this assumption. Alternatively, we suggest that *ohr-cyuC* operon expression can be induced in response to the accumulation of oxygen-reactive species as a consequence of the higher respiratory rates required to sustain bacteroid metabolism. However, the symbiotic capacities of an *R. etli cyuC* mutant strain were not altered.

We were not able to find any discernible phenotype, either

for the *ohr* or for the *cyoC* mutant strains in the presence of cumene hydroperoxide. This might be due to the existence in *R. ellipticus* of alternative detoxification mechanisms, as has been observed for *X. campestris* (34).

It has been shown recently that the *X. campestris ohr* gene is negatively regulated by the *ohrR* product (49). As for the *X. campestris ohr* gene, the *R. ellipticus ohr-cyoC* operon did not respond to hydrogen peroxide, indicating that the transcription of these genes is independent of OxyR. We suggest that *R. ellipticus* contains a specific regulator functionally similar to *ohrR* mediating the transcriptional response to organic peroxides. In fact, sequences highly similar to *ohrR* were found in the genome sequence of other members of the family *Rhizobiaceae* (data not shown).

The analysis of the whole genome sequences of three members of the family *Rhizobiaceae*: *M. loti* (24), *S. meliloti* (18), and *A. tumefaciens* (58) revealed the presence of genes of unknown function coding for CyaC homologs. In none of these cases is the *R. ellipticus ohr-cyoC* genetic organization conserved. The presence of *cyoC* seems to be an exclusive trait of *Rhizobiaceae*, since no homologs could be identified in the genome sequences of other alpha proteobacteria, such as *Rhodobacter sphaeroides* and *Caulobacter crescentus*.

In enteric bacteria, such as *E. coli*, cAMP exerts its function while bound to the regulatory protein CRP. The CRP-cAMP complex is able to bind to specific DNA sequences and by this means positively or negatively regulate gene transcription of operons involved in functions such as catabolite repression (27). However, no CRP homologs can be detected in the genomes of *Rhizobiaceae*, and for this reason, the mechanism of how cAMP acts in this group of organisms remains unknown.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Rosa Angélica Rivas, José A. Gama, and Angeles Pérez-Oseguera for their skillful technical support. We also thank Paul Gayán and Eugenio López for the primer synthesis, Barbara Bachmann and the *E. coli* Genetic Stock Center for SP850 strain, Mónica Rosenbluth for the generous gift of bean root exudates, and Alberto Mendoza for adaptation of swarming plates for *Rhizobium*. We acknowledge Brenda Valderama for comments on the manuscript.

#### REFERENCES

1. Alessey, M. F., L. N. Shokulenko, and T. P. Croughan. 1995. Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and *in vitro* deletion/insertion mutagenesis. *Gene* 160: 63-67.
2. Ali, S. A., and A. Steinkasserer. 1995. PCR-ligation-PCR mutagenesis: a protocol for creating gene fusions and mutations. *BioTechniques* 18:749-750.
3. Alper, M. D., and B. N. Ames. 1978. Transport of antibiotics and metabolite analogs by systems under cyclic AMP control: positive selection of *Salmonella typhimurium* *cya* and *crp* mutants. *J. Bacteriol.* 133:149-157.
4. Altshull, S. F., T. L. Maitland, A. A. Schäfer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
5. Archdeacon, J., J. Tally, B. Boesten, A. Danchin, and F. O'Garra. 1995. Cloning of the second adenylate cyclase gene (*cya2*) from *Rhizobium meliloti* P34: sequence similarity to eukaryotic cyclases. *FEMS Microbiol. Lett.* 128: 177-184.
6. Beuve, A., B. Boesten, A. Cramér, A. Danchin, and F. O'Garra. 1990. *Rhizobium meliloti* adenylate cyclase is related to eucaryotic adenylate cyclase and guanylate cyclase. *J. Bacteriol.* 172:2614-2621.
7. Bolwell, G. P. 1999. Role of active oxygen species and NO in plant defense responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2:287-294.
8. Boyer, H. W., and D. Roulland-Dussoit. 1969. A complementation analysis of restriction and modification in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41:459-472.
9. Cavallo, M. A., S. Encarnación, A. Leija, Y. Mora, and J. Mora. 1996. Genetic and physiological characterization of a *Rhizobium ciceri* mutant strain unable to synthesize poly-β-hydroxybutyrate. *J. Bacteriol.* 178:1646-1654.

10. Chelm, B. K. 1987. Developmental genetics and molecular biology of rhizobia-induced nodulation, p. 29-38. In *Plant research 1987*. Michigan State University-Department of Energy Plant Research Laboratory 22nd annual report. Michigan State University, East Lansing, Mich.
11. Cotta, M., T. Whitehead, and M. Wheeler. 1998. Identification of a novel adenylate cyclase in the ruminal anaerobe, *Prevotella ruminicola* D31d. *FEMS Microbiol. Lett.* 157:257-260.
12. Caerzo, M., E. Wallin, L. Simon, G. von Hejne, and A. Eklöf. 1997. Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Prot. Eng.* 10:673-676.
13. Danchin, A. 1993. Phylogeny of adenylate cyclases. *Adv. Second Messenger Phosphotrans. Res.* 21:109-162.
14. Danjel, J., and A. Danchin. 1979. Involvement of cAMP and CRP in the sensitivity of *Escherichia coli* K12 towards serine. *Mol. Gen. Genet.* 176:343-350.
15. Ditta, G., S. Stanfield, D. Corbin, and D. Hellmuth. 1980. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:7347-7351.
16. Encarnación, S., M. Dunn, K. Williams, and J. Mora. 1995. Fermentative and aerobic metabolism in *Rhizobium ciceri*. *J. Bacteriol.* 177:3058-3066.
17. Friedman, M., R. Sharon, S. Brown, J. Bulkema, and F. Ausubel. 1982. Construction of a broad range cosmid cloning system and its use in the genetic analysis of *Rhizobium meliloti*. *Gene* 18:289-296.
18. Galbetti, F., T. M. Finin, S. R. Long, A. Puhler, P. Abola, F. Ampe, F. Barloy-Hubler, M. J. Barnett, A. Becker, P. Bolstad, G. Böhme, M. Boutry, L. Bower, J. Buchmeister, E. Cadieu, D. Capela, P. Chalm, A. Cowie, R. W. Davis, A. Deranlot, R. F. Ehrlich, S. G. Fisher, S. Gloux, T. Godrie, A. Goffeau, B. Golding, J. Gouy, M. Gurjail, I. Hernandez-Lucas, A. Hong, I. Hulzar, R. W. Hyman, T. Jelaire, D. Kahn, M. L. Kahn, S. Kalman, D. H. Keating, E. Kiss, C. Komp, Y. Lecloux, D. Masny, C. Palm, M. C. Peck, T. M. Pohl, D. Portetelle, B. Purnelle, U. Ramsperger, R. Surzycki, P. Thebault, M. Vandenberg, F. J. Vorholter, S. Weidner, D. H. Wells, K. Wong, K. C. Yeh, and J. Batut. 2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* 293:668-672.
19. Guerrini, M. L., and B. K. Chelm. 1984. Isolation and expression of the *Bacillus thuringiensis japonicum* adenylate cyclase gene (*cya*) in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 159:1068-1071.
20. Guo, Y. L., T. Seebacher, U. Kurz, J. U. Linder, and J. Schultz. 2001. Adenylate cyclase RV1625c of *Mycobacterium tuberculosis*: a progenitor of mammalian adenylate cyclases. *EMBO J.* 20:3667-3675.
21. Hanahan, D. 1983. Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-560.
22. Houslay, M. D., and G. Milligan. 1997. Tailoring cAMP-signaling responses through isoform multiplicity. *Trends Biochem. Sci.* 22:217-224.
23. Jones, B. L., A. K. Agrawal, and D. L. Kelster. 1985. Inhibition of growth of *Rhizobium japonicum* by cyclic GMP. *J. Bacteriol.* 164:757-761.
24. Keneko, T., Y. Nakamura, S. Sato, E. Asamizu, T. Kato, S. Sazanoto, A. Watanabe, K. Ideyasu, A. Ishikawa, K. Kawashima, T. Kimura, Y. Kihida, C. Kiyokawa, M. Kohara, M. Matsumoto, A. Matsuno, Y. Mochizuki, S. Nakayama, N. Nakazaki, S. Shimo, M. Sugimoto, C. Takuchi, M. Yamada, and S. Tabata. 2000. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* 7:331-338.
25. Keen, N. T., S. Tamaki, D. Kobayashi, and D. Trollingier. 1988. Improved broad-host-range plasmid for DNA cloning in Gram-negative bacteria. *Gene* 70:191-197.
26. Kobayashi, W., and W. Lotz. 1989. Construction of a *lacZ*-kanamycin-resistance cassette, useful for site-directed mutagenesis and as a promoter probe. *Gene* 84:467-471.
27. Kolb, A., S. Busby, H. Buc, S. Garaga, and S. Adhya. 1993. Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu. Rev. Biochem.* 62:749-795.
28. Kubacka, P., and G. Kramerle. 1994. Electroporation of cosmid DNA into bacterial cells. *Trends Genet.* 10:5.
29. Ladant, D., C. Breatin, J. M. Alonso, L. Cronon, and N. Guals. 1996. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. Purification, characterization and radioimmunoassay. *J. Biol. Chem.* 271:16264-16269.
30. Lim, S., and K. Shannugam. 1979. Regulation of hydrogen utilization in *Rhizobium japonicum* by cyclic AMP. *Biochim. Biophys. Acta* 584:479-492.
31. Lim, S. T., H. Henneke, and D. B. Scott. 1979. Effect of cyclic guanosine 3',5'-cyclic monophosphate on nitrogen fixation in *Rhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 139:254-263.
32. Liu, Y.-A., E. Ruelvo, V. D. Rao, and J. H. Hurley. 1997. Catalytic mechanism of the adenylate and guanylyl cyclase: modeling and mutational analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:13414-13419.
33. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
34. Mongkolkeu, S., W. Pratlant, S. Loppasert, M. Fungthong, and S. Chomnongkol. 1998. Identification and characterization of a new organic hydroperoxide resistance (*ohr*) gene with a novel pattern of oxidative stress regulation from *Xanthomonas campestris* pv. phaseoli. *J. Bacteriol.* 180:2636-2643.
35. Nakai, K., and M. Kanehisa. 1991. Expert system for predicting protein

- localization sites in Gram-negative bacteria. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 11:95-110.
36. Narayan, C. M., and P. K. Chakrabarty. 1993. Succinate-mediated catabolic repression of enzymes of glucose metabolism in root-nodule bacteria. *Curr. Microbiol.* 26:247-251.
  37. Noel, K., A. Sanchez, L. Fernandez, J. Leemans, and M. A. Cevallos. 1984. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *J. Bacteriol.* 158:148-155.
  38. Perlman, R. L., and I. Pastan. 1969. Pleiotropic deficiency of carbohydrate utilization in an adenyl cyclase deficient mutant of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37:157-164.
  39. Peterkofsky, A., A. Reizer, J. Reizer, N. Gollop, P. P. Zhu, and N. Amlin. 1993. Bacterial adenyl cyclases. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* 44:31-65.
  40. Salomon, Y., C. Lofatos, and M. Rodbell. 1974. A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Anal. Biochem.* 58:541-548.
  41. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning, a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
  42. Selbitzschka, W., S. Niemann, and A. Pühler. 1993. Construction of the gene replacement vectors for gram negative bacteria using a genetically modified *lacR* gene as a positive selection marker. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38:615-618.
  43. Shah, S., and A. Peterkofsky. 1991. Characterization and generation of *Escherichia coli* adenylate cyclase deletion mutants. *J. Bacteriol.* 173:3238-3242.
  44. Sharypova, L., S. Yurgel, M. Keller, B. Simarov, A. Pühler, and A. Becker. 1999. The eff-482 locus of *Sinorhizobium meliloti* CXMI-105 that influences symbiotic effectiveness consists of three genes encoding an endoglycanase, a transcriptional regulator and an adenylate cyclase. *Mol. Gen. Genet.* 261:1032-1034.
  45. Simon, R., U. Pfeifer, and A. Pühler. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *BioTechnology* 1:784-791.
  46. Sismiero, O., P. Tricot, F. Biville, C. Vivares, and A. Danchin. 1998. *Aeromonas hydrophila* adenyl cyclase 2: a new class of adenyl cyclases with thermophilic properties and sequence similarities to proteins from hyperthermophilic archaeobacteria. *J. Bacteriol.* 180:3339-3344.
  47. Sonnhemmer, E. L. L., G. von Heljne, and A. Krogh. 1998. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences, p. 175-182. In J. Glasgow, T. Littlejohn, F. Major, R. Lathrop, D. Sankof, and C. Sensen (ed.), *Proceedings of the Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*. AAAI Press, Menlo Park, Calif.
  48. Steiner, A., D. Kipnis, R. Utiger, and C. Parker. 1969. Radioimmuno-assay for the measurement of adenosine 3'-5'-cyclic phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 64:367-373.
  49. Sukchawalit, R., S. Lopraert, S. Attichartpongkul, and S. Mongkolkeu. 2001. Complex regulation of the organic hydroperoxide resistance gene (*ohr*) from *Xanthomonas* involves OhrK, a novel organic peroxide-inducible negative regulator, and posttranscriptional modification. *J. Bacteriol.* 183:4405-4412.
  50. Temter, J. J., R. K. Sunshara, A. G. Gilman, and S. R. Sprang. 1997. Crystal structure of the catalytic domains of adenyl cyclase in a complex with Gsa-GTPγS. *Science* 278:1907-1916.
  51. Tucker, C. L., J. H. Hurley, T. R. Miller, and J. B. Hurley. 1998. Two amino acid substitutions convert a guanylate cyclase, ReIGC-1, into an adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5993-5997.
  52. Tuszynski, G. E., and I. Simon. 1998. Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: applications to topology prediction. *J. Mol. Biol.* 283:489-506.
  53. Ucker, D. S., and E. R. Sliger. 1978. Catabolite-repression-like phenomenon in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 136:1197-1201.
  54. Upchurch, R., and G. Elkan. 1978. The role of ammonia, L-glutamate, and cAMP in the regulation of ammonia assimilation in *Rhizobium japonicum*. *Biochem. Biophys. Acta* 538:243-249.
  55. Valderrama, R., A. Dávalos, L. Girard, E. Moret, and J. Mura. 1996. Regulatory proteins and *cis*-acting elements involved in the transcriptional control of *Rhizobium eih* reiterated *nifH* genes. *J. Bacteriol.* 178:3119-3126.
  56. von Heljne, G. 1992. Membrane protein structure prediction, hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J. Mol. Biol.* 225:487-494.
  57. Wheatcraft, R., G. D. McRae, and R. W. Miller. 1990. Changes in the *Rhizobium meliloti* genome and the ability to detect supercoiled plasmids during bacteroid development. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3:9-17.
  58. Wood, D. W., J. C. Setubal, R. Kaul, D. E. Atonka, J. P. Kitajima, V. K. Okura, Y. Zhou, L. Chen, G. E. Wood, N. F. Almeida, Jr., L. Woe, Y. Chen, I. T. Paulsen, J. A. Eisen, P. D. Karp, D. Howe, Sr., P. Chapman, J. Clendinning, G. Deatherage, W. Gillet, C. Grant, T. Kutayavin, R. Levy, M.-J. Li, E. McClelland, A. Palmieri, C. Raymond, G. Rouse, C. Saenphimmachak, Z. Wu, P. Romero, B. Gordon, S. Zhang, H. Xue, Y. Tao, P. Biddle, M. Jung, W. Krespan, M. Perry, B. Gordon-Kamm, L. Liao, S. Kim, C. Hendrick, Z.-Y. Zhao, M. Dotan, F. Chumley, S. V. Tingey, J.-F. Tomb, M. P. Gordon, M. V. Olson, and E. W. Nester. 2001. The genome of the natural genetic engineer *Aerobacterium tumefaciens* C58. *Science* 294:2317-2323.
  59. Yang, J. K., and W. Epstein. 1983. Purification and characterization of adenyl cyclase from *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.* 258:3750-3758.
  60. Zhang, G., Y. Liu, A. E. Ruoho, and J. H. Hurley. 1997. Structure of the adenyl cyclase catalytic core. *Nature* 386:247-253.

## DISCUSIÓN

No obstante que el AMPc ha sido involucrado en el control de diversos fenómenos en las bacterias de la familia Rhizobiaceae, la carencia de cepas deficientes en la síntesis de este nucleótido han impedido dilucidar su función en este importante grupo de bacterias.

En este trabajo presentamos la caracterización molecular de tres genes *cya* (*cyaA*, *cyaB* y *cyaC*) de la cepa CE3 de *Rhizobium etli* que codifican para distintas AC's. Mostramos el estudio de la expresión de los tres genes, el análisis fenotípico de las mutantes de *R. etli* deficientes en cada una de estas AC's y el análisis fenotípico de una doble mutante. El análisis de las secuencias de estos genes nos indican que dos de estas AC's (*CyaA* y *CyaB*) pertenecen a la clase III (Universal) de las AC's y que la tercera (*CyaC*) no muestra similitud con ninguna proteína antes descrita en las bases de datos. En este trabajo demostramos que *CyaC* posee actividad de AC y que por lo tanto conforma una nueva clase de AC's, la clase VI. Los tres genes presentaron patrones de expresión diferencial, mientras que la transcripción de *cyaA* se incrementa cuando *R. etli* crece en fuentes de carbono glucolíticas, *cyaB* se expresa constitutivamente en todas las condiciones de crecimiento analizadas, y *cyaC* solo se expresa en presencia de hidroperóxidos orgánicos. El análisis fenotípico de las mutantes sencillas de *R. etli* nos muestra que las tres AC's son indispensables para el desarrollo de la bacteria en vida libre y en simbiosis con el frijol. Sin embargo, la doble mutante *cyaAcyab* generó nodulos en las raíces del frijol que muestran una reducción notablemente (50%) en su actividad de nitrogenasa.

Los tres genes *cya* se aislaron mediante la complementación funcional de una mutante *cya* de *E. coli* con ADN procedente de un banco genómico de la cepa CE3 de *R. etli*. Los tres genes *cya* complementaron de manera diferencial a la mutante *cya* de *E. coli*, particularmente *cyaA* y *cyaB*, clonados en un vehículo de alto número de copias (pSK) complementaron todos los fenotipos analizados en la misma extensión en que lo hizo el propio gen *cya* de *E. coli*, este último clonado en un vector de mediano número de copias (pRK415). Los tres genes le permitieron a la mutante *cya* de *E. coli* sintetizar AMPc en diferentes concentraciones (Tabla 7), particularmente la cepa complementada con *cyaA* sintetizó mayor cantidad de AMPc que las cepas complementadas con *cyaB* o *cyaC*. Los niveles de AMPc sintetizados por las cepas complementadas con los genes *cyaA* o *cyaB* clonados en el pSK fueron 4 y 2.5 veces mayores, respectivamente, que los niveles de AMPc sintetizados por la cepa silvestre. Mientras que la cepa complementada con el *cyaC*, clonado en el mismo vector, solo acumuló el 40% del AMPc sintetizado por la copia silvestre. Es posible que los tres genes se expresen en *E. coli* a partir de sus promotores indígenas y no por el promotor PLac del pSK. Lo anterior es porque en los tres casos, los fragmentos de ADN se encuentran clonados en el pSK de tal manera que los genes *cya* están orientados en dirección opuesta al promotor PLac del vehículo.

El análisis de las secuencias nucleotídicas, recientemente obtenidas, de los genomas de *M. lottii*, *S. meliloti* y *A. tumefaciens*, logra identificar numerosos genes (12, 26, y 3, respectivamente) cuyos productos poseen regiones homólogas a las dominios catalíticos de las AC's de la clase III. Así mismo, no se identificaron genes que codificaran AC's de otra clase (Kaneko *et al.*, 2000; Galibert *et al.*, 2001; Wood *et al.*, 2001). En trabajos previos se habían clonado y caracterizado tres de los genes *cya* (*cya1*, *cya2* y *cya3*) de *S. meliloti*. Las AC's Cya1 y Cya2 poseen en el extremo amino, y la Cya3 en el carboxilo, un solo dominio catalítico propio de las ciclasas de la clase III (Kiely *et al.*, 1983; Beauve *et al.*, 1990; Archdeacon *et al.*, 1995; Shapyrova *et al.*, 1999). La AC Cya3 presenta en el carboxilo terminal cuatro secuencias repetidas similares a las tetracoceptidos (TRP's) presentes en proteínas eucariotes involucradas con la división celular. Muchas de las ciclasas de *S. meliloti* y algunas de las ciclasas de *M. lottii* poseen estos TRP's. Hasta el momento, únicamente en bacterias rizobiáceas se han descrito este tipo de ciclasas. La AC CyaB de *R. elli* presenta gran similitud con la Cya2 de *S. meliloti* (similitud 65%, identidad 55%). Ambas proteínas presentan en el extremo amino tres dominios transmembranales, que podrían estar involucrados con la percepción de estímulos ambientales que eventualmente regularan su actividad. Tal es el caso de la ACG del eucariote inferior *Dictyostelium*. Esta proteína tiene la capacidad de percibir la osmolaridad extracelular y ajustar su actividad regulando de esta manera los niveles de AMPc que a su vez controlan la germinación de las esporas (Van *et al.*, 1996). La ciclasa CyaA de *R. elli* es una proteína citoplásmica que tiene parecido con otras AC's descritas en otras bacterias, algunas Gram positivas, pero particularmente presenta una alta similitud (50%) con la AC CyaA de la bacteria *Stigmatella aurantiaca* (Coudart-Cavalli *et al.*, 1997).

El alineamiento presentado en la figura 6, nos muestra que CyaA y CyaB conservan los residuos catalíticos más importantes para la catálisis que llevan a cabo estas proteínas. Sin embargo y sorprendentemente no conservan ninguno de los tres residuos responsables de la selectividad de sustrato en las AC's o GC's (ATP o GTP). Para saber si estas proteínas tienen la capacidad de sintetizar GMPc, medimos las pozas de este nucleótido en crecimientos exponenciales de las mutantes *cya* de *E. coli* complementadas con las distintas ciclasas. Como se muestra en la tabla 8, las cepas complementadas con los plásmidos pEVSm (*cyaA*) y pE2 (*cyaB*) sintetizaron GMPc, no así la cepa silvestre, ni la mutante *cya*, ni tampoco la cepa complementada con el plásmido p3310 (*cyaC*). Los niveles de GMPc sintetizado por las cepas complementadas con los plásmidos pEVSm y pE2 fueron un 30% y 40%, respectivamente, los niveles de AMPc alcanzados por las mismas cepas en las mismas condiciones. Esto nos indica que no obstante que ambas ciclasas tienen la capacidad de sintetizar GMPc, aparentemente producen más eficientemente AMPc. Alternativamente, podría pensarse que en *E. coli* hay limitaciones en la concentración de GTP, es decir, del sustrato para la actividad de guanil ciclasas. Al igual que en el caso del AMPc, la cepa

complementada con el plásmido pEVSm presentó niveles de GMPc más altos que los niveles alcanzados por la cepa complementada con el plásmido pE2. Estos resultados nos indican que en *E. coli* ambas proteínas tienen actividad dual, es decir, que tienen la capacidad de sintetizar AMPc y GMPc. Es posible que en *R. etli* ambas ciclasas sintetizen preferentemente AMPc, ya que cuando medimos las pozas de GMPc producidas por la cepa silvestre CE3 encontramos que los niveles de este nucleótido son notablemente más bajos en comparación con los niveles de AMPc alcanzados por la misma cepa (Tabla 9). Alternativamente podríamos pensar que en *R. etli* ambas ciclasas sintetizan tanto AMPc como GMPc pero que existe una fosfodiesterasa de GMPc tan activa que impide la acumulación de este nucleótido. Incluso se podría pensar que el ensayo empleado para cuantificar GMPc no es lo suficientemente sensible. En estudios previos se han obtenido variantes de adenil ciclasas que pierden la especificidad por el sustrato y se convierten en ciclasas no selectivas. Sin embargo, aún no ha sido posible intercambiar totalmente la selectividad de sustrato de las adenil ciclasas (Sunahara *et al.*, 1998). Hasta el momento, las proteínas CyaA y CyaB de *R. etli* son los primeros ejemplos de ciclasas naturales con actividad dual. Danchin propone que evolutivamente las AC's y las GC's de la clase III, se generaron a partir un ancestro común que presentaba actividad de ciclasa de nucleótidos purínicos trifosfatados incapaz de discriminar entre los posibles sustratos. En este sentido es probable que las ciclasas CyaA y CyaB pudieran estar en un proceso de definición de su actividad y que el ancestro común de las AC's/GC's haya sido muy parecido a CyaA y a CyaB de *R. etli*. Por otra parte, cabe cuestionarse si ambas ciclasas tienen la capacidad de utilizar como sustrato otros nucleótidos purínicos trifosfatados, además del ATP y GTP, como el ITP (inosina trifosfato) o el HTP (hipoxantina trifosfato), incluso sería interesante averiguar si utilizan nucleótidos pirimídicos trifosfatados. Sin embargo, en la literatura encontramos que el AMPc y el GMPc son los únicos nucleótidos cíclicos involucrados con el control de diversos fenómenos celulares.

La secuencia de aminoácidos de CyaC de *R. etli* no presenta similitud significativa con ninguna AC's descrita en las bases de datos y carece de los motivos característicos de las AC's de la clase III. En el artículo anexo demostramos con experimentos *in vivo* e *in vitro* que CyaC tiene actividad de adenil ciclasas por lo que se constituye como el primer miembro de una nueva clase de AC's, la clase VI. Danchin ha clasificado a las AC's descritas en cuatro clases. La primera clase la constituyen AC's enterobacterianas. La segunda se compone de AC's tóxicas. La tercera comprende a las AC's y GC's de origen eucarionte y procarionte. La cuarta clase conjunta a las AC's termofílicas identificadas mayoritariamente en arqueobacterias. Recientemente se describió una AC's en la bacteria anaeróbica estricta *Provetela ruminicola* que no posee similitud con ninguna proteína en las bases de datos y a la que podríamos definir como el primer miembro de la clase V (Danchin, 1993; Sismeiro *et al.*, 1998; Cotta *et al.*, 1999). La búsqueda de homólogos a



CyaC de *R. etli* en las bases de datos identificó proteínas de función desconocida únicamente en los genomas de *S. meliloti*, *M. loti* y *A. tumefaciens*. No se encontraron proteínas homólogas en los genomas totalmente secuenciados de otras alfa proteobacterias, incluyendo *Rhodobacter capsulatus*, *R. sphaeroides* y *Caulobacter crescentus*, por lo que podríamos suponer que esta clase de AC's son exclusivas de rhizobiacaeas. La AC CyaC posee en el extremo carboxilo una región con gran parecido al motivo de unión a ATP propuesto por Peterkofsky y colaboradores (1993) que podría estar involucrada con la actividad de esta enzima. La introducción de un sitio de restricción para la enzima *Pst*I en el extremo 3' del gen *cyaC* generó la mutación S252C (Fig. 5C). Esta variante de CyaC fue incapaz de complementar a la mutante *cya* de *E. coli*. Estos resultados nos sugieren algún papel crucial de la serina 252 en la actividad de ciclase de CyaC.

El aislamiento de los genes *cya1* y *cya2* de *S. meliloti* permitió la generación de una cepa doble mutante deficiente en ambas AC's derivada de la cepa silvestre F34. Esta mutante, al igual que las mutantes sencillas *cya1* y *cya2*, continúan sintetizando AMPc en cantidades similares a los producidos por la cepa silvestre. Ninguna de estas mutantes presentan alteraciones en su crecimiento en vida libre o en su fenotipo simbiótico con respecto a la cepa silvestre F34 (Archdeacon *et al.*, 1995). Sorprendentemente, la mutante *cya3* de *S. meliloti* (T482), generada por la inserción de un transposón Tn5, incrementó su capacidad simbiótica en comparación con la cepa parental CXM1-105. Aparentemente, las plantas de alfalfa noduladas con la cepa T482 incrementaron hasta en un 25% su biomasa en comparación con las plantas noduladas con la cepa parental CXM1-105. En vida libre esta mutante no presentó ninguna diferencia con respecto a la cepa silvestre (Shapuyrova *et al.*, 1999).

Las mutantes *cya* de *R. etli* CON13 (*cyaA*), CON23 (*cyaB*), y CON31 (*cyaC*) presentan el mismo comportamiento que la cepa silvestre CE3 en los fenotipos analizados, los cuales incluyeron crecimientos en medio mínimo (MM) suplementados con distintas fuentes de carbono, motilidad, nodulación y fijación de nitrógeno o reducción de acetileno. Por otra parte, anteriormente se mencionó como la cepa CE3 de *R. etli* al ser subcultivada consecutivamente en MM presenta un metabolismo que asemeja al fermentativo, ya que excreta aminoácidos, ácidos orgánicos (algunos son intermediarios de ciclo de Krebs), y acumula poli-β-hidroxibutirato (PHB) en grandes cantidades (Encarnación *et al.*, 1995). El crecimiento de la cepa CE3 se mantiene ininterrumpidamente durante los subcultivos cuando al MM se le adicionan suplementos como la tiamina, la biotina o el AMPc. Las distintas mutantes *cya* de *R. etli*, al igual que la cepa silvestre, disminuyeron su capacidad de crecimiento durante los subcultivos de CE3 (datos no presentados). Cabe cuestionarse si existe relación directa entre el efecto del AMPc y el efecto de las vitaminas (biotina y tiamina) en el fenómeno de dejar de crecer que experimenta *R. etli*. En

este sentido, sería interesante averiguar si alguna de las mutantes *cya* interrumpen su crecimiento durante los subcultivos aún en la presencia de vitaminas.

Las pozas de AMPc sintetizados por las mutantes *cya* y la cepa silvestre en crecimientos en MM-succinato fueron similares (Tabla 9). Sin embargo, en el MM-glucosa, las cepas CON13 (*cyaA*) y CON43 (*cyaAcyb*) presentaron niveles de AMPc menores a los niveles producidos por la cepa silvestre, aproximadamente un 50% y 60%, respectivamente. Estos datos nos sugieren que en estas condiciones *CyaA* tiene alguna función importante para sostener la producción de AMPc. Por otra parte, si bien la doble mutante CON43 (*cyaAcyb*) no presentó alteraciones en los fenotipos analizados en vida libre, en simbiosis con el frijol generó nódulos que presentaron una disminución notable (casi un 50%) de la actividad de nitrogenasa, en comparación con los nódulos generados por la cepa silvestre. En este sentido, es probable que una cepa triple mutante, (*cyaAcybCyaC*) presente un fenotipo simbiótico aún más drástico, que nos permita concluir que en *R. etli*, el AMPc tiene un papel importante en la fijación de nitrógeno. Por otra parte y como se mencionó anteriormente, los niveles de GMPc producidos por las distintas mutantes y por la cepa silvestre fueron en lo general muy reducidos en comparación con los niveles de AMPc alcanzados por las mismas cepas, razón por la cual no es posible asumir algún papel de *CyaA* y *CyaB* en la síntesis del GMPc.

Por otra parte, nos resulta interesante que no observemos fenotipos de las distintas mutantes *cya* de *R. etli* en vida libre, ya que cuando analizamos la expresión de los tres genes *cya* en estas mismas condiciones, observamos que *cyaA* y *cyaB* se expresan considerablemente mientras que *cyaC* se mantiene reprimida. En este sentido suponemos que aún cuando *cyaA* y *cyaB* se expresan en MM suplementado con fuentes de carbono no glucolíticas como el succinato, posiblemente ni *CyaA* ni *CyaB* tienen un papel relevante en la síntesis de AMPc en estas condiciones. Como se mencionó anteriormente, los niveles de AMPc producidos por las cepas CON13 (*cyaA*), CON23 (*cyaB*) y CON43 (*cyaAcyb*) de *R. etli*, crecidas en MM-succinato, no disminuyeron en comparación con los niveles de AMPc sintetizados por la cepa silvestre (Tabla 9). Podría ser posible que existan mecanismos de regulación postranscripcional que estuvieran regulado la actividad de estas ciclasas. Así también, podríamos suponer que la deficiencia de *CyaA* ó *CyaB* o ambas, incrementa la actividad de alguna otra u otras AC's compensando de alguna manera la pérdida de una de estas. Por otra parte, cuando analizamos el patrón de expresión de *cyaA* y *cyaB*, a partir de los crecimientos de las cepas CON11 (*cyaA-lacZ*) y CON21 (*cyaB-lacZ*) en MM suplementados con fuentes de carbono glucolíticas, observamos lo siguiente: i) La expresión del gen *cyaB* se mantiene en niveles muy similares a los alcanzados en los MM suplementados con fuentes de carbono no glucolíticas y ii) El gen *cyaA* incrementa su expresión notablemente en

estas condiciones en comparación con los niveles de expresión presentados en condiciones de MM suplementados con fuentes de carbono no glucolíticas. Como se observa en la figura 8, la cepa CON11 (*cyaA-lacZ*) crecida en MM-glucosa presentó el doble de actividad de  $\beta$ -galactosidasa en comparación con los niveles alcanzados cuando la misma cepa se cultivó en MM-succinato. Estos resultados son consistentes con la reducción en los niveles de AMPc que presentaron las mutantes CON13 (*cyaA*) y CON43 (*cyAcyb*) cuando se cultivaron en MM-glucosa en comparación con los niveles de AMPc sintetizados por la cepa silvestre en las mismas condiciones (Tabla 9). Ambos resultados nos indican que CyaA tiene un papel relevante en la síntesis de AMPc cuando *R. etli* crece en presencia de fuentes de carbono glucolíticas.

Por su parte, el gen *cyaC* se expresa únicamente en presencia de hidroperóxidos orgánicos, incrementando su expresión más de 10 veces. En el artículo anexo demostramos que el gen *cyaC* se encuentra formando parte de un operón con el gen *ohr* (Fig. 5C), denominado así por su similitud con el gen *ohr* de *X. campestris*. El gen *ohr* codifica una proteína que confiere resistencia a hidroperóxidos orgánicos como el peróxido de cumeno o el peróxido de terbutilo, por esta razón se propone que representa una nueva clase de peroxidasa de hidroperóxidos orgánicos (Mongkolsuk *et al.*, 1998). Se ha descrito que las plantas como parte de un programa de defensa contra el ataque de patógenos incrementan la producción de especies reactivas de oxígeno, colectivamente llamadas ROS (Bolwell, 1999). En este sentido podríamos suponer que la expresión del operón *ohr-cyaC* de *R. etli* se activa en respuesta al programa de defensa de la planta de frijol, iniciado durante la infección de las raíces por *Rhizobium* y otras bacterias patógenas. Por otra parte, una vez dentro de los nódulos, los bacteroides incrementan sus tasas respiratorias para sustentar el aporte energético necesario para la actividad de la nitrogenasa. Es sabido que como consecuencia de un metabolismo aeróbico activo se incrementan las concentraciones de distintos ROS como el superóxido,  $H_2O_2$  y los hidroperóxidos orgánicos, entre otros. Algunos de estos ROS, particularmente, los hidroperóxidos orgánicos podrían activar la transcripción del operón *ohr-cyaC*. Ambas situaciones antes descritas nos permiten suponer que tanto *ohr* como *cyaC* pueden tener algún papel en el establecimiento y manutención de una simbiosis efectiva. Sin embargo, tanto mutantes *cyaC* como *ohr* de *R. etli* carecen de fenotipo simbiótico y la expresión del operón no se indujo por la presencia de exudados de frijol. La bacteria *X. campestris*, al igual que otras bacterias, posee una peroxidasa llamada AhpCF que detoxifica de hidroperóxidos orgánicos. Es probable que en *R. etli* exista un mecanismo similar ya que la mutante *ohr* no mostró sensibilidad a peróxido de cumeno.

Resulta interesante que el operón *ohr-cyaC* solo se exprese en presencia de hidroperóxidos orgánicos y no por  $H_2O_2$ . Una situación similar se presentó en *X. campestris* y se demostró que la

transcripción de *ohr* no depende del regulador global OxyR, que regula la expresión de varios operones inducidos por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Mongkolsuk *et al.*, 1998). Recientemente se describió en *X. campestris* una proteína llamada OhrR, que regula negativamente la expresión del gen *ohr*. Esta proteína pertenece a la familia de reguladores transcripcionales MarR (Sukchawalit *et al.*, 2001). La búsqueda de homólogos a OhrR en el genoma de *S. meliloti* nos indica la existencia de varias proteínas reguladoras de la familia MarR en esta bacteria. Es probable en *R. etli* exista un regulador similar a OhrR que este regulando la expresión del operón *ohr-cyaC*.

La identificación de distintas proteínas encargadas de sintetizar AMPc en *M. loti*, *S. meliloti* y en *R. etli* obliga a cuestionarnos ¿Porqué las rhizobáceas presentan múltiples adenil ciclasas?. Las propiedades estructurales de las distintas AC's, aunados a los diferentes patrones de expresión que presentan los genes *cya* de *R. etli*, nos presentan un esquema en el que las distintas AC's posiblemente responden a señales o condiciones de crecimientos particulares. En este sentido, el análisis de las propiedades bioquímicas de las distintas ciclasas puede añadir información que nos permita esclarecer la función de las distintas proteínas. Todo esto sugiere que la bacteria posee distintos mecanismos que controlan la síntesis del AMPc y que mantienen su concentración en diferentes umbrales. Lo anterior supone la existencia de uno o varios mecanismos capaces de percibir estas diferencias en concentración y activar en consecuencia diferentes funciones celulares. En bacterias entéricas como *E. coli*, el sistema que media la función del AMPc es la proteína reguladora CRP. Este regulador se modifica alostéricamente por la unión de AMPc, en estas condiciones CRP adquiere la capacidad para unirse al ADN en secuencias específicas y de esta manera regula positiva y negativamente la transcripción de numerosos operones involucrados con diversas funciones incluyendo la represión catabólica. En ninguno de los genomas rhizobianos recientemente secuenciados se ha logrado identificar de manera contundente la existencia de una proteína homóloga a CRP, quedando aún la interrogante acerca de cual es el o los mecanismos que median la función del AMPc en estas bacterias. Recientemente se identificó en el genoma de la bacteria *Synechocystis sp.* una proteína capaz de unir AMPc y que tiene un parecido muy limitado con proteínas de la familia de reguladores CRP-FNR (menos del 20% de identidad con el CRP de *E. coli*) (Yoshimura *et al.*, 2000). En experimentos *in vitro*, los autores demuestran que esta proteína, a la cual llamaron SYCRP1, fue capaz de unirse a un fragmento de ADN que contiene la secuencia consenso para la unión de la proteína CRP de *E. coli*. Nuestra búsqueda de homólogos a SYCRP1 en el genoma de *S. meliloti* identificó un par de proteínas (SMc02175 y SMb21079), anotadas como posibles reguladores transcripcionales, que muestran una similitud mayor del 45% con la proteína de *Synechocystis*. Ya que en las rhizobiáceas no se ha logrado identificar proteínas dependientes de AMPc, es

probable que en estas bacterias la función del AMPc se ha mediada por una o varias proteínas "CRP-like".

En distintas rhizobiáceas se ha descrito la existencia de un fenómeno de represión catabólica similar al que presentan bacterias como *E. coli*, con la diferencia de que no es la glucosa sino ácidos dicarboxílicos, como el succinato o el malato, las fuentes de carbono que ejercen represión sobre el catabolismo de fuentes de carbono alternativas. Algunos reportes involucran al AMPc en el control de la represión catabólica en *Rhizobium* sin embargo, aun no se puede establecer contundentemente si el AMPc tiene algún papel importante en el control de este fenómeno o si es que existe un mecanismo alternativo que controla la represión catabólica en las rhizobiáceas y que es independiente del AMPc. *Rhizobium etli* sintetiza concentraciones similares de AMPc cuando crece en succinato o glucosa (Tabla 9) a diferencia de *E. coli* que en crecimientos en glucosa, su fuente de carbono predilecta, reduce notablemente la síntesis del nucleótido. Este resultado sugiere que el AMPc no está involucrado en el control de la represión catabólica ejercida por el succinato sobre el catabolismo de la glucosa en *R. etli*.

En este trabajo presentamos evidencias que sugieren la existencia de al menos cuatro genes *cya* que codifican para distintas ciclasas en *R. etli*, tres de los cuales fueron caracterizados y el cuarto únicamente lo identificamos por una señal de hibridación. Sin embargo, cabe cuestionarse acerca de la cantidad de ciclasas que codifica el genoma de *R. etli*. En el laboratorio del Dr. Guillermo Dávila, se está llevando a cabo la secuencia del genoma total de la cepa CE3 de *R. etli*. En una exploración inicial y empleando el programa de búsqueda de proteínas similares BLASTX, se identificaron 6 secuencias parciales cuyos productos traducidos presentan similitud con adenil ciclasas de la clase III (Dr. Victor Gonzáles, comunicación personal). Solo uno de estos péptidos había sido previamente identificado por el Dr. Sergio Encarnación, mediante una mutagénesis generalizada con transposón Tn5 en la que seleccionó cepas derivadas de la cepa CE3 con alteraciones en la formación de Biopelículas. Suponiendo que el cuarto gen *cya* que identificamos por hibridación corresponde a alguno de los seis genes antes mencionados, hasta el momento podríamos decir que *R. etli* posee al menos 9 genes *cya* distintos. En nuestra estrategia inicial solo logramos identificar 3 genes, posiblemente porque el resto de los genes *cya* no se transcriben en *E. coli* o porque la actividad de ciclasa de algunas de estas AC's requiere de activadores específicos que aparentemente *E. coli* no posee. No obstante la gran cantidad de ciclasas que posee *R. etli*, la doble mutante CON43 (*cyaAcyb*) reduce considerablemente su capacidad simbiótica. En este sentido, podríamos suponer que las múltiples ciclasas de *R. etli* son específicas para algunas condiciones de crecimiento y por lo tanto pertenecen a distintas vías de transducción de señales o a distintas cascadas regulatorias.

## PERSPECTIVAS

En colaboración con la Dra. Marfa Eugenia Torres Márquez, que trabaja en la Facultad de Medicina de la UNAM, hemos iniciado la caracterización de la actividad dual de la ciclasa CyaA. Al momento hemos generado, por mutagénesis oligo dirigida, variantes de CyaA en dos de los tres residuos esenciales que determinan la especificidad del sustrato (ATP o GTP). Esto con la intención de generar mutantes de CyaA que solo posean la actividad de adenil ciclasa.

El Dr. Sergio Encarnación, que trabaja en el Programa de Ingeniería Metabólica del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno de la UNAM, generó una mutante de *R. elli* que presenta alteraciones en la formación de Biopelículas. Aparentemente el gen afectado codifica una adenil ciclasa. En colaboración con el Dr. Encarnación hemos iniciado la caracterización de este gen *cya*. Actualmente tenemos clonado y secuenciado a este gen y lo hemos llamado *cyaD*. El producto de *cyaD* conserva los residuos importantes para la actividad de ciclasa y presenta dos de los tres residuos involucrados con la especificidad por el sustrato. Lo anterior nos indica que CyaD es una adenil ciclasa bonafide.

La existencia de un novedoso sistema de regulación por estrés oxidativo, que no involucra al regulador OxyR, nos incitó para iniciar la caracterización del sistema de regulación del operón *ohr-cyaC* de *R. elli*. Actualmente, esté es el proyecto de la tesis de licenciatura Silvia Grisel Ballesteros Hernandez. Al momento tenemos identificado, mediante un ensayo de primer extensión, al inicio de la transcripción del operón y al probable promotor del mismo.

## REFERENCIAS

- Alexeyev M. F., Shokolenko I. N., and T. P. Croughan (1995) Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and *in vitro* deletion/insertion mutagenesis. *Gene* 160: 63-67.
- Amin N., and A. Peterkofski. (1994) Importance of the region around 196 for the catalytic activity of the adenylate cyclase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 269: 31074-31079.
- Aravind L., and E. Koonin (1999) DNA polymerase  $\beta$ -like nucleotidyltransferase superfamily: identification of three new families classification and evolutionary history. *DNA Res.* 27: 1609-1618.
- Archdeacon J., Talty J., Boesten B., Danchin A., and F. O'gara. (1995) Cloning of the second adenylate cyclase gene (*cya2*) from *Rhizobium meliloti* F34: Sequence similarity to eukaryotic cyclases. *FEMS Microbiol. Lett.* 128: 177-184.
- Arias A., Gardiol A., and Martínez-Drets, G. (1982) Transport and catabolism of D-mannose in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 151:1069-1072.
- Barzu O., and A. Danchin. (1994) Adenylyl cyclase: A heterogeneous class of ATP-utilizing enzymes. *Prog. Nucl. Acid Res. and Mol. Biol.* 49: 241-283.
- Berg O. G., and P. H. von Hippel. (1988) Selection of DNA binding sites by regulatory proteins. The binding specificity of cAMP receptor protein to recognition sites. *J. Mol. Biol.* 200: 709-723.
- Betsou F., Sismeiro O., Danchin A., and N. Guiso. (1995) Cloning and sequence of the *Bordetella bronchiseptica* adenylate cyclase hemolysin encoding gene: comparison with the *Bordetella pertussis* gene. *Gene* 162: 165-166.
- Beuve A., Boesten B., Crasnier A., Danchin A., and F. O'gara. (1990) *Rhizobium meliloti* adenylate cyclase is related to eukaryotic adenylate cyclase and guanylate cyclase. *J. Bacteriol.* 172: 2614-2621.
- Beuve A., and A. Danchin. (1992) From adenylate cyclase to guanylate cyclase mutational analysis of a change in substrate specificity. *J. Mol. Biol.* 225: 933-938.

- Bivelle F., and N. Guiso. (1985) Evidence for the presence of cAMP, cAMP protein receptor and transcription termination factor *rho* in Gram negative bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 131: 2953-2960.
- Boesten B., Kiely B., O'Reagan M., Danchin A., and F. O'Gara. (1988) Genetic analysis of an adenylate cyclase gene from *Rhizobium meliloti* F34, in Proceedings of the 7th International Congress on Nitrogen Fixation (Bothe, H., de Bruijn, F. J. and Newton, W. E., eds.) p. 554, Gustav Fischer, Stuttgart, New York.
- Bolwell G. P. (1999) Role of active oxygen species and NO in plant defense responses. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 287-294.
- Botsford J. L., and J. Harman. (1992) Cyclic AMP in Prokaryotes. *Microbiol. Rev.* 56: 100-122.
- Boyer H. W., and D. Roulland-Dussoix. (1969) A complementation analysis of restriction and modification in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41: 459-472.
- Buck J., Sinclair M., Schapal L., Cann M., and L. Levin. (1999) Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 79-84.
- Bult C. J., White O., Olsen G. J., Zhou L., Fleischmann R. D., Sutton G. G., Blake J. A., FitzGerald L. M., Clayton R. A., Gocayne J. D., Kerlavage A. R., Dougherty B. A., Tomb J. F., Adams M. D., Reich C. I., Overbeek R., Kirkness E. F., Weinstock K. G., Merrick J. M., Glodek A., Scott J. L., Geoghagen N. S., and J. C. Venter. (1996) Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science.* 273: 1058-1073.
- Catenese C., Emerich D., and V. Zahler. (1989) Adenylate cyclase and cAMP phosphodiesterase in *Bradyrhizobium japonicum* bacterioids. *J. Bacteriol.* 171: 4531-4536.
- Chandler M. S. (1992) The gene encoding the cAMP receptor protein is required for competence development in *Haemophilus influenzae* Rd. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1626-1630.
- Cole S. T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S. V., Eglmeier K., Gas S., Barry C. E., Tekala F., Badcock K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R., Devlin K., Feltwell T., Gentles S., Hamlin N., Holroyd S., Hornsby T., Jagels K., and



B. G. Barrell (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537-544.

Conti M., and S. L. Jin. (1999) The molecular biology of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Prog Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 63: 1-38.

Cossart P., and B. Gicquel-Sanzey. (1982) Cloning and sequencing of the *cya* gene of *Escherichia coli* K12. *Nucleic Acids Res.* 10: 1363-1378.

Cotta M., Whitehrad T., and M. Wheeler. (1998) Identification of a novel adenylate cyclase in the ruminal anaerobe, *Prevotella ruminicola* D3Id. *FEMS Microbiol.* 164: 257-260.

Coudart-Cavalli M., Sismeiro O., and A. Danchin. (1997). Bifunctional structure of two adenyllyl cyclases from the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *Biochimie.* 79: 757-767.

Curtis R., and M. Kelley. (1987) *Salmonella typhimurium* deletion mutants lacking adenylate cyclase and cyclic AMP receptor are avirulent and immunogenic. *Infect. Immun.* 55: 3035-3043.

Danchin A., and G. Lenzen (1988) Structure and evolution of bacterial adenylate cyclase: comparison between *Escherichia coli* and *Erwinia chrysanthemi*. *Adv. Second Messengers Phosphoproteins Res.* 12: 7-28.

Danchin A. (1993) Phylogeny of adenyllyl cyclases. *Adv. Second Messenger Phosphoproteins Res.* 27: 109-162.

Dilworth, M., McKay, D., Franklin, M., and A. Glenn. (1983) Catabolite effects on enzyme induction and substrate utilization in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 129: 359-366.

Dorocicz I., Williams M., and R. Redfield. (1993) The *Haemophilus influenzae* adenylate cyclase gene: cloning, sequence and essential role in competence. *J. Bacteriol.* 175: 7142-7149.

Dunlap V. (1989) Regulation of luminiscence by Cyclic AMP in *cya*-like and *crp*-like Mutants of *Vibrio fischeri*. *J. Bacteriol.* 171: 1199-1202.

Encarnación S., Dunn M., Willms K., and J. Mora. (1995) Fermentative and aerobic metabolism in *Rhizobium etli*. *J. Bacteriol.* 177: 3058-3066.

Escuyer V., Duflot, D., Sezer S., Danchin A., and M. Mock. (1988) Structural homology between virulence-associated bacterial adenylate cyclases. *Gene* 71: 293-298.

Fraser C. M., Casjens S., Huang W. M., Sutton G. G., Clayton R., Lathigra R., White O., Ketchum K. A., Dodson R., Hickey E. K., Gwinn M., Dougherty B., Tomb J. F., Fleischmann R. D., Richardson D., Peterson J., Kerlavage A. R., Quackenbush J., Salzberg S., Hanson M., van Vugt R., Palmer N., Adams M. D., Gocayne J., and J. C. Venter. (1997) Genomic sequence of a Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 390: 580-586.

Galagan J. E., Nusbaum C., Roy A., Endrizzi M. G., Macdonald P., FitzHugh W., Calvo S., Engels R., Smirnov S., Atnoor D., Brown A., Allen N., Naylor J., Stange-Thomann N., DeArellano K., Johnson R., Linton L., McEwan P., McKernan K., Talamas J., Tirrell A., Ye W., Zimmer A., Barber R. D., Cann I., Graham D. E., Grahame D. A., Guss A. M., Hedderich R., Ingram-Smith C., Kuettner H. C., Krzycki J. A., Leigh J. A., Li W., Liu J., Mukhopadhyay B., Reeve J. N., Smith K., Springer T. A., Umayam L. A., White O., White R. H., Conway de Macario E., Ferry J. G., Jarrell K. F., Jing H., Macario A. J., Paulsen I., Pritchett M., Sowers K. R., Swanson R. V., Zinder S. H., Lander E., Metcalf W. W., and B. Birren (2002) The genome of *M. acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity. *Genome Res.* 12: 532-542.

Galibert F., Finan T. M., Long S. R., Puhler A., Abola P., Ampe F., Barloy-Hubler F., Barnett M. J., Becker A., Boistard P., Bothe G., Boutry M., Bowser L., Buhrmester J., Cadieu E., Capela D., Chain P., Cowie A., Davis R.W., Dreano S., Federspiel N. A., Fisher R. F., Gloux S., Godrie T., Goffeau A., Golding B., Gouzy J., Gurjal M., Hernandez-Lucas I., Hong A., Huizar L., Hyman R.W., Jones T., Kahn D., Kahn M. L., Kalman S., Keating D. H., Kiss E., Komp C., Lelaure V., Masuy D., Palm C., Peck M. C., Pohl T. M., Portetelle D., Purnelle B., Ramsperger U., Surzycki R., Thebault P., Vandenbol M., Vorholter F. J., Weidner S., Wells D. H., Wong K., Yeh K. C. and J. Batut. (2001) The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* 293: 668-672.

Glaser P., Danchin A., Ladant D., Barzu O., and A. Ullmann. (1988) *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: the gene and the protein. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* 13: 239-252.

- Guerinot M., and B. Chelm. (1984) Isolation and expression of the *Bradyrhizobium japonicum* adenylate cyclase gene (*cya*) in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 159: 1068-1071.
- Guo Y. L., Seebacher T., Kurz U., Linder J. U., and J. E. Schultz. (2001) Adenylyl cyclase Rv1625c of *Mycobacterium tuberculosis*: a progenitor of mammalian adenylyl cyclases. EMBO J. 20: 3667-3675.
- Hamilton R., Archberger E., and E. Kolenbrander. (1977) Control of morphogenesis in *Arthrobacter crystallopoietes* effect of cyclic 3'5'-AMP. J. Bacteriol. 129: 874-879.
- Hamilton R., and E. Kolenbrander. (1978) Regulation of cyclic 3'5'-AMP in *Arthrobacter crystallopoietes* and a morphogenic mutant. J. Bacteriol. 134: 1064-1073.
- Hanahan, D. (1983) Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-560.
- Hanski E., and Z. Forfel. (1985) *Bordetella pertussis* invasive adenylate cyclase: partial resolution and properties of cellular penetration. J. Biol. Chem. 260: 5526-5532.
- Hengge-Aronis R. (1993) Survival of Hunger and Stress: The role of *rpoS* in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. Cell 72: 165-168.
- Holtje J., and N. Nanninga. (1984) The intracellular concentration of cyclic adenosin 3',5'-monophosphate is constant throughout the cell cycle of *Escherichia coli*. FEMS. Microbiol. Lett. 22: 189-192.
- Hughes P., Landoulsi A., and M. Kohiyama. (1988) A novel role for cAMP in the control of the activity of the *E. coli* chromosome replication initiator protein, DnaA. Cell 55: 343-350.
- Hurley J. (1999) Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase. J. Biol. Chem. 274: 7599-7602.
- Ichikawa T., Suzuki Y., Czaja I., Schommer C., Lessnick A., Schell J., and R. Walden. (1997) Identification and role of adenylyl cyclase in auxin signalling in higher plants. Nature 390: 698-701.

Ichikawa T., Suzuki Y., Czaja I., Schommer C., Lessnick A., Schell J., and R. Walden. Retraction of Publication: Identification and role of adenylyl cyclase in auxin signalling in higher plants. *Nature* (1997) 390: 698-701. *Nature* (1998) 396: 390.

Jones B. L., Agarwal A. K., and D. L. Keister. (1985) Inhibition of growth of *Rhizobium japonicum* by cyclic GMP. *J. Bacteriol.* 164: 757-761.

Kaneko T., Nakamura Y., Sato S., Asamizu E., Kato T., Sasamoto S., Watanabe A., Idesawa K., Ishikawa A., Kawashima K., Kimura T., Kishida Y., Kiyokawa C., Kohara M., Matsumoto M., Matsuno A., Mochizuki Y., Nakayama S., Nakazaki N., Shimpo S., Sugimoto M., Takeuchi C., Yamada M., and S. Tabata. (2000) Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* 7: 331-338.

Kasahara M., Yashiro K., Sakamoto T., and M. Ohmori. (1997) The *Spirulina platensis* adenylate cyclase gene, *cyaC*, encodes a novel signal transduction protein. *Plant Cell Physiol.* 38: 828-836.

Kasahara M., and M. Ohmori. (1999) Activation of a Cyanobacterial Adenylate Cyclase, CyaC, by autophosphorylation and a subsequent phosphotransfer reaction. *J. Biol. Chem.* 274: 15167-15172.

Kasahara M., Unno T., Yashiro K., and M. Ohmori. (2001) CyaG, a novel cyanobacterial adenylyl cyclase and a possible ancestor of mammalian guanylyl cyclases. *J. Biol. Chem.* 276: 10564-10569.

Kawarabayasi Y., Sawada M., Horikawa H., Haikawa Y., Hino Y., Yamamoto S., Sekine M., Baba S., Kosugi H., Hosoyama A., Nagai Y., Sakai M., Ogura K., Otsuka R., Nakazawa H., Takamiya M., Ohfuku Y., Funahashi T., Tanaka T., Kudoh Y., Yamazaki J., Kushida N., Oguchi A., Aoki K., and H. Kikuchi. (1998) Complete sequence and gene organization of the genome of a hyper-thermophilic archaebacterium, *Pyrococcus horikoshii* OT3. *DNA Res.* 5: 147-155.

Kawarabayasi Y., Hino Y., Horikawa H., Yamazaki S., Haikawa Y., Jin-no K., Takahashi M., Sekine M., Baba S., Ankaï A., Kosugi H., Hosoyama A., Fukui S., Nagai Y., Nishijima K., Nakazawa H., Takamiya M., Masuda S., Funahashi T., Tanaka T., Kudoh Y., Yamazaki J., Kushida N., Oguchi A., Aoki K., Kubota K., Nakamura Y., Nomura N., Sako Y., and H. Kikuchi. (1999) Complete genome sequence of an aerobic hyper-thermophilic crenarchaeon, *Aeropyrum pernix* K1. *DNA Res.* 6: 83-101.

Kawarabayasi Y., Hino Y., Horikawa H., Jin-no K., Takahashi M., Sekine M., Baba S., Ankaï A., Kosugi H., Hosoyama A., Fukui S., Nagai Y., Nishijima K., Otsuka R., Nakazawa H., Takamiya M., Kato Y., Yoshizawa T., Tanaka T., Kudoh Y., Yamazaki J., Kushida N., Oguchi A., Aoki K., Masuda S., Yanagii M., Nishimura M., Yamagishi A., Oshima T., and H. Kikuchi. (2001) Complete genome sequence of an aerobic thermoacidophilic crenarchaeon, *Sulfolobus tokodaii* strain 7. DNA Res. 8:123-140.

Kiely B., and F. O'Gara. (1983) Cyclic 3'5'-adenosin monophosphate synthesis in *Rhizobium*: identification of a cloned sequence from *Rhizobium meliloti* coding for adenylyl cyclase. Mol. Gen. Genet. 192: 230-234.

Klenk H. P., Clayton R. A., Tomb J. F., White O., Nelson K. E., Ketchum K. A., Dodson R. J., Gwinn M., Hickey E. K., Peterson J. D., Richardson D. L., Kerlavage A. R., Graham D. E., Kyrpides N. C., Fleischmann R. D., Quackenbush J., Lee N. H., Sutton G. G., Gill S., Kirkness E. F., Dougherty B. A., McKenney K., Adams M. D., Loftus B., and J. C. Venter. (1997) The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. Nature 390: 364-370.

Kokotek W., and W. Lotz (1989) Construction of a *lacZ*-Kanamycin-resistance cassette useful for site-directed mutagenesis and as a promoter probe. Gene 84: 467-471.

Kolb A., Busby S., Buc H., Garges S., and S. Adhya. (1993) Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. Annu. Rev. Biochem. 62: 749-795.

Kumar S., Agarwal K., and S. Zalela. (1981) Regulation of envelope-growth in *Escherichia coli*. Horizontal envelope growth by a process under cAMP control. Indian J. Exp. Biol. 19: 640-642.

Kutsukake K., Ohya Y., and T. Lino. (1990) Transcriptional analysis of flagellar region of *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 172: 741-747.

Kypr J., and J. Mrazek. (1985) Possible mechanism of the allosteric activation of cAMP receptor protein. Biochem. Biophys. Res. Commun. 131: 780-785.

Lepla S. H. (1982) Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylylase that increases cyclic cAMP concentration in eukaryotic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 3162-3166.

Lim S., and K. Shanmugam. (1979A) Regulation of hydrogen utilization in *Rhizobium japonicum* by cyclic AMP. *Biochim. Biophys. Acta* 584: 479-492.

Lim S., Hennecke H., and D. B. Scott. (1979B) Effect of cyclic guanosin 3', 5'-monophosphate on nitrogen fixation in *Rhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 139: 256-263.

Liu Y., Ruoho A. E., Rao V. D., and J. H. Hurley. (1997) Catalytic mechanism of the adenylyl and guanylyl cyclases: modeling and mutational analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 13414-13419.

Lucas K. A., Pitari G. M., Kazerounian S., Ruiz-Stewart I., Park J., Schulz S., Chepenik K. P., and S. A. Waldman. (2000) Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol. Rev.* 52: 375-414.

Maathuis F. J., and D. Sanders. (2001) Sodium uptake in *Arabidopsis* roots is regulated by cyclic nucleotides. *Plant Physiol* 127: 1617-1625.

Magasanik B., and F. Neidhard. (1987) Regulation of carbon and nitrogen utilization. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, Neidhardt, F. (ed). Washington, D. C.: American Society for Microbiology, pp. 1318-1325.

Mandal, N., and P. Chakrabarty. (1993A) Succinate mediated catabolite repression of enzymes of glucose metabolism in root nodule bacteria. *Current Microbiol.* 26: 247-251.

Mandal, N., and P. Chakrabarty. (1993B) Regulation of enzymes of glyoxylate pathway in root nodule bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 38: 417-427.

Manian S., Gumbleton R., and F. O'Gara. (1982) The role of formate metabolism in nitrogen fixation in *Rhizobium* spp. *Arch. Microbiol.* 133: 312-317.

Martínez E., Pardo A. M., Palacios R., and M. A. Cevallos. (1985) Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *J. Gen. Microbiol.* 131:1779-1786.

- McKay D., Weber I., and T. Steitz. (1982) Structure of catabolite gene activator protein at 2.9 Å resolution: incorporation of amino acid sequence and interactions with cAMP. *J. Biol. Chem.* 257: 9518-9524.
- McGetrick A., Goulding C., Sudaram S., and F. O'Gara. (1985) Catabolite repression and role of cyclic AMP in CO<sub>2</sub> fixation and H<sub>2</sub> metabolism in *Rhizobium* spp. *J. Bacteriol.* 163: 1282-1284.
- Mock M., Crasnier M., Duflot E., Dumay V., and A. Danchin. (1991) Structural and functional relationships between *Pasteurella multocida* and enterobacterial adenylate cyclases. *J. Bacteriol.* 173: 6265-6269.
- Mongkolsuk S., Praituan W., Loprasert S., Fuangthong M., and S. Chamnongpol. (1998) Identification and characterization of a new organic hydroperoxide resistance (*ohr*) gene with a novel pattern of oxidative stress regulation from *Xanthomonas campestris* pv. phaseoli. *J. Bacteriol.* 180: 2636-2643.
- Mora J., Encarnación S., Salgado M., Mora Y., Mendoza A., and A. Leija. (1993A) Carbon and Nitrogen Metabolism in *Rhizobium*. In R. Palacios, J. Mora, and W. E. Newton (ed.) *New horizons in nitrogen fixation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Mora J., Encarnación S., Calderón J., Gelbard A. S., and A. Cooper. (1993B) Glutamine cycling and the utilization of carbon by different species of *Rhizobium*. In R. Palacios, J. Mora, and W. E. Newton (ed.) *New horizons in nitrogen fixation*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Moutinho A., Hussey P. J., Trewavas A. J., and R. Malho. (2001) cAMP acts as a second messenger in pollen tube growth and reorientation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:10481-10486.
- Murray P., and R. Uffen. (1988) Influence of cAMP on the growth response and anaerobic metabolism in *Rhodocyclus gelatinosus*. *Arch. Microbiol.* 149: 312-316.
- Neidhardt F., Ingraham J., and M. Schaechter. (1990) Regulation of gene expression: Multigene Systems and Global Regulation. In: *Physiology of the Bacterial cell*, (ed) SINAUER, pp. 351-385.

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

Nolling J., Breton G., Omelchenko M. V., Makarova K. S., Zeng Q., Gibson R., Lee H. M., Dubois J., Qiu D., Hitti J., Wolf Y. I., Tatusov R. L., Sabathe F., Doucette-Stamm L., Soucaille P., Daly M. J., Bennett G. N., Koonin E. V., and D. R. Smith. (2001) Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. J. Bacteriol. 183:4823-4838.

Ochoa de Alda J. A., Ajlani G., and J. Houmard. (2000). *Synechocystis* strain PCC 6803 *cya2*, a prokaryotic gene that encodes a guanylyl cyclase. J. Bacteriol. 182: 3839-3842.

Ohmori M., Ohmori, K., and K. Hasunuma. (1988) Rapid change in cyclic 3'5'-AMP concentration triggered by a light-off or light-on signal in cyanobacteria. Arch. Microbiol. 150: 203-204.

Ohmori K., Hirose M., and M. Ohmori. (1993) An increase in the intracellular concentration of cAMP triggers formation of an algal mat by the cyanobacteria *Spirulina platensis*. Plant Cell Physiol. 34: 169-171.

O'Regan M., Kiely B., and F. O'Gara. (1989) Expression of the adenyl cyclase encoding gene *cya* of *Rhizobium meliloti* F43: existence of two *cya* genes? Gene 83: 243-249.

Parkhill J., Wren B. W., Thomson N. R., Titball R. W., Holden M. T., Prentice M. B., Sebahia M., James K. D., Churcher C., Mungall K. L., Baker S., Basham D., Bentley S. D., Brooks K., Cerdeno-Tarraga A. M., Chillingworth T., Cronin A., Davies R. M., Davis P., Dougan G., Feltwell T., Hamlin N., Holroyd S., Jagels K., Karlyshev A. V., Leather S., Moule S., Oyston P. C., Quail M., Rutherford K., Simmonds M., Skelton J., Stevens K., Whitehead S., and B. G. Barrell. (2001) Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. Nature 413: 523-527.

Peterkofsky A., Retzer A., Retzer J., Gollop N., and N. Amin. (1993) Bacterial Adenylyl Cyclases. Prog. Nuc. Ac. Res. Mol. Biol. 44: 31-65.



- Pitt G. S., Milona N., Borleis J., Lin K. C., Reed R. R., and P. N. Devreotes (1992) Structurally distinct and stage-specific adenyl cyclase genes play different roles in *Dictyostelium* development. *Cell* 169: 305-315.
- Robb F. T., Maeder D. L., Brown J. R., DiRuggiero J., Stump M. D., Yeh R. K., Weiss R. B., and D. M. Dunn. (2001) Genomic sequence of hyperthermophile, *Pyrococcus furiosus*: implications for physiology and enzymology. *Methods Enzymol.* 330: 134-157.
- Roy A., and A. Danchin. (1982) The *cya* locus of *Escherichia coli* K12 organization and gene products. *Mol. Gen. Genet.* 188: 465-471.
- Russell L., and H. Yamazaki. (1978) The dependence of *Escherichia coli* asparaginase II on cyclic AMP and CRP. *Can. J. Microbiol.* 24: 629-631.
- Saier M. H., jr. (1989) Protein phosphorylation and allosteric control of inducer exclusion and catabolite repression by the bacteria phosphoenol pyruvate: sugar phosphotransferase system. *Microbiol. Rev.* 53: 109-111.
- Salanoubat M., Genin S., Artiguenave F., Guzy J., Mangenot S., Ariat M., Billault A., Brottier P., Camus J. C., Cattolico L., Chandler M., Choisine N., Claudel-Renard C., Cunnac S., Demange N., Gaspin C., Lavie M., Moisan A., Robert C., Saurin W., Schiex T., Siguier P., Thebault P., Whalen M., Wincker P., Levy M., Weissenbach J., and C. A. Boucher. (2002) Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* 415: 497-502.
- Schultz E., Latter G., and A. Matin. (1988) Differential Regulation by Cyclic AMP of Starvation Protein Synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170: 3903-3909.
- Schultz S., Shields G., and T. Steitz. (1990) Crystallization of *E. coli* catabolite gene activator protein with its DNA binding site. *J. Mol. Biol.* 213: 159-166.
- Segovia L., Young J., and E. Martínez-Romero. (1993) Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:374-377.

Selbitschka W., Niemann S., and A. Pühler. (1993) Construction of the gene replacement vectors for gram negative bacteria using a genetically modified *sacRB* gene as a positive selection marker. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38: 615-618.

Sharypova L., Yurgel S., Keller M., Simarov B., Pühler A., and A. Becker. (1999) The *eff-482* locus of *Sinorhizobium meliloti* CXM1-105 that influences symbiotic effectiveness consists of three genes encoding an endoglycanase, a transcriptional regulator and an adenylate cyclase. *Mol. Gen. Genet.* 261: 1032-1044.

She Q., Singh R. K., Confalonieri F., Zivanovic Y., Allard G., Awayez M. J., Chan-Weiher C. C., Clausen I. G., Curtis B. A., De Moors A., Erauso G., Fletcher C., Gordon P. M., Heikamp-de Jong I., Jeffries A. C., Kozera C. J., Medina N., Peng X., Thi-Ngoc H. P., Redder P., Schenk M. E., Theriault C., Tolstrup N., Charlebois R. L., Doolittle W. F., Duguet M., Gaasterland T., Garrett R. A., Ragan M. A., Sensen C. W., and J. Van der Oost. (2001) The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 7835-7840.

Shimizu T., Ohtani K., Hirakawa H., Ohshima K., Yamashita A., Shiba T., Ogasawara N., Hattori M., Kuhara S. and H. Hayashi. (2002) Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 996-1001.

Siegele D., and R. Kolter. (1992) Life After Log. *J. Bacteriol.* 174: 345-348.

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

Sisimeiro O., Trotot P., Biville F., Vivares C., and A. Danchin. (1998) *Aeromonas hydrophila* Adenyl Cyclase 2: New Class of Adenyl Cyclase with thermophilic properties and Sequence similarities to proteins from Hyperthermophilic Archoebacteria. *J. Bacteriol.* 180: 3339- 3344.

Slesarev A. I., Mezhevaya K. V., Makarova K. S., Polushin N. N., Shcherbinina O. V., Shakhova V. V., Belova G. I., Aravind L., Natale D. A., Rogozin I. B., Tatusov R. L., Wolf Y. I., Stetter K. O., Malykh A. G., Koonin E. V., and S. A. Kozyavkin. (2002) The complete genome of hyperthermophile *Methanopyrus kandleri* AV19 and monophyly of archaeal methanogens *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 4644-4649.

Smith D. R., Doucette-Stamm L. A., Deloughery C., Lee H., Dubois J., Aldredge T., Bashirzadeh R., Blakely D., Cook R., Gilbert K., Harrison D., Hoang L., Keagle P., Lum W., Pothier B., Qiu D., Spadafora R., Vicaire R., Wang Y., Wierzbowski J., Gibson R., Jiwani N., Caruso A., Bush D., and J. N. Reeve. (1997) Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* delta H: functional analysis and comparative genomics. *J. Bacteriol.* 179: 7135-7155.

Smith G., and J. Ownby. (1981) cAMP interferes with pattern formation in the cyanobacteria *Anabaena viridabilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 11: 175-180.

Steitz T., Ohlendorf D., McKay D., Anderson W., and W. Mathews. (1982) Structural similarity in the DNA binding domains of catabolite gene activator and Cro repressor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 3097-3100.

Stover C. K., Pham X. Q., Erwin A. L., Mizoguchi S. D., Warrenner P., Hickey M. J., Brinkman F. S., Hufnagle W. O., Kowalik D. J., Lagrou M., Garber R. L., Goltry L., Tolentino E., Westbrook-Wadman S., Yuan Y., Brody L. L., Coulter S. N., Folger K. R., Kas A., Larbig K., Lim R., Smith K., Spencer D., Wong G. K., Wu Z., Paulsen I. T., Reizer J., Saier M. H., Hancock R. E., Lory S., and M. V. Olson. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* 406: 959-964.

Stowers M., and H. Elkan. (1985) Regulation of hexose catabolism in *Rhizobium sp.* 32H1. *FEMS Microbiol. Lett.* 26: 45-48.

Sukchawalit R., Loprasert S., Atichartpongkul S., and S. Mongkolsuk. (2001) Complex regulation of the organic hydroperoxide resistance gene (*ohr*) from *Xanthomonas* involves OhrR, a novel organic peroxide-inducible negative regulator, and posttranscriptional modifications. *J. Bacteriol.* 183: 4405-4412.

Sunahara R. K., Beuve A., Tesmer J. J., Sprang S. R., Garbers D. L., and A. G. Gilman (1998) Exchange of substrate and inhibitor specificities between adenylyl and guanylyl cyclases. *J. Biol. Chem.* 273:16332-16338.

Tang W. J., and A. G. Gilman. (1995) Construction of a soluble adenylyl cyclase activated by Gs alpha and forskolin. *Science.* 268:1769-1772.

- Tesmer J. J., Sunahara R., Gilman A. G., and S. R. Sprang. (1997) Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in complex with  $G_{\alpha}GTP\gamma S$ . *Science* 278: 1907-1916.
- Tippett M., and D. Robertson. (1988) Molecular cloning and expression of the *Bacillus anthracis* edema factor toxin gene: a calmodulin-dependent adenylyl cyclase. *J. Bacteriol.* 70: 2663-2666.
- Trotot P., Sismeiro O., Vivares C., Glaser P., Bresson-Roy A., and A. Danchin. (1996) Comparative analysis of the *cya* locus in enterobacteria and related Gram negative facultative anaerobes. *Biochimie* 78: 277-287.
- Tucker C. L., Hurley J. H., Miller T. R., and J. B. Hurley. (1998) Two amino acid substitutions convert a guanylyl cyclase, RetGC-1, into an adenylyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 5993-5997.
- Ucker D., and E. Singer. (1978) Catabolite repression like phenomenon in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 126: 1197-1200.
- Uden G., and J. Guest. (1984) Cyclic AMP and anaerobic gene expression in *E. coli*. *FEBS Lett.* 170: 321-325.
- Upchurch R., and G. Elkan. (1978) The role of ammonia, L-glutamate, and cAMP in the regulation of ammonia assimilation in *Rhizobium japonicum*. *Biochem. Biophys. Acta* 538: 244-249.
- Van S., Virdy K. J., Pitt G. S., Meima M., Sands T. W., Devreotes P. N., Cotter D. A., and P. Schaap (1996) Adenylyl cyclase G, an osmosensor controlling germination of *Dictyostelium* spores. *J. Biol. Chem.* 271: 23623-23625.
- Wang Y. P., Kolb A., Buck M., Wen J., O'Gara, F., and H. Buc. (1993) CRP interacts with promoter-bound  $\sigma 54$  RNA polymerase and blocks transcriptional activation of the *dctA* promoter. *EMBO J.* 17: 86-96.
- Weber I., Tokio K., Titani K., and T. Steitz. (1987) Structure of a complex of catabolite gene activator protein and cyclic AMP refined at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 198: 311-327.

Weiss A., and E. Hewlett. (1986) Virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Annu. Rev. Microbiol.* 40: 661-668.

Wood D., Neubauer G., and F. Stutzenberger. (1984) Cyclic AMP levels during induction and repression of cellulose biosynthesis in *Thermomonospora curvata*. *J. Bacteriol.* 160: 1047-1054.

Wood D.W., Setubal J. C., Kaul R., Monks D., Chen L., Wood G.E., Chen Y., Woo L., Kitajima J. P., Okura V. K., Almeida Jr. N. F., Zhou Y., Bovee Sr. D., Chapman P., Clendenning J., Deatherage G., Gillet W., Grant C., Guenther D., Kutayavin T., Levy R., Li M., McClelland E., Palmieri A., Raymond C., Rouse G., Saenphimmachak C., Wu Z., Gordon D., Eisen J. A., Paulsen I., Karp P., Romero P., Zhang S., Yoo H., Tao Y., Biddle P., Jung M., Krespan W., Perry M., Gordon-Kamm B., Liao L., Kim S., Hendrick C., Zhao Z., Dolan M., Tingey S. V., Tomb J., Gordon M. P., Olson M. V., and E. W. Nester. (2001) The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 294: 2317-2323.

Yahr T., Vallis A., Hancock M., Barbier J., and D. Frank. (1998) ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 13899-13904.

Yashiro K., Sakamoto T., and M. Ohmori. (1996) Molecular characterization of an adenylate cyclase gene of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Plant. Mol. Biol.* 31: 175-181.

Yoshimura H., Hisabori T., Yanagisawa S., and M. Ohmori. (2000) Identification and characterization of a novel cAMP receptor protein in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* 275: 6241-6245.

Zhang G., Liu Y., Ruoho A., and J. Hurley. (1997) Structure of the adenylyl cyclases catalytic core. *Nature* 386: 247-253.