



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

CARACTERIZACIÓN DE LA MUTANTE LM13 DE *Rhizobium etli*

Primer mutante nula de S-adenosilhomocisteinasa
en las Rhizobiaceas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA BÁSICA

PRESENTA:

DANIEL BARRÓN PASTOR

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. SOCORRO DURÁN VARGAS

MEXICO, D. F

2004



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

CARACTERIZACIÓN DE LA MUTANTE LM13 DE *Rhizobium etli*.

Primer mutante nula de S-adenosilhomocisteinasa en las Rhizobiaceas

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA
PRESENTA: DANIEL BARRÓN PASTOR
DIRECTOR DE TESIS: SOCORRO DURÁN VARGAS

MÉXICO D.F. Agosto de 2004

AGRADECIMIENTOS

Al camino donde encuentro, vivo y, en ocasiones, desespero,
Al Conocimiento que nos encuentra y que nos invita a luchar por él.

A mi maestro, Jorge Calderón, *in memoriam*
A Arturo Calderón con mi admiración y respeto
A la UNAM por el oportuno tiempo que me tocó vivir abrigado entre sus alas.

A Mis padres y hermanos por su apoyo en cada paso y proyecto de mi vida
A Juancho y Ulises por su apoyo al compartir el camino
A Lourdes por introducirme en la lectura y la congruencia académica
A Carlos porque aprendimos a ser amigos desde el inicio y al volver.

A las mujeres que quise y quiero
A Carol por impulsarme a incursionar en nuevos cielos
A Paola por la oportunidad de encontrarnos en las dudas, en los festejos y en el diario.

A la familia que me tocó: Papá Carlos, Mámá Chata, Papaíto; las tías Ana, Rosita, Rachi, Cuca, Esther; a mis tíos: Agustín, Chuy, Víctor, Miguel, Beto, Pablo, Coco; a mis primos: Beto, Diana, Pin, Adi, Miguel, Jorge, Luis, Lili, Angel, Mimí... a la Kuma y a todos los que son y me enseñaron a ser parte del clan.

A la Familia que escogí: Alvaro, Raúl, Hawk, Roberto, Quique y Rafael; a Paola, Doña Rosa y el clan Nuñez; a Berenardo, Naún, Cache y Hans; a Vero, Susy, el super, Ivan y el Loco; a Lilian, Leslie, Mariana, Pili...

A la familia de Biomédicas: Arturo, Alejandro, Gisela, Socorro, Clelia, Yuriria, Naima, Saúl, Sergio, Emilio, Lupita, Fabiola, Tatiana, Alexandra, Paco, Luis, Alfonso, Roberto, Paula, el cuervo, el memín, el güero, Salomón, Jaime, Lloret, el Hermano Sol... y a todos los que conviví 6 años de trabajos, aprendizajes y festejos.

A mis maestros: Jorge Calderón, Lino Díaz de León, Luis González Souza, Irma Villalpando, Laura Camarena, Carmen Gómez, Jorge Membrillo, Julieta Rubio, Yankelevich, y Bastarrachea.

A la banda del CIU: Rata, Marcela, Cecilia, Durini, Adolfo, Ana, Mendez Silva, Tania, Arturo, Daniel, Poncho, Gerry, Ceceña y a todos los amigos que defendimos a la UNAM sin más interés que el defender el hogar que pertenece a nuestro pueblo.

A los indígenas y mestizos que me enseñaron a vivir en la práctica de la Dignidad y a luchar para que el futuro, que es nuestro, sea de la mejor manera.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Resumen | 1 |
| Aclaración | 2 |
| Introducción | 3 |
| El Ciclo del nitrógeno | 3 |
| Rhizobiaceas | 6 |
| <i>Rhizobium etli</i> | 6 |
| Simbiosis <i>Rhizobiacea</i> -leguminosa | 7 |
| Quimiotaxis | 7 |
| Nodulación | 10 |
| Metabolismo en simbiosis | 10 |
| Fijación de nitrógeno | 13 |
| | |
| Resultados | |
| Hipótesis | 15 |
| Objetivos | 15 |
| Obtención de las cepas | 16 |
| Determinación del Fenotipo | 16 |
| Fenotipo en vida libre | 16 |
| Fenotipo en simbiosis | 19 |
| En busca de la mutación | 20 |
| Bioquímica | |
| El ciclo de la glutamina y el glutamato | 20 |
| Metabolismo de alanina en la cepa LM13 | 22 |
| Metabolismo de glutamina en la cepa LM13 .. | 23 |
| Determinación de las pozas de aminoácidos | 25 |
| Biología Molecular | |
| En busca del gen | 27 |
| Secuencia de <i>sahH</i> de <i>R. etli</i> | 28 |
| Comparación de secuencias de <i>sahH</i> de las Rhizobiaceas | 30 |
| Comparación de secuencias de <i>sahH</i> de diferentes reinos contra la de <i>R. etli</i> | 33 |
| La S-adenosilhomocisteinasa | 34 |
| Actividad específica de S-adenosilhomocisteinasa . | 36 |

| | |
|---|----|
| El ciclo de la metionina | 36 |
| Homocisteína | 38 |
| Metiltetrahidrofolato | 38 |
| Metionina | 39 |
| S-adenosilmetionina (SAM) | 39 |
| Metilación | 40 |
| Discusión | |
| SahH es una proteína altamente conservada | 42 |
| <i>sahH</i> no es un gen esencial en <i>R. etli</i> en vida libre | 42 |
| <i>sahH</i> es un gen esencial para la simbiosis de <i>R. etli</i> con <i>Phaseolus vulgaris</i> | 42 |
| La mutación de <i>sahH</i> produce cambios en el metabolismo celular | 43 |
| A) Efectos en el ciclo de la metionina..... | 43 |
| B) Efectos en el catabolismo de glutamato, glutamina y alanina | 44 |
| C) Efectos en el ciclo de los ácidos tricarbónicos ... | 46 |
| D) Efectos en la transmetilación | 48 |
| Conclusiones | 50 |
| Perspectivas de Investigación | 51 |
| Material y métodos | 52 |
| Notas bibliográficas | 69 |

Caracterización de la mutante LM13 de *Rhizobium etli*.

Primer mutante nula de S-adenosilhomocisteinasa en las Rhizobiaceas

RESUMEN:

Du Pont y Calderon aislaron en 1994 una cepa de *R. etli*, denominada LM13. Esta cepa tiene insertado un transposón Tn5-*mob* y fue seleccionada por su incapacidad de crecer en glutamina como fuente de carbono y nitrógeno. En el presente trabajo se presenta la caracterización de esta cepa, la identidad del gen mutado por el Tn5, la secuencia nucleotídica y se discute el rol que puede tener en *R. etli*.

Nuestros resultados muestran que, en vida libre, la cepa LM13 no puede crecer en glutamina, glutamato y disminuye su crecimiento en alanina, cuando se usan como única fuente de carbono y nitrógeno; este defecto se revierte cuando se añade una fuente de carbono alterna como succinato o glucosa. También se encontró que la actividad enzimática de la cepa LM13 es similar a la silvestre en las GS's I y II, glutaminasas A y B, y ADH biosintética en diferentes condiciones. La actividad de ADH catabólica no se encontró en la LM13, mientras que en la cepa silvestre es muy pequeña, lo que no explica la incapacidad de usar gln, glu y ala como únicas fuentes de carbono y nitrógeno.

El comportamiento simbiótico de LM13 presenta sólo un 5% de nodulación y no fija nitrógeno comparándola con la cepa silvestre CE3.

El Tn5-*mob* de la cepa LM13 se encuentra insertado en el gen *sahH* que codifica para la proteína S-adenosilhomocisteinasa. Esta proteína hidroliza reversiblemente la S-adenosilhomocisteína (SAH) teniendo como productos a la adenosina y la homocisteína. SAH es producto de la transferencia de un grupo metilo de la S-Adenosilmetionina (SAM) a una variedad de moléculasceptoras específicas, incluyendo residuos sintetizados *de novo* de DNA, RNA, carbohidratos, lípidos; así como a ciertos aminoácidos dentro de las proteínas y otras moléculas pequeñas. SAH también es un inhibidor potente de las metiltransferasas por lo que participa activamente como modulador negativo de la metilación. Se discute el rol del gen *sahH*, la S-Adenosilhomocisteinasa y los metabolitos del ciclo de la metionina en *Rhizobium etli*.

ACLARACIÓN

Los trabajos de la investigación que titulamos como la “Caracterización de la mutante LM13 de *Rhizobium etli*, primer mutante nula de S-adenosilhomocisteinasa en las Rhizobiaceas”, se realizaron en el periodo comprendido entre 1999 y 2000; circunstancias experimentales y personales hacen que se presente hasta el año de 2004 como trabajo terminado. Este trabajo de investigación se realizó de lo general a lo particular, y el texto conserva esta metodología. Sin embargo, el texto se ha diseñado y trabajado para que sea un texto de divulgación de la ciencia entre científicos.

En una primera parte, la introducción, nos abocamos a presentar el plano general en el que participan las Rhizobiaceas en la ecología terrestre, la química de los suelos, la fijación de nitrógeno presentamos a *Rhizobium etli* por sus características genéticas y metabólicas más generales que lo hacen especial.

En una segunda parte iniciamos la presentación de los resultados del trabajo experimental. En esta sección vamos combinando la percepción de las estrategias experimentales con los resultados y las teorías en las que se van apoyando las decisiones y los trabajos. Sé que no es una forma ortodoxa de presentar los resultados, decidí trabajar de ésta forma para dejar ver las virtudes y los problemas metodológicos, experimentales y teóricos, que se nos fueron presentando. Cabe aclarar que al iniciar y durante buena parte de la experiencia de la investigación científica, uno va a tientas. Uno busca la forma de preguntarle al objeto de estudio, ¿Qué te pasa?; y sólo recibe algunos signos como respuesta, que al principio resultan incomprensibles. Es por ello que dejaré ver lo que creo que sirve y lo que no sirvió, mis dudas y porqué seguí de ésta o de aquella manera; creo que así puede ser mucho más fácil que podamos compartir el proceso de conocer a *Rhizobium etli* LM13.

En la tercera parte, ya sabemos donde se ubicó la mutación de LM13 en el genoma de *R. etli*, podemos empezar a regresar de esa mutación en particular a los mecanismos que la rodean, las características de los metabolitos y porqué resultan importantes; es decir volvemos de lo particular a lo general. Para que una vez que podamos observar la importancia de este gen y el metabolismo en el que participa en los seres vivos, podamos regresar a proponer que tiene la mutante LM13. Para terminar, se enuncian las conclusiones puntuales de la investigación, y por protocolo, se anexan las metodologías y técnicas utilizadas para la experimentación. La bibliografía utilizada se enumera al final y realmente, si te interesó alguna parte o tema, hay textos que ofrecen la posibilidad de entender mejor los procesos biológicos y el desarrollo de la ciencia.

Espero este texto te sea útil en lo que ahora estés haciendo.

INTRODUCCIÓN

El nitrógeno es uno de los elementos fundamentales en los seres vivos, forma parte de gran variedad de biomoléculas como el DNA, RNA, proteínas, aminoácidos, entre otros compuestos necesarios para la vida. Se encuentra en grandes cantidades en los seres vivos, solamente superado por el carbono, el hidrógeno y el oxígeno.¹

El nitrógeno molecular (N_2) se encuentra principalmente en la atmósfera donde es el componente más abundante con un 78% del total, es inerte desde el punto de vista químico y no puede ser utilizado por la mayoría de los seres vivos. En la corteza terrestre el nitrógeno es el 17º elemento más abundante y se encuentra principalmente en forma de sales como nitratos (NO_3^-) y nitritos (NO_2^-). Estas sales por su gran solubilidad tienden a descender rápidamente a los estratos profundos de la corteza terrestre donde difícilmente pueden ser aprovechados por los seres vivos.² Por ello el hombre, para aumentar la producción de alimentos en las tierras cultivables, necesitó incrementar la concentración de nitrógeno en formas asimilables para las plantas de importancia económica, e inventó los fertilizantes nitrogenados.

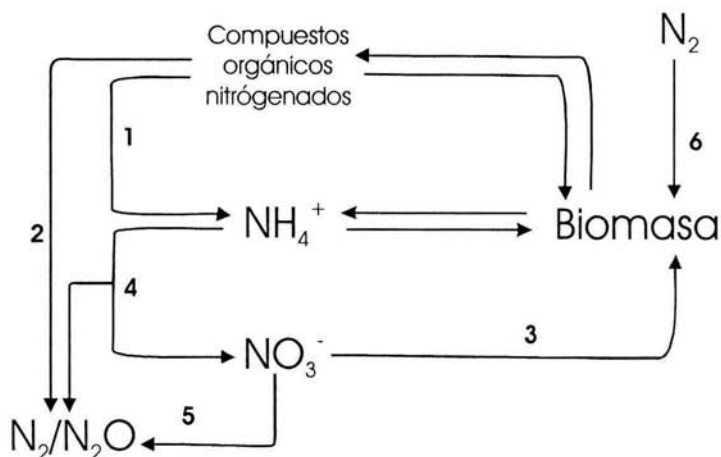
La producción industrial de fertilizantes se realiza por el método Haber-Bosch que reduce el nitrógeno atmosférico en amonio. Este método requiere altas temperaturas y varias atmósferas de presión para que sea eficiente, lo que significa un alto costo económico y energético. Además, parte de los fertilizantes nitrogenados son oxidados a nitratos (que se pierden por desnitrificación, volatilización o lixiviación), y en exceso pueden llegar a contaminar la tierra, los lagos, y los mares, induciendo un altísimo costo ecológico.³

El Ciclo del nitrógeno

El nitrógeno como parte fundamental de la dinámica de nutrientes del planeta ha sido un foco de atención para la Química y la Biología. Se ha establecido que sigue un ciclo bioquímico que se ha dividido en: Amonificación y mineralización, Inmovilización o asimilación, Nitrificación, Desnitrificación y Fijación de nitrógeno (Figura1).^{4,5}

1. **Amonificación y mineralización:** La amonificación se lleva a cabo por la descomposición de compuestos orgánicos liberando amonio, mientras que la mineralización libera CO_2 de los materiales carbonados, lo que implica la conversión de nitrógeno orgánico en nitrógeno inorgánico, produciendo amonio y nitratos. La mineralización es llevada a cabo de forma aeróbica (suelo) o anaeróbicamente (fondo de lagos y océanos), principalmente por microorganismos heterotróficos (bacterias y hongos), lo que atrae a su vez a protozoarios que se alimentan de ellos. Al consumir a las bacterias, parte de los compuestos nitrogenados contenidos en ellas son liberados al medio donde pueden ser utilizados por algas o plantas, o pueden ser transformados a nitratos por bacterias nitrificantes.⁶

Figura1: El Ciclo del Nitrógeno



1: Amonificación; 2: Mineralización; 3: Asimilación; 4: Nitrificación;
5: Desnitrificación; 6: Fijación de nitrógeno.

- Inmovilización o asimilación:** La inmovilización es la incorporación microbiana del amonio y los nitratos en biomoléculas. La descomposición de los seres vivos y sus desechos dan origen a compuestos inorgánicos nitrogenados que pueden ser nuevamente asimilados en compuestos orgánicos, por lo que la amonificación y la mineralización se llevan a cabo simultáneamente a la asimilación, incluso la estimulan.⁴
- Nitrificación:** Es la oxidación del amonio a nitritos y nitratos. Es realizada por microorganismos denominados nitrificantes. Las bacterias nitrificantes autotróficas son de la familia *Nitrobacteraceae*, y se pueden dividir en dos grupos: las que oxidan el amonio en nitritos (del género *Nitrosomonas*), y las que oxidan nitritos en nitratos (del género *Nitrobacter*). Todas ellas pueden satisfacer sus requerimientos energéticos de la oxidación de amonio a nitritos, o de estos a nitratos. Se han encontrado microorganismos que pueden realizar estas oxidaciones en medios específicos pero su aportación al medio ambiente no es considerable.⁷
- Desnitrificación:** Es la reducción del nitrito y el nitrato liberando nitrógeno molecular y óxido nítrico. Estas acciones son realizadas por bacterias desnitrificantes de los géneros *Pseudomonas*, *Micrococcus* y *Thiobacillus* solamente en anaerobiosis, donde usan a los nitritos y nitratos como el último aceptor de electrones de la cadena respiratoria, mientras que en aerobiosis utilizan al oxígeno para esta función.⁵

5. **Fijación de nitrógeno:** Existen bacterias con la facultad de poder reducir el nitrógeno atmosférico (N_2) en amonio (NH_4^+), proceso al que se ha denominado como fijación biológica de nitrógeno. Estas bacterias convierten alrededor del 95% del nitrógeno molecular en amonio o en otras fuentes asimilables para los seres vivos, mientras que la acción de los rayos UV, descargas eléctricas o procesos industriales convierte el 5%. Las bacterias fijadoras de nitrógeno son terrestres o marinas, y pueden realizar este proceso en vida libre o en simbiosis.⁸

5.1.- **Fijación de nitrógeno marina:** Es realizada por procariotes de los dominios de las Bacterias y las Arqueas en ectosimbiosis y en endosimbiosis con una gran variedad de microorganismos eucariotes, unicelulares y multicelulares. La fijación de N_2 en los océanos se realiza en la zona Eufótica, la zona más cercana a la atmósfera, y aporta grandes cantidades de NH_4^+ que puede ser utilizado para sintetizar compuestos orgánicos o es oxidado a nitratos, lo que impacta profundamente en la fotosíntesis y la dinámica de los nutrientes del ecosistema en su conjunto. Se reconoce que la fijación de nitrógeno marina depende de la concentración de Fe, de P y de vitaminas del complejo B, lo que se ve reflejado en los nutrientes y las poblaciones que se presentan en las diversas condiciones del complejo equilibrio ecológico marino.⁹

5.2.- **Fijación de nitrógeno terrestre:** Puede ser realizada en vida libre o en simbiosis y es una actividad exclusiva de procariotes. La fijación de nitrógeno terrestre aporta gran cantidad de amonio, directamente a la tierra en los casos de las de vida libre y directamente en las raíces de las plantas en el caso de las simbióticas. El estudio de la fijación de nitrógeno terrestre está fraguado en la importancia de obtener tecnología alternativa al uso de fertilizantes en la producción agrícola.

5.2.1.- **Fijación en vida libre:** Estas bacterias tienen la capacidad de fijar nitrógeno para llenar sus requerimientos de formas asimilables de este elemento en vida libre. Estas bacterias aportan el 20% del nitrógeno fijado en los medios terrestres, y son de los géneros *Azotobacter*, *Anabaena*, *Klebsiella* y *Clostridium*, entre otros.^{2, 10}

5.2.2.- **Fijación en simbiosis:** La fijación de nitrógeno simbiótica se lleva a cabo entre plantas de la familia *Leguminosae* y bacterias de la familia *Rhizobiaceae* que establecen relaciones mutualistas. A través de esta relación se produce el 80% del nitrógeno fijado biológicamente en los medios terrestres del mundo.¹⁰ Se han clasificado aproximadamente trece mil especies de leguminosas que habitan desde el ártico hasta el trópico y comprenden desde pequeñas plantas anuales hasta grandes árboles, de las cuales doscientas tienen una gran importancia para la producción de alimentos para el hombre. Muchas de ellas establecen simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno de la familia de las Rhizobiaceas.¹¹ (Tabla1)

RHIZOBIACEAS

La familia de las Rhizobiaceas incluye a las bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Sinorhizobium*. Su clasificación toma en cuenta la especificidad del hospedero, la velocidad de crecimiento, la hibridación de DNA en un análisis con técnicas de taxonomía numérica, entre muchos datos, incluyendo el análisis de ácidos grasos y técnicas moleculares.¹²

Tabla1: Algunas interacciones simbióticas de la familia *Rhizobiacea*

| <i>Rhizobeacea</i> | Planta (género) | Planta (nombre común) |
|---|---|---------------------------------------|
| <i>Rhizobium etli</i> * | <i>Phaseolus</i> | frijol |
| <i>R. fredii</i> | <i>Glycine</i> | soya |
| <i>R. tropici</i> | <i>Phaseolus</i> <i>Leucaena</i> | frijol |
| <i>Mesorhizobium loti</i> | <i>Lotus spp.</i> | loto |
| <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> bv. <i>trifolii</i> bv. <i>phaseoli</i> | <i>Vicia</i> y <i>Pisum</i> <i>Trifolium</i> <i>Phaseolus</i> | habas y chícharos trébol frijol |
| <i>Sinorhizobium meliloti</i> | <i>Medicago</i> <i>Melilotus</i> <i>Trigonella</i> | alfalfa |
| <i>Azorhizobium caulinodans</i> | <i>Sesbania rostrata</i> ** <i>Phaseolus vulgaris</i> | sesbania frijol |
| <i>Sinorhizobium saheli</i> | <i>Acacia</i> y <i>Sesbania</i> | acacia |
| <i>Bradyrhizobium japonicum</i> | <i>Glycine</i> | soya |

* *R. etli* fue definido como especie en 1993, antes era *R. leguminosarum* Bv. *phaseoli* Tipo I

** Planta que forma nódulos en los tallos¹⁵

Rhizobium etli

Las bacterias del género *Rhizobium* son gram-negativas, aerobias, en forma de bacilos de 0.5 a 0.9 µm de ancho y de 1.2 a 3 µm de largo; se duplican en 2 a 4 horas y forman colonias entre 2 y 4 mm de diámetro en 3 a 5 días.⁸

Rhizobium etli es una bacteria fijadora de nitrógeno que puede establecer simbiosis con plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y por ello se le denominaba como *Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli* -tipo I. Sin embargo, hubo una reclasificación basada en el análisis de las secuencias del DNA ribosomal 16S que mostró que *R. leguminosarum* y

R. etli son diferentes, mientras que todas las cepas de *R. etli* tienen secuencias similares¹³. Además, *R. etli* presenta un electroferotipo de enzimas que la distingue, tiene reiterados los genes estructurales de la nitrogenasa y la organización de los genes comunes de nodulación se encuentran en dos unidades transcripcionales *nodA* y *nodBC*.¹⁴

En estudios de las poblaciones de Rhizobiaceas que establecen simbiosis efectiva con el frijol se ha propuesto que existe una relación de dependencia del nicho ecológico con el éxito de los participantes en la relación simbiótica. Esto debido a que en el continente americano predominan las bacterias de *R.etli* y se observan pocos encuentros con *R. leguminosarum* *bv. phaseoli* o con *R. tropici*,¹⁵ mientras que en Francia predomina *R. leguminosarum* *bv. phaseoli* por encima de las poblaciones de *R.etli* y *R. tropici*.¹⁶

Simbiosis Rhizobiacea-leguminosa

El establecimiento de la relación simbiótica *Rhizobiacea*-leguminosa implica mecanismos de reconocimiento y comunicación entre la planta hospedera y la bacteria. Estos procesos son en lo particular bastante complejos y para fines prácticos podemos dividirla en quimiotaxis, nodulación, intercambio metabólico y fijación de nitrógeno.

Quimiotaxis:

Cuando la planta hospedera se encuentra en condiciones de limitación de nitrógeno exuda señales (usualmente flavonoides), que generan quimiotaxis^{17,18} en las Rhizobiaceas y desencadenan procesos de comunicación entre ellos. Los flavonoides excretados por la planta se unen a la glicoproteína NodD. Se propone que esta interacción ocurre en la membrana de la bacteria aunque no ha sido demostrada. Esta proteína migra por el citoplasma y se une a las "nod boxes" del genoma, lo que facilita la unión de la RNA polimerasa a la región del promotor y la transcripción en cascada de los genes de nodulación (*nod*)¹⁹ (Tabla 2). La inducción de estos genes resultan en la producción y excreción de lipoquitooligosacáridos (factores de nodulación Nod) que inducen respuestas por parte de la planta, entre las que se encuentran la modificación de la arquitectura celular que son parte del proceso de nodulación.²⁰ (figura2)

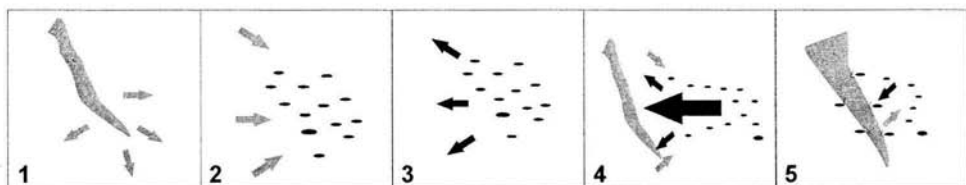


Figura 2: 1) La planta exuda flavonoides. 2) Rhizobium recibe los flavonoides (NodD). 3) las Rhizobiaceas responden excretando factores nod. 4) los Rhizobiaceas se movilizan a las raíces mientras se incrementa el intercambio de señales. 5) La planta cambia su arquitectura para poder recibir a los Rhizobiaceas.

Tabla 2: Los genes *nod*^{20, 94}

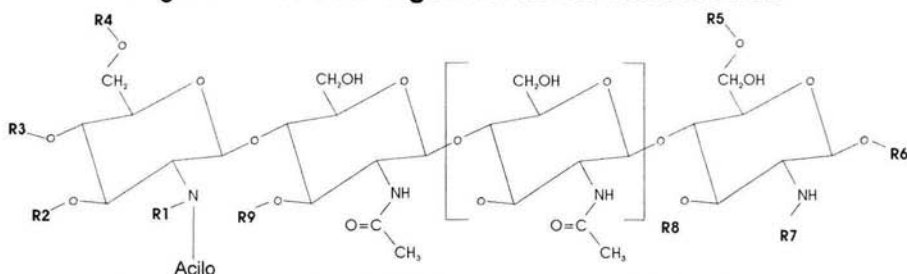
| GEN <i>nod</i> | ESPECIE | FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA |
|--|------------------------|--|
| Regulación de la expresión de los genes <i>nod</i> | | |
| <i>nodD</i> | Común | Regulador tipo-LysR |
| <i>nodV</i> | Bj | Sensor de dos componentes |
| <i>nodW</i> | Bj | Regulador de dos componentes |
| <i>noIA</i> | Bj | Regulador tipo-MerR |
| <i>noIR</i> | Sm | Regulador tipo-LysR |
| <i>syrM</i> | Sm | Regulador tipo-LysR |
| Síntesis de la estructura principal de quitooligosacárido | | |
| <i>nodM</i> | R | D-Glucosamina sintasa |
| <i>nodC</i> | Común | UDP-GlcNAc transferasa |
| <i>nodB</i> | Común | De-N-acetilasa |
| N-sustituciones en el término no reductor | | |
| <i>nodE</i> | Sm, Rlv, Rlt | Beta-ketoacil sintasa |
| <i>nodF</i> | Sm, Rlv, Rl | Proteína acarreadora de acilos |
| <i>nodA</i> | Común | N-acyltransferasa |
| <i>nodS</i> | Rn, Rt, Ac, Bj, Rf, Re | Metil transferasa de S-adenosilmetionina |
| O-sustituciones en el término no reductor | | |
| <i>nodL</i> | Sm, Rlv, Rlt, | 6-O-acetiltransferasa |
| <i>nodU</i> | Rn, Rt, Ac, Bj, Rf, Re | 6-O-carbamoiltransferasa |
| <i>nodP</i> | Sm, Rt | ATP sulfurilasa |
| <i>nodQ</i> | Sm, Rt | ATP sulfurilasa, APS kinasa |
| <i>nodH</i> | Sm, Rt | Sulfotransferasa |
| <i>nodZ</i> | Bj, Rn, Re | Fucosiltransferasa |
| <i>nodZ</i> | Ac | Glicosiltransferasa |
| <i>noIK</i> | Ac | Epimerasa de azúcares |
| <i>nodX</i> | Rlv TOM | Acetiltransferasa |
| Secreción de los factores Nod | | |
| <i>nodI</i> | Común | Proteína de unión a ATP (ATP binding) |
| <i>nodJ</i> | Común | Proteína membranal |
| <i>nodT</i> | Rlv, Rlt | Proteína de la membrana exterior |
| <i>noIFGHI</i> | Sm | Proteína membranal |

Abreviaturas: Ac: *Azorhizobium caulinodans*; Bj: *B. japonicum*; Re: *Rhizobium etli*; Rf: *R. fredii*; Rl: *R. loti*; Rlt: *R. l. bv trifoli*; Rlv: *R. leguminosarum bv viciae*; Sm: *S. meliloti*; Rn: *R. Sp NGR234*; Rt: *R. tropici*.

Los factores Nod son lipooligoquitosacáridos por los cuales se identifica la bacteria con la planta hospedera y se ha determinado que el reconocimiento de la planta a las diferentes especies de *Rhizobiaceas* se debe a que estas bacterias exhiben factores Nod con

sustituyentes similares en naturaleza y posición. (figura 3 y la tabla 3) Los factores Nod, a concentraciones pico o nanomolares, inducen en la planta la deformación de los pelos radicales en formas “espiraladas”, la expresión de nodulinas, la mitosis de la corteza de la raíz, entre otros fenómenos.²⁰

Figura 3: Estructura general de los factores nod



Los sustituyentes (R1-R9) son variable dependiendo la especie y la cepa de la Rhizobaceae. En ausencia de algún sustituyente el grupo R mantiene un hidrógeno(R1), hidróxido (R2, R3, R4, R5, R6, R8 y R9) y acetil (R7).

Tabla 3: Modificaciones de los factores nod^a

| Rhizobaceae | Tribus de plantas que nodula | Residuos GlcNAc (n) ^b | Sustituciones Especiales ^c | Genes especializados ^d |
|--------------------------------|------------------------------|----------------------------------|---|---|
| <i>S. meliloti</i> | Galegeae | 3,4,5 | R4: AC, R5:S, C16:2, C16:3, C26(w-1)OH | R4:NodL, R5:NodH, FA:NodAFEG |
| <i>R. leguminosarum</i> TOM | Galegeae | 3,4,5 | R4:Ac, R5:Ac, C18:4 | R4:NodL, R5:NodX, FA: NodAFE |
| <i>R. galegae</i> | Galegeae | 4,5 | R4:Cb, R9:Ac, C18:2, C18:3, C20:2, C20:3 | R4:NodU, FA:Nod AFE |
| <i>M. loti</i> (NZP2037) | Loteae, Genisteae | 4,5 | R1:Me, R2:Cb, R3:Cb, R5:AcFuc | R1:NodS, R3:NoIO, R5:NodZ y NoIL |
| <i>B. japonicum</i> | Phaseoleae | 5 | R4:Ac, R5:MeFuc | R4:NodL, R5:NodZ y Noe I |
| <i>R. etli</i> | Phaseoleae | 4,5 | R1:Me, R3:Cb, R5:AcFuc | R1:NodS, R3:NoIO, R5:NodZ y NoIL |
| <i>R. tropici</i> | Phaseoleae, Mimoseae | 4,5 | R1:Me, R5:S, R6: Man | R1:NodS, R5:NodH |
| <i>S. fredii</i> R. Sp. NGR234 | 26 tribus | 4,5 | R1:Me, R3:Cb, R4:Cb, R5:meFuc/AcMeFuc/S meFuc | R1:NodS, R3:NoIO, R4:NodU, R5:NodZ y Noe I /NoIL/NoeE |
| <i>A. caulinodans</i> | Robinieae | 4,5 | R1:Me, R4:Cb, R5:Fuc, R8 Ara | R1:NodS, R4:NodU, R5:NodZ, R8:NoeC |

a La estructura general se observa en la gráfica superior a la tabla en esta hoja. b Los números subrayados de N-acetilglucosamina indican las especies más abundantes. c Los sustituyentes no ocurren siempre en todos los factores nod producidos, hay una mezcla de ellos. Abreviaturas: Me:N-Metil; Cb:O-Carbamil; Ac: O-Acetil; S: O-sulfil; Fuc:unión α-fucosil; Me Fuc: 2-O- metilfucosil; AcMeFuc: 4-O-acetil-2-O-metilfucosil; SmeFuc: 3-O-Sulfato-2-O-metilfucosil; Et: Etil, Gro: gliceril;Man: Manosil, G: N-glicolil; FA:fatty acil.

Nodulación:

La planta hospedera comienza el desarrollo del primordio del nódulo con el reconocimiento -especie específico- de la estructura de los factores Nod: suprime los mecanismos de defensa, inicia la proliferación de las células corticales y la diferenciación de pelos radiculares en forma "espiralada".^{21,22} Las bacterias que hacen contacto con los pelos "espiralados" son endocitadas (en un proceso similar a la fagocitosis) y son transportadas hacia el interior de la célula a través de lo que se ha denominado como "hilo de infección".^{23,24} Una vez en el interior de la célula huésped, envuelta en la membrana peribacteroidal; la bacteria deja de proliferar, se diferencia en bacteroide, comienza el intercambio metabólico y la fijación de nitrógeno. El nódulo que puede realizar todas estas actividades se denomina como nódulo maduro o simbiosoma.²⁵ (Figura 4)

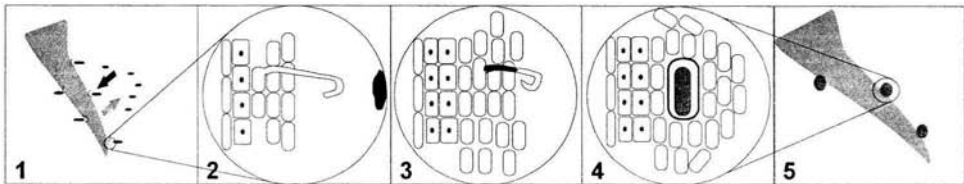


Figura 4: 1) Intercambio de flavonoides y factores Nod; 2) Se forman las estructuras "espiraladas"; 3) Las bacterias son endocitadas y transportadas por el hilo de infección; 4) se diferencian en bacteroides, inicia el intercambio metabólico y la fijación de nitrógeno; 5) se observan los nódulos en la raíz.

Los nódulos pueden ser determinados o indeterminados y dependen de la persistencia del meristemo apical. En los nódulos determinados las bacterias se encuentran en un estadio de desarrollo y diferenciación similar, mientras que en los indeterminados las bacterias siguen proliferando en el nódulo, lo que hace posible que se observen nódulos alargados con secciones de bacterias sin diferenciar, bacteriodes maduros y bacteroides senescentes. *Rhizobium etli* forma nódulos determinados.²⁶

Metabolismo en simbiosis:

Durante la simbiosis el intercambio de metabolitos y señales de comunicación entre la planta y el bacteroide marca un complejo mecanismo que ha sido un área de ardua investigación. El intercambio metabólico primario de la simbiosis es el intercambio de carbono reducido por nitrógeno reducido, donde el bacteroide aporta nitrógeno a la planta a cambio de fuentes de carbono. En este proceso se ha identificado que la naturaleza de la fuente de carbono limita la fijación de nitrógeno, y probablemente cambia con el estado de desarrollo del nódulo; además varía entre las especies involucradas.^{9, 27}

⁹ Las revisiones de Udvardi y Dayes (27) así como la de Poole y Allawayson (38) excelentes textos de consulta.

Como las principales fuentes de carbono en el nódulo que aporta la planta se han identificado a los intermediarios del ciclo de Krebs: succinato, fumarato y malato. Se ha observado que las enzimas involucradas en el metabolismo de ácidos dicarboxílicos tienen una elevada actividad,²⁸ las mutantes afectadas en este transporte (*dctC*) no fijan nitrógeno pero si nodulan^{29,30} y mutantes de succinato deshidrogenasa, succinil-CoA Sintetasa y α -cetoglutarato deshidrogenasa se ha encontrado que forman nódulos pero no fijan nitrógeno.^{31,32,33}

La glucosa y sus derivados, se señalaron en algún momento como una posible fuente de carbono; sin embargo, se encontraron que no participan como la principal fuente de carbono que aporta la planta, porque se han reportado que algunas mutantes en su catabolismo que forman nódulos y fijan nitrógeno.^{34,35} Adicionalmente, se han encontrado actividades altas de las enzimas de la gluconeogenesis en bacteroides y algunas mutantes en enzimas de la gluconeogénesis no fijan nitrógeno,^{36,37} lo que se corrobora que la planta aporta pequeñas cantidades de azúcares para cubrir las necesidades básicas del bacteroide de estos compuestos.³⁸

De los metabolitos que se han propuesto que la planta le da al bacteroide además de los ácidos dicarboxílicos se encuentran los aminoácidos, principalmente aspartato y el glutamato. Mutantes de *S. meliloti*, que no pueden crecer en aspartato como fuente de carbono y nitrógeno, por que carecen de actividad de la aspartato transaminasa, no pueden fijar nitrógeno;³⁹ otras mutantes que no pueden crecer en glutamato como fuente de carbono, presentan una actividad de nitrogenasa muy reducida⁴⁰, sin embargo se desconoce el sitio de la mutación por lo que es difícil establecer comparaciones. La hipótesis de que la planta da estos aminoácidos al bacteroide parece ser cierta en las primeras etapas del establecimiento del nódulo por las concentraciones que se han observado, sin embargo en nódulos maduros la membrana peribacteroidal presenta impermeabilidad a aminoácidos, lo que pone en duda estas hipótesis y además la afinidad de los transportadores de carboxilatos, que pudieran transportar aspartato, presentan una afinidad menor por este aminoácido que la que presentan por los dicarboxílicos, malato, succinato y fumarato; que la planta da al bacteroide en grandes cantidades.³⁸

La naturaleza del metabolito con que el bacteroide provee a la planta de nitrógeno ha sido extensamente estudiada y se propone que la alanina y el amonio son los principales productos nitrogenados secretados por el bacteroide. Sin embargo, las cantidades medidas de alanina y amonio secretados son muy divergentes, ya que van desde la observación de que los bacteroides solo secretan amonio a los que sólo secretan alanina, incluyendo diferentes grados de ambos metabolitos; por lo que existe una discusión alrededor de las condiciones experimentales y la confiabilidad de los resultados.³⁸

Se ha observado que la asimilación de amonio se encuentra reducida en bacteroides, por lo que la mayor contidad del amonio producido por la fijación de nitrógeno podría difundir

libremente a través de un gradiente de concentración hacia la planta o a través de un transportador. Este mecanismo acoplado a la concentración de iones podría ser muy importante en la aportación de nitrógeno en la simbiosis.^{41,27}

Se han encontrado mutantes, cuyo fenotipo fortalece la hipótesis de aminoácidos: mutantes de *R. leguminosarum* y *B. japonicum* de la permeasa general de aminoácidos (Aap), por la cual se puede importar y exportar diversos aminoácidos, se encontró que forman nódulos normales que fijan nitrógeno, a pesar de que reduce la exportación de glutamato en un 76% por lo que se ha propuesto que la Aap sirve para destoxificar al bacteroide del aspartato y equivalentes reductores; y una doble mutante de transporte de aminoácidos (*aap/bra'*) presentó una gran disminución en la integración del nitrógeno fijado por el bacteroide en el xilema de la planta.⁴² Otras aportaciones a esta hipótesis se basan en las observaciones realizadas en mutantes de alanina deshidrogenasa, que no pueden sintetizar alanina, resultaron en que aunque fijan nitrógeno normalmente, el peso seco de las plantas reduce en un 20% y las plantas son amarillentas por insuficiencia de nitrógeno.^{43,44,38} El aspartato se ha propuesto a través de la teoría de que el intercambio se lleva a cabo a través de algún tipo de una lanzadera de malato-aspartato que funciona entre la planta y el bacteroide⁴⁵ aunque hay grupos de investigación que ponen en duda la existencia de las lanzaderas.³⁸

En fin, la discusión continúa y en mi punto de vista el metabolismo de aminoácidos en el bacteroide es necesario para proveerse de nitrógeno para sí mismo y para mantener funcionando eficientemente metabolismo de ácidos dicarboxílicos,^{38,27} siendo posible e incluso necesario la exportación de aminoácidos hacia la planta. En este sentido, parecen tener un papel central las transaminasas de alanina, glutamato y aspartato quienes, además de que son puntos de intersección entre el metabolismo de aminoácidos y los ácidos dicarboxílicos, pueden ayudar a transportar amonio a través del bacteroide sin que resulte tóxico, así como destoxificar al bacteroide del aspartato y equivalentes reductores.

Asimilación de amonio

En el bacteroide las actividades de asimilación y fijación de nitrógeno se encuentran reguladas por mecanismos diferentes a los que utiliza en vida libre. En vida libre *Rhizobium* utiliza el sistema central de regulación de nitrógeno NtrC que activa la transcripción de los genes involucrados en la asimilación y metabolismo del nitrógeno ante condiciones de baja disponibilidad de nitrógeno. En *R. etli* la asimilación de nitrógeno en vida libre se realiza principalmente por la vía GS/GOGAT que es necesaria para el uso eficiente de succinato y se encuentra bajo la regulación de NtrC. Por esta vía la GS sintetiza glutamina a partir de glutamato y amonio, y la GOGAT utiliza glutamina y 2-oxoglutarato para producir 2 moléculas de glutamato, proceso en el cual queda asimilado a una molécula de amonio.^{46,47}

En simbiosis el bacteroide regula la asimilación y metabolismo del nitrógeno a través de Nif que se activa en baja concentración de oxígeno y desaparece NtrC, esto se sabe porque mutantes en el sistema Ntr presentan pequeños cambios o ninguno en la fijación de nitrógeno en simbiosis; lo que indica un mecanismo de regulación para la asimilación de amonio diferente al que usa en vida libre. Esto es una importante diferencia entre las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre (*Klebsiella* y *Azotobacter*) que si requieren del sistema Ntr para la expresión de los genes *nif*.^{48,49}

En simbiosis, aunque se había aceptado que los bacteroides no realizaban asimilación de amonio, se ha observado que sintetizan diferentes metabolitos que contienen nitrógeno e incluso se detectan actividades significativas de GS y GOGAT, por lo que si hay asimilación de amonio. Esto se descubrió en la caracterización de una mutante de GOGAT de *R. etli* donde se observó que se incrementa el nitrógeno donado a la planta, lo que puede deberse a la reducción en la asimilación de amonio por el bloqueo de la vía y por la menor cantidad de glutamato presente.⁵⁰ Sin embargo la asimilación de amonio en bacteroides aislados comparada con el nitrógeno fijado por las nitrogenasas por la vía GS/GOGAT es baja; a su vez la vía de asimilación de amonio a través de la enzima glutamato deshidrogenasa no se encuentra en *R. etli* * y hay datos como los observados en *B. japonicum* y *R. leguminosarum*, que propone que la incorporación de nitrógeno al metabolismo (también) es realizado por la alanina deshidrogenasa (ADH), que es necesaria para la inserción de un grupo amino al piruvato, desde donde puede ser utilizado por el bacteroide o bien exportado a la planta.⁴⁴

Fijación de nitrógeno:

Una vez formado el nódulo, la planta comienza a aportar diferentes metabolitos, entonces el bacteroide sintetiza diversas proteínas, entre ellas la nitrogenasa, con lo que comienza la fijación de nitrógeno. El proceso de la fijación de nitrógeno tiene un costo energético muy alto para la bacteria, además de tener que producir las proteínas Nif y Fix, la reacción para reducir una molécula de N₂ en dos moléculas de amonio necesita esteoquiométricamente la energía de 16 moléculas de ATP⁵¹:



La nitrogenasa es la enzima que se encarga de la fijación de nitrógeno y está compuesta por dos proteínas la FeMo (NifDK) y la Fe (NifH). La proteína Fe Mo es un tetrámero ($\alpha_2\beta_2$) con dos pares de subunidades no idénticas ($\alpha\beta$) con un peso molecular de 220 000 a 240 000 daltones. La proteína Fe, la reductasa, es un dímero de subunidades idénticas (α_2) con

* La secuencia del genoma y los plásmidos simbióticos de *R. etli* no presentan algún gen que codifique para la glutamato deshidrogenasa. (Brenda Valderrama, comunicación personal.)

un peso molecular de 60 000 a 65 000 daltones. Estas proteínas forman un complejo multienzimático que realiza el proceso de la fijación de nitrógeno.⁵²

Los genes de las *Rhizobiaceas* que participan en la fijación de nitrógeno se han clasificado como genes *nif* y *fix*. Los genes *nif* son homólogos a los genes de fijación de nitrógeno de *Klebsiella pneumoniae* y los genes *fix* no tienen genes homólogos. Los genes *nif* de *K. pneumoniae* se encuentran en un regulón de 21 genes con 8 operones, coordinados en respuesta a los niveles de nitrógeno celular.⁵³ En los *Rhizobium* los genes *fixL* y *fixJ* se encargan de percibir la concentración de oxígeno y controlan la expresión del gen *nifA* y de *fixK*, cuyos productos activan la transcripción de los demás genes que participan en la fijación de nitrógeno;⁵⁴ lo que es coherente con el hecho que los bacteroides tienen disponibilidad de amonio y nitrógeno en los nódulos por la fijación de nitrógeno que realizan a baja concentración de oxígeno. En la tabla 4 se presentan las funciones de los genes *nif* y *fix* reportados para poder hacer más explícito el complejo mecanismo de regulación que opera en los bacteroides.^{55,56}

Tabla 4: Los genes *nif* en la fijación de nitrógeno de los *Rhizobium*⁵⁷

| GEN | PRODUCTO Y FUNCIÓN |
|-------------------------------|--|
| <i>nifH</i> | Dinitrogenasa reductasa (Fe proteína) dímero α_2 , centro Fe_4S_4 . Función: brinda los electrones a la proteína FeMo para reducir al nitrógeno, regula a los sistemas de <i>vnf</i> y <i>anf</i> |
| <i>nifKD</i> | Dinitrogenasa (proteína FeMo); tetramero $\alpha_2\beta_2$ Función: reducción del nitrógeno. |
| <i>nifJ</i> | Piruvato flavodoxina oxidoreductasa; dímero α_2 ; centro FeS. Función: dona electrones a la flavodoxina. |
| <i>nifF</i> | Flavodoxina dona electrones a la dinitrogenasa reductasa. |
| <i>nifQ</i> | Procesamiento temprano del Mo para el FeMo-co. |
| <i>nifB</i> | Biosíntesis del FeMo-co: Proteína FeS sensible a oxígeno. |
| <i>nifNE</i> | Síntesis del tetramero $\alpha_2\beta_2$ del FeMo-co: Proteína FeS sensible a oxígeno similar a Nif KD |
| <i>nifV</i> | Presumiblemente homocitrato cintasa. |
| <i>nifS</i> | S-transferasa dependiente de Cisteína. Enzima dependiente de piridoxal-fosfato. Función: como donador de S para varios clusters FeS del sistema de la nitrogenasa. |
| <i>nifM</i> | necesaria para procesar NifH |
| <i>nifY</i> | Se une a la apodinitrogenasa para permitir la unión del FeMo-co |
| <i>nifA</i> | Regulador positivo |
| <i>nifL</i> | Regulador negativo |
| <i>nifW, nifT, nifZ, nifU</i> | Se desconoce su función |
| <i>fixL</i> | Hemoproteína sensora de oxígeno, se autofosforila y puede transferir el fosfato a Fix J |
| <i>fixK</i> | |

RESULTADOS

*Los problemas del hombre están definidos por sus circunstancias;
las soluciones, muchas veces, también son circunstanciales.*

La cepa mutante LM13 tiene insertado un transposón Tn5-*mob* y se seleccionó por su incapacidad para crecer en glutamina como fuente de carbono y nitrógeno. Con estos antecedentes desarrollamos la hipótesis de este trabajo:

HIPÓTESIS

La mutación provocada por el Tn5-*mob* en LM13 puede estar localizada en las enzimas de degradación de glutamina o glutámico, o en algún sistema regulatorio relacionado con estas enzimas; por lo que identificar el gen mutado y proponer el mecanismo por el cual se realiza este efecto es importante para conocer más a fondo el metabolismo de estos aminoácidos en *Rhizobium etli*.

Para abordar los resultados derivados de esta hipótesis, dividí en tres secciones este capítulo: en la primera presentaré a *los personajes*, las cepas que utilicé y sus características de crecimiento (fenotipos); en la segunda, las estrategias de estudio que usamos para localizar la mutación y por último te presentaré los datos específicos que confirman la mutación en LM13.

OBJETIVO GENERAL:

Caracterización bioquímica y molecular de la mutante LM13 de *Rhizobium etli*.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Determinar el fenotipo en vida libre y simbiótico.
- Determinar la actividad de las enzimas relevantes del metabolismo nitrogenado (en este caso serán Glutamino sintetasas (GS)'s I y II, glutaminasas A y B, y la Alanino Deshidrogenasa (ADH)
- Identificar al gen mutado en la cepa LM13, determinar su secuencia nucleotídica y su actividad enzimática.

OBTENCIÓN DE LAS CEPAS

Cepa LM13: fue obtenida a partir de la cepa CE3 de *Rhizobium etli*, a quien se le realizó una mutagénesis con el transposón Tn5-*mob*, y fue seleccionada por su incapacidad de crecer en glutamina como fuente de carbono y nitrógeno.

Cepa LM13+pGDM18.26: fue obtenida a partir de la cepa LM13 a quien se le introdujo el plásmido pGDM18.26. Este plásmido contiene un fragmento de 3Kb que contiene el locus que complementa a la mutante LM13 y es una subclona del plásmido pGDM18, de 5.5 Kb (aprox), que se obtuvo a partir de complementar a la mutante LM13 con el banco genómico de *R. etli* CE3. La mutante LM13 complementada con el pGDM18.26 fue seleccionada porque puede crecer de forma similar a la cepa silvestre y esta cepa nos brinda la información de que el fenotipo observado está relacionado directamente a una sola mutación, la provocada por el Tn5-*mob*.

Cepa CE3+pGDM18.26: fue obtenida a partir de la cepa CE3 a quien se le introdujo el plásmido pGDM18.26.

Cepa LM13+pLAFR1: fue obtenida a partir de la cepa LM13 a quien se le introdujo el plásmido pLAFR1 que es el vector que contiene al fragmento pGDM18.26. Se usa como control para observar que el vector no distorsiona alguna función.

DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO

Fenotipo en vida libre

Para caracterizar el fenotipo en vida libre se realizaron curvas de crecimiento en diversos medios y condiciones. El crecimiento de las bacterias, en relación a una fuente de carbono y/o nitrógeno, nos demuestra que el metabolismo de las bacterias ante esa fuente de nutrientes se encuentra afectada o es similar a la cepa silvestre.

Al realizar las curvas de crecimiento en diversos medios y condiciones, se observó que LM13 es incapaz de crecer en glutamina (gln) y glutamato (glu) y disminuye su tasa de crecimiento en alanina (ala), usándolas como fuente de carbono y nitrógeno; presenta un crecimiento similar a la cepa silvestre (CE3) en diferentes medios de cultivo, incluyendo a aquellos que contienen gln, glu o ala y una fuente de carbono alternativa (glucosa o ac. Succínico). Este fenotipo de LM13 se debe a que no puede usar gln y glu como fuente de carbono y nitrógeno, mas si puede usarlos como fuente de nitrógeno para crecer y reproducirse en número similar a la cepa silvestre. A su vez, las cinéticas de crecimiento muestran que las cepas transconjugantes CE3+pGDM18.26 y LM13+pGDM18.26 se comportan de manera similar a la cepa silvestre, y la LM13+pLAFR1 se comporta similar a la cepa LM13. (Tabla 5, Figura 5)

Tabla 5: Fenotipo en vida libre*

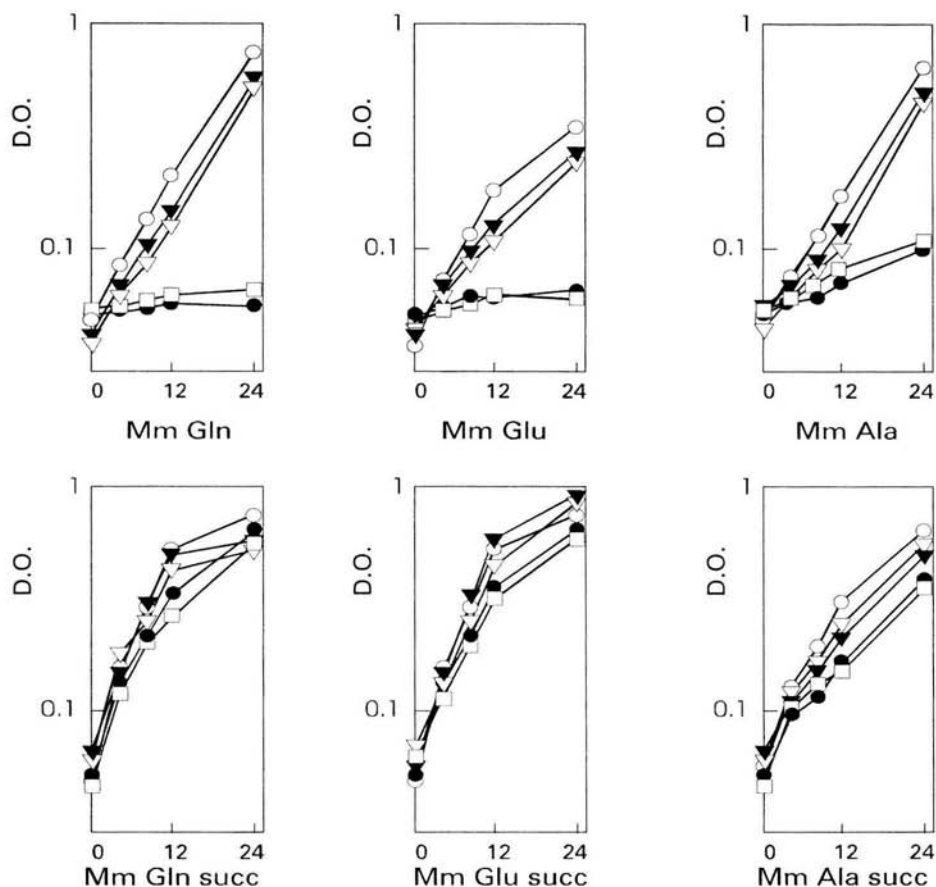
| CEPA/ MEDIO | CE3 | CE3+ pGDM18.26 | LM13 | LM13+ pGDM18.26 | LM13+ pLAFR1 |
|-----------------------|-----|-------------------|------|--------------------|-----------------|
| Gln | + | + | -- | + | -- |
| Gln Succ | + | + | + | + | + |
| Gln Gluc | + | + | + | + | + |
| Glu | + | + | -- | + | -- |
| Glu Succ | + | + | + | + | + |
| Glu Gluc | + | + | + | + | + |
| Ala | + | + | +-- | + | +-- |
| Ala Succ | + | + | + | + | + |
| Ala Gluc | + | + | + | + | + |
| NH ₄ Succ | + | + | + | + | + |
| NH ₄ Gluc | + | + | + | + | + |
| Asn | + | + | + | + | + |
| Asn Succ | + | + | + | + | + |
| Asp | + | + | + | + | + |
| Asp Succ | + | + | + | + | + |
| KNO ₃ Succ | + | + | + | + | + |
| PY | + | + | + | + | + |

En la tabla 1 se resume el comportamiento en medio sólido y en medio líquido de las diferentes cepas ante diversas fuentes de carbono y nitrógeno y las lecturas de todos los medios se cuantifican con respecto a la cepa silvestre CE3 de *R. etli*.

En la figura 1 se muestra en detalle el crecimiento de las diferentes cepas en los medios que brindan gln, glu y ala como fuente de carbono y nitrógeno, y cuando se les adiciona succinato como fuente de carbono. Las curvas de crecimiento mostradas fueron seguidas por densidad óptica y por cantidad de proteína, la tendencia de ambas curvas son iguales, y se muestran los resultados por densidad óptica.

* El crecimiento en medio sólido fue realizado por 3 días a 30 °C, en Medio mínimo (MM) más las fuentes de carbono y nitrógeno señaladas a una concentración 10mM, excepto el medio Py. El crecimiento en medio líquido se realizó a 30 °C y 200rpm, con un muestreo cada 4 horas hasta las 24 h. (ver material y métodos).

Figura 5: Curvas de crecimiento en medio líquido^a



○ CE3, ● LM13, ▽ CE3+pGDM18.26, ▼ LM13+pGDM18.26, □ LM13 + pLAFR1

^a Curvas de crecimiento en líquido a 30 °C y 200rpm, muestreo cada 4 horas hasta 24 h.

A partir de la caracterización fenotípica podemos concluir que:

- La cepa LM13 no puede crecer cuando usa, como fuente de carbono y nitrógeno, glutamina, glutamato y disminuye su tasa de crecimiento cuando usa alanina.
- Se descartó que LM13 se encontrara afectada en el transporte de estos aminoácidos, pues al agregar una fuente de carbono el crecimiento se normaliza;
- El plásmido pGDM18.26 contiene el *locus* que complementa la función, por lo que LM13 tiene una mutación en este fragmento. Cabe esperar que sea similar al que flankea al Tn5-*mob* insertado, lo que se observará en la secuencia de DNA.

Fenotipo en simbiosis

Determinar cómo se encuentra la relación simbiótica entre *Rhizobium etli* con el frijol, es importante por ser una de las características más esenciales del objeto de estudio. La cepa LM13 crece en MM NH₄Succ y MM KNO₃Succ por lo que esta cepa no es auxótrofa, sin embargo no degrada glutamato, por lo que es probable que no pueda establecer una simbiosis eficiente pues otras cepas que no degradan glutamato no nodulan ni fijan nitrógeno, sin embargo se desconoce la identidad del gen que lo provoca en muchas de ellas, por lo que no podríamos clarificar o acercarnos al origen de la mutación por esta vía. Simplemente podemos decir si LM13 puede o no realizar nódulos y fijar nitrógeno.

El experimento para determinar el fenotipo en simbiosis se realizó con 4 macetas de 6 plantas cada una para cada cepa, 2 macetas sin inóculo y 2 macetas sin inóculo con nitrógeno. La nodulación y la actividad de nitrogenasa se midieron a los 31 días de la inoculación. Los porcentajes se establecen con respecto a la cepa silvestre CE3 de *R. etli*.

Tabla 6: Determinación de la nodulación y de la fijación de nitrógeno

| CEPA | Peso de nódulos por maceta (gramos) | % NODULACIÓN | Actividad de nitrogenasa %etileno/h/g nódulo | % ACTIVIDAD DE NITROGENASA |
|----------------|-------------------------------------|--------------|--|----------------------------|
| CE3 | 0.547+-0.025 | 100% | 15.14 | 100% |
| LM13 | 0.029+-0.011 | 5% | N.D. | 0% |
| LM13+pGDM18.26 | 0.520+-0.023 | 95% | 14.23 | 94% |

Los experimentos de fenotipo en simbiosis nos permiten concluir que:

- LM13 nodula un 5% de lo que nodula la cepa silvestre y no presenta actividad de nitrogenasa. Por lo que la simbiosis no es eficiente.
- La cepa LM13 + pGDM18.26 recupera en un 95% la nodulación y 94% la fijación de nitrógeno.
- Estos datos requerirían de una investigación para observar los primeros estadios de la simbiosis de LM13 y sus características morfológicas.

EN BUSCA DE LA MUTACIÓN

La cepa LM13 es diferente de su antecesora CE3, en su incapacidad para crecer en gln y glu como fuentes de carbono y nitrógeno, a raíz de la inserción del transposón Tn5-*mob* en la cepa silvestre CE3; pero ¿qué está dañado en esta mutante?, ¿qué se dañó para que no pueda crecer en gln, glu y ala, pero permanezca similar a CE3 en otras fuentes de carbono y nitrógeno?

Para encontrar la respuesta podemos elegir dos caminos: la bioquímica o la biología molecular. Estas disciplinas de la Biología son diferentes en la escala a la que realizan sus preguntas y por lo tanto en las respuestas que de ellas se obtiene.

Bioquímica: Esta disciplina nos brinda información de cómo es el metabolismo de LM13 y que estrategias está usando para sobrevivir ante el cambio. Por ello se revisarán algunas enzimas relevantes del metabolismo de gln, glu y ala, y las pozas de aminoácidos para encontrar su variación frente a CE3, y probablemente lo que ha causado la mutación.

Biología molecular: Esta disciplina nos brinda la posibilidad de identificar al gen mutado en la cepa LM13, determinar su secuencia nucleotídica y hacer los análisis referentes a la proteína ya identificada.

BIOQUÍMICA

El ciclo de glutamina, glutamato y alanina.

La glutamina y el glutamato son considerados como centrales en el metabolismo, ya que son los productos primarios de la asimilación de amonio y son los principales donadores de nitrógeno en la formación de biomoléculas.

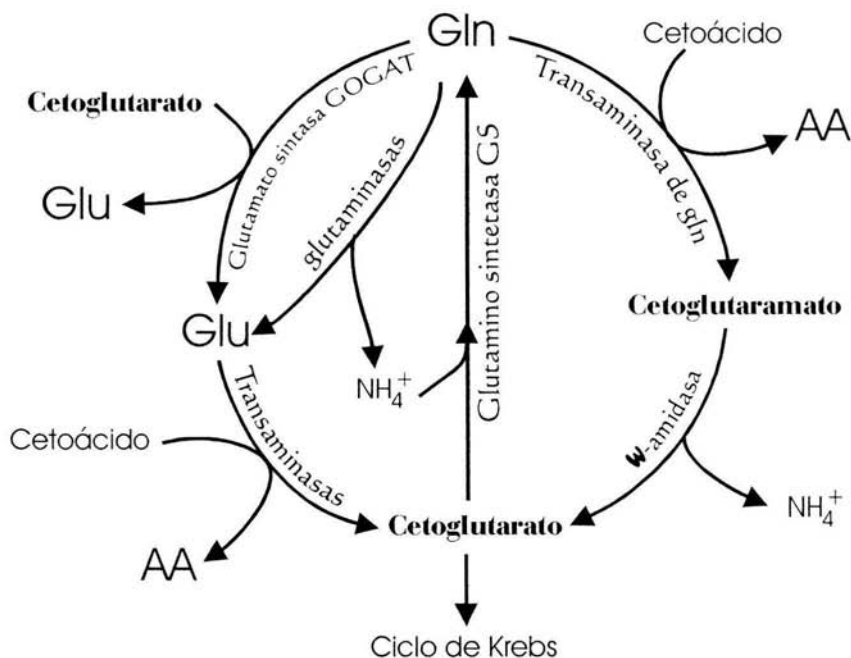
La importancia de la glutamina radica en que funciona en varios microorganismos como co-represor del metabolismo nitrogenado: su concentración determina la utilización de nitrógeno del medio, y la relación síntesis/degradación del nitrógeno celular. En *R. etli* la síntesis de glutamina es realizada por las GS a partir de glutamato y amonio,⁵⁸ y su degradación es llevada a cabo por las glutaminasas, haciendo la reacción inversa.⁵⁹ La degradación también es llevada a cabo por la vía de la transaminasa de glutamina- ω amidasa, que transamina el grupo amino a un 2 oxoácido para formar al α -aminoácido correspondiente al oxoácido y 2 oxoglutamato, que es inmediatamente utilizado por la enzima acoplada, ω amidasa, que lo reduce a 2-oxoglutarato y amonio.⁶⁰

El glutamato es uno de los puntos de interacción entre el metabolismo nitrogenado y el de carbono modulando la concentración de algunos intermediarios y la actividad de algunas enzimas en el ciclo de Krebs y el metabolismo de aminoácidos. El glutamato es sintetizado principalmente por la GOGAT de la vía de asimilación de amonio,⁴⁵ y por la transaminación

de un grupo amino al 2-oxoglutarato como lo realiza la aspartato aminotransferasa (Aat) que es esencial para la fijación de nitrógeno en simbiosis. El glutamato es degradado por la transaminación de su grupo amino a otro 2-oxoácido entre las que debemos recalcar la acción de la alanina amino transferasa que produce alanina y 2-oxoglutarato.⁶⁰ (figura 6)

Aunque en otras enterobacterias la principal vía de asimilación de amonio es por la glutamato deshidrogenasa GDH, *Rhizobium etli* no presenta dicho gen* y realiza la asimilación por la vía GS/GOGAT principalmente. Incluso se expresó el gen de la GDH de *E. coli* en una cepa de *R. phaseoli* y cuando es expresado constitutivamente no puede establecer la simbiosis, y cuando es expresado bajo la regulación de Nif (que se induce en la simbiosis a baja concentración de oxígeno) se reduce la actividad de la nitrogenasa en un 85%, lo que puede deberse a que asimila mucho amonio en glutámico en lugar de proveer de amonio a la planta.⁶¹ Otra enzima que participa en este ciclo es la deshidrogenasa de alanina (ADH) que sintetiza reversiblemente alanina a partir de piruvato y amonio, y son participantes en la integración de amonio al metabolismo en *B. japonicum* y *R. leguminosarum*.³⁸

Figura 6: **Metabolismo de Glutamato, Glutamina y Alanina**



* Comunicación personal, Brenda Valderrama.

Metabolismo de alanina en LM13

La decisión de medir la alanina deshidrogenasa en LM13 se debe a la disminución de crecimiento en alanina como fuente de carbono y nitrógeno, y que cabe la posibilidad de un cambio importante en su actividad.

Las alanina deshidrogenasas ADH se han dividido en: dependientes de NAD⁺ que participan generalmente en el catabolismo y las dependientes de NADPH que son generalmente participantes en la asimilación de amonio. La alanina deshidrogenasa cataliza la desaminación reversible de alanina produciendo piruvato y amonio, siendo dependiente de NAD⁺. En el sentido de síntesis, dependiente de NADPH, esta enzima participa en la asimilación de amonio en altas concentraciones del mismo.⁶²

La ADH se ha purificado de bacteroides de *B. japonicum* donde es un tetrámero de peso molecular de 190,000, y se encuentra solamente en el citosol⁶⁴. Su actividad se incrementa durante el desarrollo del nódulo cuando aumenta la actividad de nitrogenasa, y se ha propuesto que en simbiosis la asimilación de amonio se lleva a cabo por esta enzima, más que por la vía GS/GOGAT.⁴³ Los resultados que obtuvimos son:

Tabla 7: Actividad específica de alanina deshidrogenasa

| CEPA | ALANINO DESHIDROGENASA | |
|----------------|--|-----------------------------------|
| | NAD ⁺ DEPENDIENTE catabólica | NADPH DEPENDIENTE Biosintética |
| CE3 | 1.21+-0.19 | 153.44+-1.42 |
| CE3+pmgd18.26 | 0.86+-0.11 | 115.86+-1.15 |
| LM13 | ND* | 135.61+- 1.21 |
| LM13+pmgd18.26 | 0.85+-0.26 | 145.30+-1.57 |
| LM13+pLAFR1 | ND | 118.41+-1.34 |

La actividad se determinó a las 4 horas de crecimiento en MM alanina; es expresada en nmoles/min/mg, y los resultados son el promedio de tres experimentos. * ND: No detectable

La actividad de alanina deshidrogenasa ADH catabólica mostró que:

- La actividad de la ADH catabólica detectada en *R. etli* es muy pequeña y con esta actividad no podría sostener el crecimiento, por lo que debe utilizar otra(s) vía(s) de degradación de alanina, para crecer en esta fuente de carbono y nitrógeno, que muy probablemente sean las alanina aminotransferasas.
- La actividad de ADH catabólica no se pudo detectar en la LM13 y en la LM13+pGDM18.26. Estos resultados implican que el gen mutado en LM13 regula, por algún mecanismo, la actividad de la ADH

La actividad de alanino deshidrogenasa ADH biosintética que:

- a) La ADH biosintética de LM13 presenta una disminución del 12% ante la actividad de la cepa silvestre, esta variación es una adaptación del flujo de la vía metabólica que en si no es responsable de la auxotrofia de LM13 a glutamina, glutámico y menos aún de alanina, pues la actividad es en el sentido de síntesis.

Metabolismo de Glutamina en LM13

En *Rhizobium* se han reportado tres GS denominadas GSI, GSII, y GSIII. Sus genes se han denominado como *glnA* y *glnII*, y el locus denominado como *glnT* localizado en *S. meliloti* y en *R. Leguminosarum*.^{63, 64} Se han obtenido mutantes en la GS I y GS II, sencillas y dobles. Las mutantes sencillas de *S. meliloti* y *B. japonicum* muestran que son protótrofas de glutamina capaces de nodular y fijar nitrógeno.⁶⁵ Las mutantes dobles de *B. japonicum* son auxótrofas de glutamina y no pueden utilizar amonio como única fuente de nitrógeno y no nodulan, aunque si se les adiciona glutamina nodulan pero no fijan nitrógeno;⁶⁶ mientras que la doble mutante de *S. meliloti* en *glnA* y *glnII* es capaz de nodular y fijar nitrógeno pero crece poco en medio mínimo amonio succinato.^{67,68} Recientemente se obtuvo una triple mutante en GS de *S. meliloti* que es auxótrofa de glutamina, mas continúa nodulando y fijando nitrógeno, lo que sugiere que en simbiosis la alfalfa provee de glutamina al bacteroide[∇], mientras que la soya muy probablemente no lo hace con *B. japonicum*.⁵⁸

La degradación de la glutamina es realizada por la glutaminasa, las transamidadas y transaminasas de glutamina. La glutaminasa es la enzima que cataliza la desamidación hidrolítica de glutamina produciendo glutamato y amonio. En *R. etli* se han encontrado dos isoformas que difieren en su regulación, migración electroforética y en su termoestabilidad; la glutaminasa A participa con un 80% de la actividad total; mientras que la glutaminasa B se expresa constitutivamente. En una mutante en la glutaminasa A de *R. etli*, se observó que no puede crecer en glutamina como fuente de carbono y nitrógeno, y aumenta considerablemente la poza intracelular de glutamina, sin afectar su nodulación o fijación de nitrógeno.⁵⁹ La vía de transaminasa de glutamina- ω -amidasa cataliza la transaminación de glutamina produciendo principalmente glicina y alanina, y su función es participar en el mantenimiento del balance interno de aminoácidos, su biosíntesis y la prevención a pérdida de esqueletos de carbono esenciales.⁶⁰

[∇] Resultados aún no publicados de J. Calderon y S. Durán.

Tabla 8: Actividad específica de glutaminasas^o

| CEPA | GLUTAMINASA A | GLUTAMINASA B |
|----------------|---------------|---------------|
| CE3 | 61.91+-1.24 | 7.66+-0.45 |
| CE3+pmgd18.26 | 53.95+-1.16 | 6.34+-0.26 |
| LM13 | 53.96+-1.37 | 6.08+-0.58 |
| LM13+pmgd18.26 | 59.64+-2.11 | 8.47+-0.87 |
| LM13+pLAFR1 | 56.22+-2.34 | 5.02+-0.81 |

La actividad se determinó a las 12 horas de crecimiento en MM glutamina succinato
^aExpresada en nmoles/min/mgP

Tabla 9: Actividad específica de GS

| CEPA | GSI | | GSII | |
|----------------|------------|-------------|------------|-------------|
| | Sintetasa | Transferasa | Sintetasa | Transferasa |
| CE3 | 7.8+-0.62 | 11.42+-2.12 | 17.8+-4.67 | 1499+-151 |
| CE3+pmgd18.26 | 3.59+-0.14 | 11.25+-4.26 | 17.2+-3.44 | 1377+-264 |
| LM13 | 0.72+-0.35 | 1.25+-1.05 | 13.13+-4.6 | 1557+-214 |
| LM13+pmgd18.26 | 1.07+-0.26 | 9.84+-6.4 | 15.2+-1.39 | 1002+-176 |
| LM13+pLAFR1 | 2.84+-0.17 | 16.4+-3.78 | 14.7+-1.87 | 1469+-189 |

La actividad se determinó a las 8 horas de crecimiento en MM glutamina succinato
^aExpresada en pmoles de glutamilhidroxamato/min/mgP, y es el promedio de tres experimentos.

Los resultados obtenidos al medir las glutaminasas A y B, y a las GS I y II son:

- Al medir las actividades de las glutaminasas A y B, encontramos actividades similares a las encontradas en la cepa silvestre y las complementadas.
- Al medir las actividades de GSI y GSII en la mutante LM13, encontramos que todas las actividades son muy pequeñas (mostradas en picomolas /min/mg de proteína) esto puede deberse a una reducida concentración de α -cetoglutarato y/o al exceso de glutamina intracelular.
- Al medir la GS I, encontramos que la LM13 presenta menor actividad que las demás cepas. La disminución en GSI puede relacionarse a una probable acumulación de glutamina o la ausencia o bajas concentraciones de α -cetoglutarato, pues GSI se encuentra presente cuando el rango de concentración α -cetoglutarato/glutamina es alto.⁶⁹ Sin embargo, no son significativas para explicar el cambio del fenotipo de LM13, al compararla con las cepas silvestre y las complementadas.

- d) En GS II encontramos que la actividad es muy pequeña con las reportadas y la diferencia entre las actividades no son significativas, lo que puede deberse a que la gln que se usó en el medio inhibe a esta enzima.

Determinación de pozas de aminoácidos

Se realizó la determinación de pozas de aminoácidos para observar si a través de este experimento (y los datos obtenidos) podíamos establecer una táctica bioquímica para localizar la mutación, además de mejorar los datos de la caracterización de LM13 y el estado metabólico en el que se encuentra.

Tabla 10: Determinación de pozas de aminoácidos

| AMINOÁCIDOS nmol /mg prot | MM Glu | | MMGln | |
|------------------------------|--------|-------|-------|-------|
| | CE3 | LM13 | CE3 | LM13 |
| Aspartato | 1.85 | 1.07 | 3.47 | 0.28 |
| Glutamato | 18.95 | 29.74 | 47.87 | 54.31 |
| Asparagina | 0.124 | 0.156 | 0.105 | 0.048 |
| Serina | 0.126 | 0.322 | 0.25 | 0.055 |
| Glutamina | 0.94 | 1.22 | 9.97 | 4.84 |
| Glicina | 0.522 | 0.987 | 0.75 | 0.088 |
| Treonina | 0.522 | 0.23 | 0.60 | 0.073 |
| Arginina | 0.32 | 0.264 | 0.34 | 0.107 |
| Alanina | 1.25 | 0.312 | 0.89 | 0.114 |
| Tirosina | 0.426 | 0.101 | 0.33 | 0.0 |
| Valina | 0.348 | 0.106 | 0.43 | 0.081 |
| Fenilalanina | 0.055 | 0.046 | 0.071 | ND |
| Isoleucina | 0.135 | 0.265 | 0.10 | 0.21 |
| Leucina | 0.24 | 0.124 | 0.25 | 0.033 |
| Lisina | 1.423 | 0.88 | 1.32 | 0.25 |

-Crecimiento en MM glu y gln realizado a las 12 hrs de crecimiento
 -Los aminoácidos azufrados no se midieron por necesitar una corrida aparte con una serie de cualidades experimentales que no se pudieron obtener.

Las pozas de aminoácidos nos muestra que:

- Encontramos que la cepa LM13 acumula más glutamato y glutamina que la cepa silvestre en proporciones pequeñas. Sin embargo, los medios en que se midió la poza intracelular nos brindan resultados que no son significativos pues la cepa LM13 no puede crecer en glutamato o glutamina como fuentes de carbono y nitrógeno, y su estado metabólico es muy diferente al de la cepa silvestre.
- La cepa LM13 cuando fue crecida en MMGlu disminuyó en 4 veces la poza de alanina, de tirosina, 3 veces la de valina y en 2 veces la de treonina, leucina y lisina; aumentó 3 veces la poza de serina, 2 veces la de glicina, e isoleucina. El glutamato aumentó de 18.95 a 29.74 nmol/mg P lo que, aunque no es varias veces la poza normal, es un cambio fuerte. La glutamina aumentó de 0.94 a 1.22 lo que no representa un cambio significativo en este sistema.
- La cepa LM13 presenta que cuando fue crecida en MMGln disminuyó en 12 veces la poza de aspartato, y glicina, en 7 la de treonina y leucina, en 6 la de glicina, en 5 la de serina, valina, lisina y en 2 a la glutamina, entre otras. Mientras que aumentó en un 13.5% en la poza de glutamato.

Los datos obtenidos desde un enfoque bioquímico nos permiten concluir:

- La cepa LM13 es metabólicamente diferente a CE3.
- Las pozas de aminoácidos y las actividades enzimáticas de ADH, glutaminasas, GSI y GSII; no nos permiten determinar la ubicación de la mutación de la cepa LM13.
- El gen mutado en LM13 regula, por algún mecanismo, la actividad de la ADH catabólica, la cual no se observa en las cepas LM13 y LM13+pLAFRI.
- La mutación que tiene LM13 modula las enzimas GS I y II del metabolismo de glutamina, sin embargo, la actividad es tan pequeña en todas las cepas que no son significativos para explicar el fenotipo *gln⁻* ni *glu⁻*.
- La cepa LM13 no presenta cambios en la actividad de las glutaminasas A ó B.
- La incapacidad de utilizar glu, gln o ala como fuente de carbono y nitrógeno, de la cepa LM13, requerirá un estudio más detallado, una vez conociendo la identidad del gen mutado en LM13.

BIOLOGÍA MOLECULAR

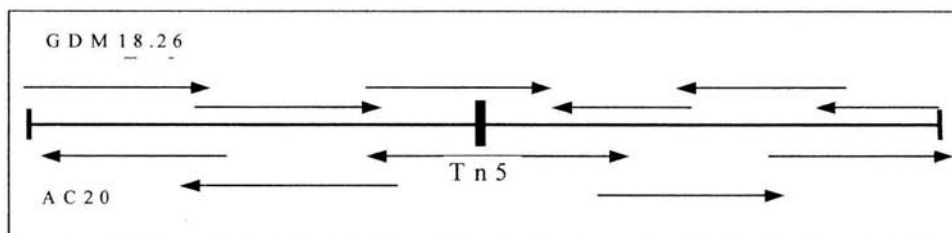
La estrategia bioquímica logró dilucidar algunos cambios en el estado del metabolismo de LM13 en comparación a CE3, sin embargo no nos brinda la información de la localización de la mutación en LM13; por lo que la perspectiva de la biología molecular es imprescindible para determinar la identidad del gen mutado y su secuencia nucleotídica, y poder compararlo con los bancos de genes y genomas reportados.

En búsqueda del gen

Para poder identificar el gen mutado por *Tn5-mob* en LM13 se realizó el método de complementación con el banco genómico de CE3 a LM13. Así se encontró al plásmido pGDM18 con un fragmento de 5.5 Kb (aprox) del genoma de CE3. A partir de este se subclonó un fragmento de 3 Kb que complementaba la mutación en la mutante LM13. Este fragmento, que denominamos pGDM18.26, se obtuvo a través de una digestión parcial con *EcoR1*. Posteriormente se trató de subclonar al fragmento pGDM18.26 para tratar de obtener un fragmento de menor tamaño para secuenciarlo. Sin embargo, ninguno de los fragmentos resultantes de las digestiones con diferentes enzimas de restricción pudo complementar la mutación de LM13.

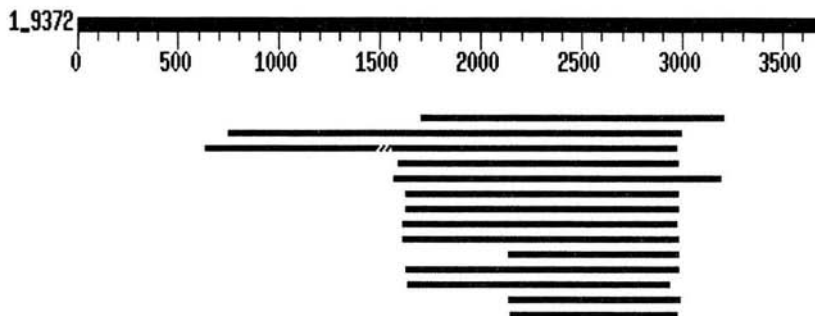
Para corroborar la identidad del gen que complementa la mutación, también se obtuvo el plásmido pAC20, que fue construido con genoma de la LM13 y contiene la región que alberga el *Tn5-mob* insertado y el DNA cromosomal adyacente. Por lo que decidimos iniciar la secuencia de estos fragmentos para conocer la identidad del gen mutado (figura7). Al comparar la secuencia del pGDM18.26 y del pAC20 se observó que son idénticas lo que confirmó que estos plásmidos llevaban clonada la misma región y que la cepa LM13 tiene una sola mutación y está relacionada con el transposón *Tn5-mob* inserto.

Figura 7: Secuencia del fragmento GDM18.26



Las secuencias de los fragmentos pGDM18.26 y AC20 se realizaron en 12 corridas de secuenciación y confirmamos son idénticos en su secuencia. Posteriormente, se alinearon las secuencias de DNA e identificamos el sitio exacto donde se insertó el transposón *Tn5-mob* en el DNA genómico. Esta secuencia unificada se procesó a través de la herramienta Blast del National Center of Biotechnology Information NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov, donde encontramos que nuestra secuencia presenta similitud con genes de S-adenosilhomocisteinasa (*sahH*) de diferentes organismos (Figura8).

Figura 8: Mejores puntajes de identidad de la secuencia completa



| | | | |
|-------------------------------------|-------------|-------------------------------------|------------|
| Agrobacterium tumefaciens S-aden... | <u>1421</u> | Rhodobacter sphaeroides pho... | <u>418</u> |
| Sinorhizobium meliloti... | <u>1176</u> | Rhodobacter capsulatus adenos... | <u>369</u> |
| Mesorhizobium loti DNA, complet... | <u>874</u> | Rhodospseudomonas palustris CGA0... | <u>198</u> |
| Agrobacterium tumefaciens... | <u>573</u> | Bordetella pertussis strain Toh... | <u>198</u> |
| Agrobacterium tumefaciens... | <u>573</u> | Agrobacterium tumefaciens... | <u>182</u> |
| Brucella suis 1330 chromosome I ... | <u>504</u> | Bradyrhizobium japonicum USDA 1... | <u>178</u> |
| Brucella melitensis 16M chromoso... | <u>504</u> | Caulobacter crescentus CB15 sect. | <u>174</u> |

En la secuencia identificada como *sahH* observamos el sitio de inserción del TN5-*mob* en la posición 1909 y un sitio de corte de EcoR1 en la posición 2664-9; por lo que la cepa mutante LM13 de *R. etli* presenta una mutación en la secuencia del gen de la S-adenosilhomocisteinasa (*sahH*) (Figura 9).

Figura 9: Secuencia de *sahH* de *R. etli*

```

1   ATGAAAAAGA TTATGTCGTC GCCGATATCG GGCTTGCGGA CTTCGGCCGC
1   *  K  R   L  C  R   R  R  Y  R   A  C  G   L  R  P
51  AAGGAAATTA CGATCGCCGA AACCGAAATG CCGGGGCTGA TGTCCTGCCG
17  Q  G  N  Y   D  R  R   N  R  N   A  G  A  D   V  L  P
101 CGCCGAGTTT GCGGAGGCAA AGCCGCTGAA GGGCGCGCGC ATCACCGGTT
35  R  R  V   W  R  G  K   A  A  E   G  R  A   H  H  R  F
151 CGCTGCACAT GACCATCCAG ACGGCCGTGC TGATCGAAAC CCTGGTTGCG
52  A  A  H   D  H  P   D  G  R  A   D  R  N   P  G  C
201 CTCGGCGCCG AAGTCCGCTG GCGTCGTGC AACATCTTCT CGACGCAGGA
68  A  R  R  R   S  P  L   G  V  V   Q  H  L  L   D  A  G
251 TCATGCCGCT GCGGCGATCG CCGCGCCGG CGTTCGGTT TTCGCCATCA
85  S  C  R   C  G  D  R   R  G  R   R  S  G   F  R  H  Q
301 AGGCGAGTTC GCTCGAGGAT TACTGGGTCT ATACCACAAA GATCTTCCAG
102  G  R  V   A  R  G   L  L  G  L   Y  R  Q   D  L  P
351 TGCCGATGG  CGGCCTTTC AACATGATCC TCGATGATGG CGGCGACGCC
118  V  A  D  G   G  L  S   N  M  I   L  D  D  G   G  D  A
401 ACCATGTACA TCCTGCTCGG CGCCCGCGCC GAAGCCGGCG AGGACGTGCT
135  T  M  Y   I  L  L  G   A  R  A   E  A  G   E  D  V  L

```

```

451 CTCCAACCCG CATTCCGAAG AAGAGGAAAT CCTCTTCGCC CAGATCAAGA
152   S N P   H S E   E E E I   L F A   Q I K
501 AGCGCCTTGC CGTCTCCCCG GGCTGGTTCA CCAAGCAGCG CGACGCCATC
168   K R L   A A S   P G W   F T K Q   R D A I
551 AAGGGCGTCA CCGAGGAAAC CACGACCGGC GTTAACCGCC TCTATCAGTT
185   K G V   T E E   T T T   G V N   R L Y Q L
601 GAGCCAGAAG GGCCTGCTGC CCTTCCCGGC GATCAACGTC AACGATTCCG
202   S Q   K G L   L P F P   A I N V   N D S
651 TCACCAAGTC GAAGTTCGAC AACAAGTATG GCTGCAAGGA ATCACTGGTC
218   V T K S   K F D   N K Y   G C K E   S L V
701 GACGGCATTG GCCCGGGCAC CGACGTGATG ATGGCCGGCA AGGTCGCCGT
235   D G I   R R G T   D V M   M A G   K V A V
751 CGTCTGCGGT TACGGCGACG TGGGCAAGGG TTCGCTGCC TCGCTCTCCG
252   V C G   Y G D   V G K G   S A A   S L S
801 GCGCCGGCGC CCGCGTCAAG GTTACGGAAG CGGATCCGAT CTGTGCTCTG
268   G A G A   R V K   V T E   A D P I   C A L
851 CAGGCCGCCA TGGACGGGTA TGAAGTCGTG CTGCTCGAAG ACGTCGTTTC
285   Q A A   M D G Y   E V V   L L E   D V V S
901 GTCGGCCGAT ATCTTCATCA CCACGACCGG CAACAAGGAC GTCATCCGCA
302   S A D   I F I   T T T G   N K D   V I R
951 TCGATCATAT GCGGCAGATG AAGGACATGG CCATTGTCGG CAATATCGGC
318   I D H M   R Q M   K D M   A I V G   N I G
1001 CATTTGACA  ACGAGATCGA AGTTGCAGCA CTTCGTAACC TCAAGTGGAC
335   H F D   N E I E   V A A   L R N   L K W T
1051 GAACGTCAAG CCGCAGGTCG ACCTGATCGA ATTCCCCAAG GGCAACCGCA
352   N V K   P Q V   D L I E   F P K   G N R
1101 TCATTCTTCT TTCCGAAGGT CGCCTGCTCA ACCTCGGCA  TGCCACGGG
368   I I L L   S E G   R L L   N L G N   A T G
1151 CATCCCTCCT TCGTGATGTC GCGTCCTTC ACCAACCAGA CGCTGGCCCA
385   H P S   F V M S   A S F   T N Q   T L A Q
1201 GATCGAGCTC TTCACCAAGC CCGGCCAGTA CGAGAACAAG GTGTATATCC
402   I E L   F T K   P G Q Y   E N K   V Y I
1251 TGCCGAAGCA CCTCGATGAG AAGGTCGCGC GCCTGCATCT CGACAAGCTC
418   L P K H   L D E   K V A   R L H L   D K L
1301 GGCGTGAAGC TTACTCAGCT CAGCGAAGAG CAGGCAGCCT ATATCGGCGT
435   G V K   L T Q L   S E E   Q A A Y   I G V
1351 GAAGCCGCAG GGTCCGTTCA AGTCCGACCA CTACAGATAT TGA
452   K P Q   G P F   K S D H   Y R Y   *

```

Posteriormente el gen *sahH*, que codifica a la proteína S-adenosilhomocisteinasa de *R. etli* CE3, se comparó con las secuencias identificadas para este gen en las Rhizobiaceas *A. tumefaciens*, *S. meliloti*, *M. loti*, y *B japonicum*. En la siguientes páginas se presenta esta comparación en la que (-) significa que son idénticas, (.) que no se encuentran, y las letras con minúsculas representan la diferencia entre estas secuencias (Figura 10).

Figura 10: Comparación de secuencias de *sahH* de las Rhizobiaceas

| | | |
|----------|--|-----|
| ORIGIN | | |
| SAHETLI2 | ATGAAAAAGATTATG.....TCGTCGCCGATATCGGGCTTGGCGACTTC | 44 |
| SMELISAH | ---gcgca-c-ca-gactat.....a-----c-----c----- | 51 |
| MLOTISAH | ---cggt-gc-a-gattat.....g-g-----c---tc-----c-g-gg | 51 |
| ATUMSAH | ---gccttgag-a-gactac.....a-----c---aac-----c-ca--- | 51 |
| BJAPSAH | ---cgc--agcccgcttcaccgattaca-----aag--c--ttc--c--c--t--- | 60 |
| SCERVSAH | ---cg-ctg-cgacaaccgacaggacttcaag-----cc--tcc--g--c-cg--- | 60 |
| SAHETLI2 | GGCCCAAGGAAATTACGATCGCCGAAACCGAAATGCCGGGCTGATGTCTGCCGCGCC | 104 |
| SMELISAH | -----cg-c-----g-----c-----g-----t-ag | 111 |
| MLOTISAH | -----c-cgat-----c-a--g-----ag | 111 |
| ATUMSAH | -----c-ggac-----c-----aag | 111 |
| BJAPSAH | -----c-ct-c-----g-g-----c--c-----g-ac---ag | 120 |
| SCERVSAH | -----g-c--cc-----gca--g-----c--c--g-gat---aag | 120 |
| SAHETLI2 | GAGTTTGGCGAGGCAAAGCCGCTGAAGGGCGCGCATCACCGGTTTCGTCGCACATGACC | 164 |
| SMELISAH | ---c---cat-g-----c-----c-----c----- | 171 |
| MLOTISAH | --a-c---ccaag-----c-----c---t---a | 171 |
| ATUMSAH | ---c-t---aagc-----a-t-----c-t-t---g | 171 |
| BJAPSAH | ---c--cc-aagc-----g-c-----g----- | 180 |
| SCERVSAH | ---ac-c---cc-----cgcc---c-g-----c-c----- | 180 |
| SAHETLI2 | ATCCAGACGGCCGTGCTGATCGAAACCCTGGTTGCGCTCGGCCGGAAGTCCGCTGGCGG | 224 |
| SMELISAH | -----c-----g-g-----t---g---t--- | 231 |
| MLOTISAH | -----c-g-----g-g-aag-----ta-----c | 231 |
| ATUMSAH | -----c-gt--t--c-----g-caaa-aa--g---g--a---c | 231 |
| BJAPSAH | -----c-gg-----g-g--ca-a-----ca-t-----t | 240 |
| SCERVSAH | g-g---c-g-----c---g---c-c-c-----g-----c | 240 |
| SAHETLI2 | TCGTGCAACATCTTCTCGACGCAGGATCAT...GCCGCTGCGGCGAT...GCCGCGCC | 278 |
| SMELISAH | -----c-----c-----c-cg-att---ag- | 285 |
| MLOTISAH | --c-----c---c-c...-c---gc-att---a--- | 285 |
| ATUMSAH | ---c-----t---c---c---g-a---gc-att---a-a--- | 285 |
| BJAPSAH | ---c-----at-----c-c...-t-c-c---gcg---t-g- | 297 |
| SCERVSAH | ---c-----c-c---c-cg-...-gcc-t...--- | 295 |
| SAHETLI2 |GGCGTTCCGGTTTTCGCCATCAAGGGCGAGTCGC | 312 |
| SMELISAH |a--c--c-----g-----a--- | 319 |
| MLOTISAH |a-----c---g-----agc- | 319 |
| ATUMSAH |a-----c-----g-----t--aagc- | 319 |
| BJAPSAH |att...-c-c-----g-----a--- | 328 |
| SCERVSAH | cgaa-cg-cacgccc-gaca-accg-cag---c-c-c---tg-...-a-c- | 355 |
| SAHETLI2 | TCGAGGATTACTGGTCTATACCGACAAGATCTCCAGT.GGCCGAT.....GGCG | 362 |
| SMELISAH | ---a--t---ac---c-----a-g-----ag- | 370 |
| MLOTISAH | ---ac-a--t---a-----cg-----g-g--c..... | 370 |
| ATUMSAH | -gaca--a--t---aa-----g-a----- | 370 |
| BJAPSAH | -gacc--a-----a--c---c---g-g--g-c-g-ca--gc..... | 379 |
| SCERVSAH | -----g-----tgg-gc--g-gc-gcg-gacc-g-c-ga-cacccccacc--- | 415 |
| SAHETLI2 | GCCTTCCAACATGATCCTCGATGATGGCGGCGACGCCACCATGTACATCTCTGCT...CG | 419 |
| SMELISAH | --g-c-g-----t---c-c-----g----- | 427 |
| MLOTISAH | ---c-----c-----c-----a.... | 427 |
| ATUMSAH | ---c-----c-----t-----t-----t | 427 |
| BJAPSAH | -t-a-c-g-----c---t--t-----g--at.... | 436 |
| SCERVSAH | ---cgaa--tg.....gacga-- | 439 |
| SAHETLI2 | GCGCCCGCGCGAAGCCGGC.....AGGACGTGCTCTCCA | 455 |
| SMELISAH | -----g-----a--a-t--ga-g- | 463 |
| MLOTISAH | -----c-----g----- | 463 |
| ATUMSAH | ---a-----t.....t---t---t--- | 463 |
| BJAPSAH | -tctg--t---gaa-----cac--cct--ct-g | 472 |
| SCERVSAH | ---gtga---accct-ct--tccacaagggcgtcgagtacgaga-----gcaaggt-c | 499 |

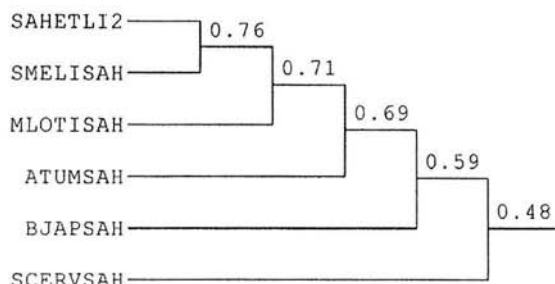
| | | |
|----------|--|-----|
| SAHETLI2 | ACCCG...CAT.....TCC.....GAA...GAAGAGGAAATCCTCTTCGCCCAGA | 494 |
| SMELISAH | -t---.ggc.....-gag-----t---g--- | 502 |
| MLOTISAH | -----g.....ag-----gag-----tatt-a---t---g | 502 |
| ATUMSAH | -t---.ggg.....g..gaa---gag---.atcc---g--- | 502 |
| BJAPSAH | --aa-cccggc.....gaggaa-ggaa-tctc.....g-ttc | 514 |
| SCERVSAH | c-t---gtcg-caccgccgag---gacgagc-ccgc-tc.....g-aact--tc- | 553 |
| SAHETLI2 | TCAAGAAGCGCCTTGCCGCTTCCCCGG.....GCTGGTTCACCAAGCAGCGCGAC | 544 |
| SMELISAH | -----c---ga-a-c-----g-----t--- | 552 |
| MLOTISAH | -----g-gaag---g-----tc-----aag-ct | 552 |
| ATUMSAH | ---c-----caag---c-----t-t | 552 |
| BJAPSAH | -g-----t-a-g | 531 |
| SCERVSAH | c-cgc-c-gt-ggc-agagcc-g-a-aagtggacca----cgtc-g-gatccgcg-t. | 612 |
| SAHETLI2 | GCC.....ATCAAGGGCGTCACCGAGGAA | 568 |
| SMELISAH | --g.....g-----a-g | 576 |
| MLOTISAH | --g.....cg-----a-g | 576 |
| ATUMSAH | --g.....t-g-----g-g-a- | 576 |
| BJAPSAH | -aaaagccgaaggctacttcgccgagatcgccaagagc-----tt---a-g | 591 |
| SCERVSAH |g | 624 |
| SAHETLI2 | ACCACGACCGGCTTAACCGCCTCTATCAGTTGA..GCCAGAAGGGCCTGCTGCCCTTC | 625 |
| SMELISAH | --g---g---c-----c---c-cc..aggcc----- | 633 |
| MLOTISAH | -g-c-----c---g---c-c-c..aga----- | 633 |
| ATUMSAH | --g-----c-t--tt-g-cg-tc-cg..c-a----- | 633 |
| BJAPSAH | ---c-g---gc-t--t---g-ca-cagaaggccggcagc---tgq... | 648 |
| SCERVSAH | -----cc-----g-cg-a-cacc-g-cggcac-----. | 681 |
| SAHETLI2 | CCGGCGATCAACGTCAACGATTCCGTCACCAAGTCGAAGTTCGACAACAAGTATGGCTGC | 685 |
| SMELISAH | -----cag-----t-----c----- | 693 |
| MLOTISAH | --c-c-----a----- | 693 |
| ATUMSAH | ---c-----cag---t-----a-c----- | 693 |
| BJAPSAH | -----cag-----c-----ctc----- | 708 |
| SCERVSAH | -----cg-g-----c----- | 741 |
| SAHETLI2 | AAGGAATCACTGGTCGACGGCATTCCGCCGGCACCACGCTGATGATGGCCGGCAAGGTC | 745 |
| SMELISAH | -----g--c-----c-----t----- | 753 |
| MLOTISAH | -----g-----c-t-----ac----- | 753 |
| ATUMSAH | -----g-c-----t-ca-----t----- | 753 |
| BJAPSAH | cg-t---g-----c-----t-g----- | 768 |
| SCERVSAH | cgcc-c-c---a-----caa---c-----cc---c-g-----ac- | 801 |
| SAHETLI2 | GCCGTCGTCTGCGGTTACGGCGACGTGGGCAAGGTT..TCCGCTGCCTCGCTCTCCGGC | 802 |
| SMELISAH | --g-g---c-----c-----c...-g-g-----ag--- | 810 |
| MLOTISAH | -g-----c-t-----c-----ctca-g---.aa-g--- | 810 |
| ATUMSAH | --g-----t-----tcc...-g-----gcag--t | 810 |
| BJAPSAH | --ga-g---gcg-c-t---c-----ctcgg...-gcg-cag | 825 |
| SCERVSAH | -----c-----c-----ctcgg-g-agt-ct-g-g-cag | 861 |
| SAHETLI2 | GCCGGCGCCCGCTCAAGGTTACGGGAAGCGGATCCGATC..TGTGCTCTGCAGGCCGCCA | 860 |
| SMELISAH | -----a-----c-----tc-c-----c-c-c-a-g--- | 868 |
| MLOTISAH | -----c-c-g-tc-c-----tg-c---gcag..-g-g- | 868 |
| ATUMSAH | -----g---c-a---atc-c-t---tgc-ca-tcaggccg... | 868 |
| BJAPSAH | -----tg---g-t---ct-c---tc-----tgc-c...-c-----g | 883 |
| SCERVSAH | ...-----g-tca-c-c-gatc-c-----tgc-cc...-g-g- | 916 |
| SAHETLI2 | TGGACGGGATGAAGTCGTGCTGCTCGAAGACGTCGTTTCGTGGCCGATATCTTATCA | 920 |
| SMELISAH | -----c-----c-a-----g-a-c-c-c----- | 928 |
| MLOTISAH | -----c-t---g---ac---g-----cg-ccc-a-c-----g----- | 928 |
| ATUMSAH | -----t-tc-g-g-t-gc-g-g---g---c-c----- | 928 |
| BJAPSAH | -----a-c-c-g-----acca-g-g---c-ccc-cgc---c-----g--- | 943 |
| SCERVSAH | -----c-tcc-g---accac---g-c-g---cgacaa-----c-----g--- | 976 |

| | | |
|----------|---|------|
| SAHETLI2 | CCACGACCGGCAACAAGGACGTCATCCGCATCGATCATATGCGGCAGATGAAGGACATGG | 980 |
| SMELISAH | -----c-----g-c-----cg----- | 988 |
| MLOTISAH | -----c-----g-ac-c-----c-----tc----- | 988 |
| ATUMSAH | -----c-----g-----g-----cg----- | 988 |
| BJAPSAH | -----g-----a-----ac-----g-c-----cg-----tcgc----- | 1003 |
| SCERVSAH | -----a-----atggc-a-gg-c-----gcc-----c-ca----- | 1036 |
| SAHETLI2 | CCATTGTCGGCAATATCGGCCATTTGACAACGAGATCGA.....AGTTGCAGCACTT | 1033 |
| SMELISAH | -g-c-----tc-----g-ct-g-g-a | 1041 |
| MLOTISAH | tg-c-----c-----c-----c-----g-c-ct-g-g | 1041 |
| ATUMSAH | -----c-----t-c-----c-----t-a-tc-----g-c-ct-g-g | 1041 |
| BJAPSAH | -----c-----t-----c-----c-----c-gatcgcgg-ctgc-t... | 1059 |
| SCERVSAH | -----c-----c-----c-----catggcgg-cct-gc-caga | 1096 |
| SAHETLI2 | CGTAACCTCAAGT...GGACGAACGTCAAGCCCGAGGTCG..ACCTGATCGAATTTCCCA | 1088 |
| SMELISAH | -----g-----g-----g-----g-----g-----g----- | 1096 |
| MLOTISAH | -----c-----t-----g-----a-----c-----a-----acc-----tg | 1096 |
| ATUMSAH | -----g-----g-----a-----a-----a-----g-----g----- | 1096 |
| BJAPSAH | ...-----g-----c-----a-----ga-----g-----g----- | 1111 |
| SCERVSAH | -----ccccggcatc-----caa-----g-----cac-----ga-ct-cc-gac | 1155 |
| SAHETLI2 | AGGGCAACCCGCATCATTCTTCTTCCGAAGGTCGCCTGCTCAACCTCGGCAATGCCACGG | 1148 |
| SMELISAH | -----c-----g-----g-----c-----c-----c-----c----- | 1156 |
| MLOTISAH | -----c-----g-----g-----c-----c-----c-----c-----t-----c-----c----- | 1156 |
| ATUMSAH | -----c-----g-----c-----c-----c-----g-----t-----c-----t-----c----- | 1156 |
| BJAPSAH | -----caagc-----ca-g-g-g-g-g-g-----cg-g-----c-g-t----- | 1171 |
| SCERVSAH | ...-----gggtgc-----cg-c-c-----g-c-----g-----g-----c-----c----- | 1213 |
| SAHETLI2 | GGCATCCCTCCTTCGTGATGTCGGCGTCTTCCACCAACCAGACGCTGGCCAGATCGAGC | 1208 |
| SMELISAH | -----g-----c-----a-----t-----gtt-----g----- | 1216 |
| MLOTISAH | -----c-----gag-----c-----gt----- | 1216 |
| ATUMSAH | -----t-----c-----g-----c-----a-----gt-----t-----g----- | 1216 |
| BJAPSAH | -----t-----g-----g-----g-----g-----g----- | 1231 |
| SCERVSAH | -----c-----c-----g-----g-----caac-----g-gg-----c----- | 1273 |
| SAHETLI2 | TCTTCAC.....CAAGCCCGGCCAGTACGAGAACAAGGTGTATATCCTGCCGAAGCACC | 1262 |
| SMELISAH | -----g-----g-----g-----g-----a-----g-----t-----cg-g-----g----- | 1270 |
| MLOTISAH | -----g-----g-----g-----aa-----c-----c-----c-----c-----t----- | 1270 |
| ATUMSAH | -----t-----g-----g-----g-----tg-a-----a-----g-a-t-----cg-g----- | 1270 |
| BJAPSAH | -----g-----g-----caacaa-----ga-----a-----g-g-a-c-----cg-g-----ac----- | 1291 |
| SCERVSAH | -----g-----caagcc-g-cg-----cc-----c-g-c-c-----cg-g-----c----- | 1327 |
| SAHETLI2 | TCGATGAGAAGGTCGCGCCTGCATCTCGACAAGCTCGCGCTGAAGCTTACTCAGCTCA | 1322 |
| SMELISAH | -----c-----g-----c-----c-----cc-----g-----cg-----t | 1330 |
| MLOTISAH | -----c-----a-----c-----c-----cagc-g-cg-a-gt | 1330 |
| ATUMSAH | -----c-----c-----c-----g-----t-----cg-----a-----cg-a-----t | 1330 |
| BJAPSAH | -----c-----c-----c-----c-----a-----c-----c-----cg-----gc | 1351 |
| SCERVSAH | -----g-c-----c-g-c-c-----tcc-----c-----g-cac-----c | 1387 |
| SAHETLI2 | GCGAAGAGCAGGCAGCCTATATCGGCGTGAAGCCGAGGGTCCGTTCAAGTCC..... | 1375 |
| SMELISAH | cg-g-a-ct-t-c-a-g-----g----- | 1383 |
| MLOTISAH | cg-gt-c-c-----c-c-----c-g----- | 1383 |
| ATUMSAH | c-cctt-at-a-ctccaa-----g-t----- | 1383 |
| BJAPSAH | -----a-g-c-----c-a-----a-g-----g----- | 1393 |
| SCERVSAH | -----ccg-----c-a-----c-----gt-gagggcc | 1429 |
| SAHETLI2 |GAC.....CACTACAGATATTGA | 1393 |
| SMELISAH |-a-----c-g-c-a | 1401 |
| MLOTISAH |-a-----c-c-a | 1401 |
| ATUMSAH |-a-----a | 1401 |
| BJAPSAH |cgtacaagagcgat-----c-c----- | 1422 |
| SCERVSAH | cctacaagggc-----cactaccgcta-tga | 1458 |

ABR: SAHETLI2: gen reportado en este trabajo para *Rhizobium etli*; SMELISAH: *sahH* de *Sinorhizobium meliloti*; MLOTISAH: *sahH* de *Mesorhizobium loti*; ATUMSAH: *sahH* de *Agrobacterium tumefaciens*; BJAPSAH: *sahH* de *Bradyrhizobium japonicum* y; SCERVSAH: *sahH* de *Saccharomyces cerevisiae*.

Este alto grado de similitud nos posibilita afirmar que la secuencia del ORF identificado como *sahH* es la secuencia de este gen para *R. etli*, en específico de la cepa CE3; y que el gen de *sahH* es un gen conservado que comparten los diferentes géneros de las Rhizobiaceas. En la figura 10 se presenta la divergencia entre las secuencias ya presentadas de forma gráfica.

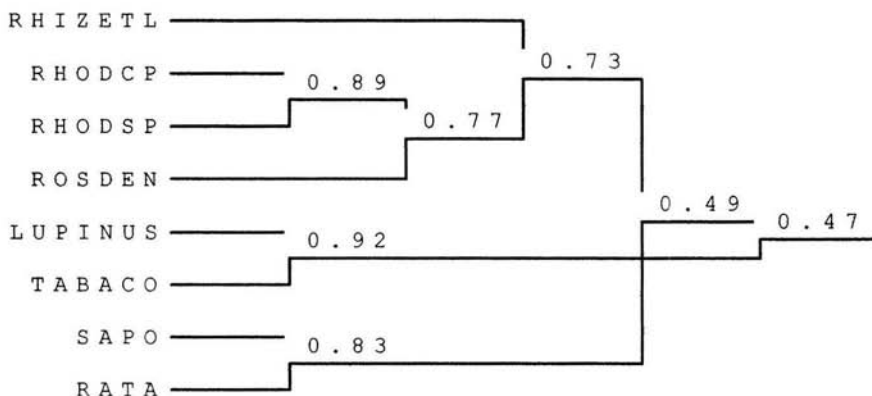
Figura 10: Dendograma de las secuencias de adenosilhomocisteinasa



Comparación de secuencias de *sahH* de diversos reinos contra la de *Rhizobium etli*

| | |
|---|--|
| RHODSP = <i>Rhodobacter sphaeroides</i> Bases= 463 | Id=380/462 (82%), Pos=419/462 (90%), Gap= 2/462 (0%) |
| RHODCP = <i>Rhodobacter capsulatus</i> , Bases = 463 | Id=377/462 (81%), Pos=414/462 (89%), Gap= 2/462 (0%) |
| ROSDEN = <i>Roseobacter denitrificans</i> Bases = 462 | Id=376/462 (81%), Pos=417/462 (89%), Gap= 2/462 (0%) |
| LUPINUS = <i>Lupinus luteus</i> Bases = 485 | Id=294/474 (62%), Pos=357/474 (75%), Gap= 12/474(2%) |
| TABACO = <i>Nicotania silvestris</i> , Bases = 485 | Id=295/474 (62%), Pos=358/474 (75%), Gap= 12/474(2%) |
| Sapo = <i>Xenopus laevis</i> , Bases = 433 | Id=271/468 (57%), Pos=323/468 (68%), Gap= 37/468(7%) |
| RATA = <i>Rattus norvegicus</i> , Bases = 432 | Id=274/468 (58%), Pos=329/468 (69%), Gap= 38/468(8%) |

Dendograma diferentes secuencias de *sahH* de diferentes reinos



Los datos obtenidos nos permiten observar que:

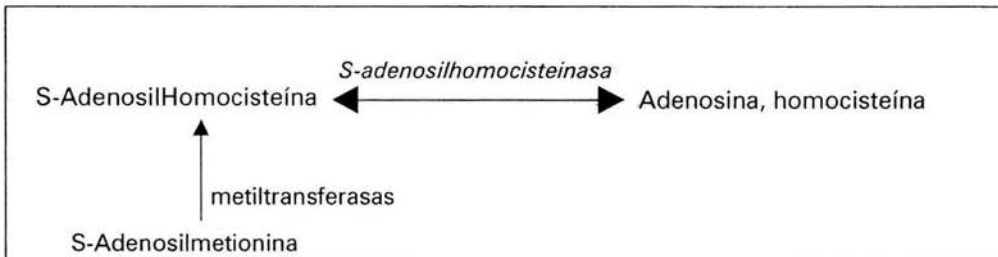
- El gen donde se insertó Tn5 en LM13 se identifica como *sahH* que codifica a la proteína S-Adenosilhomocisteínasa (EC 3.3.1.1).
- La secuencia de este gen es altamente conservada.
- Este gen de 1400 bases se encuentra en el fragmento pGDM18.26 desde su base 1578 hasta la 2978; y es idéntico al que presenta AC20.
- El Tn5 se insertó entre las bases 331-332 del gen de *sahH*, lo que provocó que este gen no se exprese funcionalmente en la mutante LM13.
- El gen *sahH* de *R. etli* contiene un sitio de corte de *EcoR1* en las bases 1086 a 1091, lo que concuerda con el requerimiento de una digestión parcial para obtener un fragmento que complementara la función.
- La secuencia de aminoácidos de *sahH* tiene una longitud de 441 aminoácidos.
- Se requiere determinar la actividad de SahH, en las cepas CE3, LM13 y LM13+ pGDM18.26, para corroborar los resultados vertidos por la estrategia de biología molecular en cuanto a la localización de la mutación.

LA S-ADENOSILHOMOCISTEINASA

La S-adenosilhomocisteinasa (también llamada S-adenosilhomocisteína hidrolasa, SahH) participa en la síntesis de los aminoácidos sulfurados, necesarios en el metabolismo del cobre, así como en el ciclo de la metionina. SahH ha sido detectada en gran variedad de organismos excepto en algunos procariontes de las familias Enterobacteriaceae (*E.coli*), Bacillaceae, y Micrococcaceae que hidrolizan a SAH produciendo adenosina y

ribosilhomocisteína. La S-adenosilhomocisteinasa se encuentra como un tetrámero en mamíferos y algunas plantas, en dímeros como en *Lupinus* o hexameros como en *Alcaligenes faecalis*. Las subunidades son idénticas y varían su peso molecular de entre 48 000 hasta 55 000 daltones.⁷⁰

La actividad de esta enzima es la hidrólisis reversible de la S-adenosilhomocisteína (SAH) y libera como productos adenosina y homocisteína. Esta reacción *in vivo* se realiza en dirección de la hidrólisis cuando los productos, adenosina y homocisteína, son removidos rápidamente. Sin embargo, esta enzima tiene una constante de equilibrio (K_{eq}) que favorece, por mucho, a la síntesis de SAH; por lo que la hidrólisis de SAH en condiciones fisiológicas es posible debido a la transformación eficiente y rápida de los productos de la reacción hidrolítica,⁷¹ incluso se ha observado que SahH puede ser inhibida en presencia de homocisteína, adenosina o inosina.⁷²



Palmer y Ables en 1979 dilucidaron el mecanismo enzimático de Sah H⁷³. Descubrieron que cada subunidad contiene una molécula de NAD⁺, que es usada en una oxidación interna - reducción del 3'C del nucleósido del sustrato. Posteriormente se reportó que el NADH, NADP, el ATP, y el AMP, compiten por el sitio del NAD⁺ y, al desplazarlo, inhiben la actividad enzimática de SahH.^{74, 71}

La S-adenosilhomocisteinasa SahH tiene gran afinidad por el cobre (similar a la de la albumina 5.8×10^{-17}) por lo que podría participar en la regulación de las concentraciones de este metal en el citoplasma, lo que todavía necesita ser ampliamente investigado.⁷⁵

La reacción de la S-adenosilhomocisteinasa

Para cerciorarnos que la mutación se encuentra en el gen de la S-adenosilhomocisteínasa, medimos su actividad específica en la dirección de síntesis en el HPLC, como se menciona en la última sección de material y métodos, comparando las concentraciones de homocisteína, inosina y adenosina en los tiempos de reacción 0, 15, 20 y 40 min.*

* Las dificultades para trabajar con la S-adenosilmetionina SAM hicieron imposible lograr el experimento en la dirección hidrolítica. (Alto costo, problemas de préstamo de equipo en funcionamiento y tiempo de entrega del metabolito)

Actividad específica de S-adenosil homocisteínasa

Adenosina+ homocisteína \longrightarrow S-Adenosilhomocisteína

| CEPA | Adenosil homocisteína (síntesis) |
|---------------|----------------------------------|
| CE3 | 61.39 \pm 5.6 |
| LM13 | No detectable |
| CE3+pMGD18.26 | 135.31 \pm 24.9 |

La actividad se determinó a las 14 horas de crecimiento en medio Py
Expresada en nmoles/min/mgP

Este experimento nos permite concluir que:

- La cepa mutante LM13 de *R. etli* no presenta actividad de S-adenosilhomocisteínasa, por lo que es una mutante nula de *sahH*.
- Se verifica que la mutación que presenta LM13, provocada por la inserción del Tn5, está localizada en el gen de la S-adenosilhomocisteínasa.
- R. etli* cuenta con una sola copia activa del gen de S-adenosilhomocisteínasa en su genoma.
- La ausencia de actividad de SahH no es mortal para *R. etli*.
- La cepa CE3+pGDM18.26 de *R. etli* presenta el doble de actividad de S-adenosilhomocisteínasa comparada con la cepa silvestre CE3.

EL CICLO DE LA METIONINA

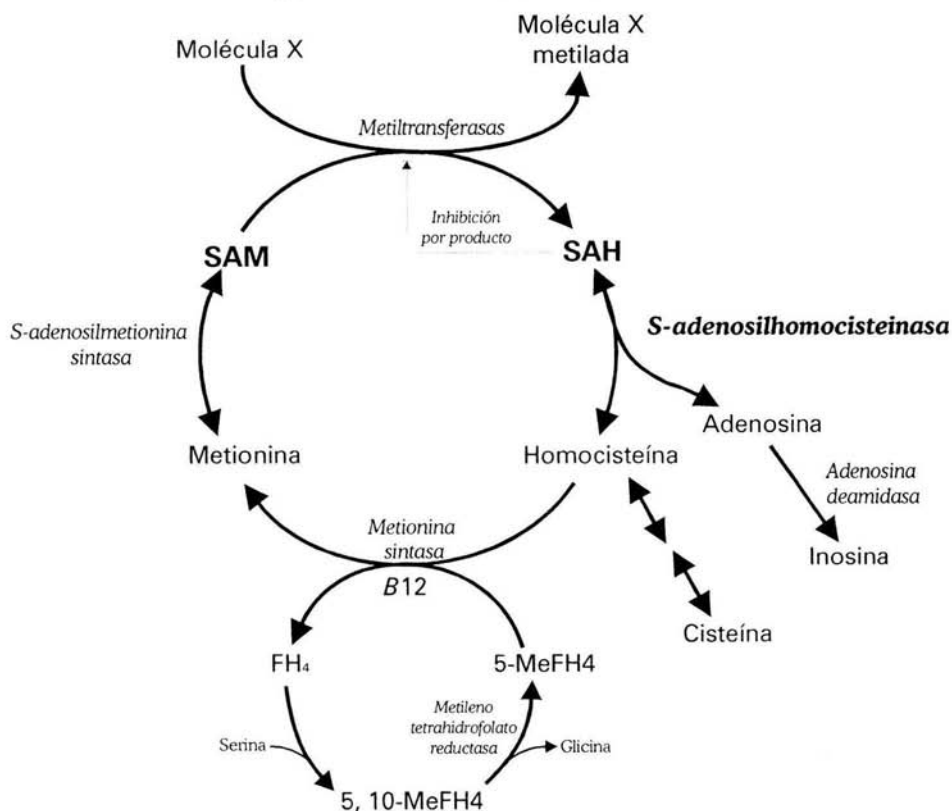
La S-adenosilhomocisteínasa es parte del metabolismo que se ha denominado como *El ciclo de la metionina* (figura 11). Los metabolitos de este ciclo están involucrados en la síntesis de aminoácidos sulfurados, el ciclo de los folatos, el mantenimiento de la poza de metionina y en la metilación de biomoléculas, principalmente; por lo que nos detendremos brevemente en cada uno de ellos para observar su importancia.

S-adenosilhomocisteína (SAH)

SAH es uno de los productos de todas las reacciones de transmetilación que tienen como sustrato S-Adenosilmetionina (SAM). La afinidad de las metiltransferasas por SAH es mayor que la afinidad que tienen por SAM, por lo que es un inhibidor competitivo de las metiltransferasas, cuyas actividades dependen de la concentración ambos metabolitos. Por lo tanto, la regulación mediada por el disminución en la relación de concentración de

SAH/SAM deriva en hipometilación de DNA, RNA, proteínas, carbohidratos, lípidos, etc. Además, la inhibición de diferentes metiltransferasas varía en un rango de 1000 veces, lo que marca que hay una jerarquía en la inhibición de estas enzimas y por lo tanto de las acciones que ellas realizan. Como ejemplos, las actividades de las metiltransferasas de DNA en bacterias se encuentran reguladas por la concentración de SAH/SAM⁷⁶; y en el tabaco se ha demostrado que SAH participa en la inhibición de la metilación de genes y se observan diferentes grados de metilación dependientes de su concentración, lo que hace que se proponga que el rango de concentración SAH/SAM actúa como un sensor del metabolismo en la regulación de la expresión genética.⁷⁷ Por último, en bacterias se ha demostrado que la adaptación de la quimiotaxis es controlada por la metilación de los productos de los genes *tar* y *tsr* controladas por la relación SAH / SAM.⁷⁸

Figura 11: El ciclo de la metionina



Vía metabólica que muestra el acoplamiento del Mecanismo de metilación, la síntesis y la biodegradación de SAH. La pronta transformación de la adenosina por ADA y de la homocisteína provocan que la reacción mantenga la dirección hidrolítica. Abreviaciones: FH4, tetrahidrofolato; 5-10-MeFH4, 5-10 metileno tetrahidrofolato; 5-MeFH4, 5-metil tetrahidrofolato; B12, Vitamina B12 cofactor de la metionina sintetasa.

Homocisteína

La homocisteína es un aminoácido que no forma parte de las proteínas y es un punto de intersección entre dos vías metabólicas: El ciclo de la metionina y la secuencia de transulfuración. En el ciclo de la metionina, la homocisteína es producto de la hidrólisis de SAH, es un sustrato para la síntesis de metionina y es un importante metabolito en el reciclaje de los folatos, ya que la reacción de la metionina sintasa es la única reacción que utiliza el metiltetrahidrofolato, y en ausencia de homocisteína o de la enzima, los folatos quedan "atrapados" en esta forma. Otra vía de remetilación de la homocisteína es donde la betaína se utiliza como donador del grupo metilo en una reacción catalizada por la betaína-homocisteína metiltransferasa.^{78,79}

La transulfuración provee una vía para eliminar el exceso de metionina o de los metabolitos del ciclo, donde la homocisteína es un precursor de cistatión, cisteína y otros metabolitos sulfurados.^{79, 79, 81} En esta vía, la homocisteína se condensa con serina formando cistationina, reacción catalizada por la cistationina B sintasa. La cistationina es hidrolizada por la γ -cistationasa (EC 4.4.1.1), produciendo cisteína y α -cetobutirato. La cisteína, a través de dos reacciones consecutivas con glutamato y glicina, participa en la síntesis de glutatión que es la molécula primaria de la defensa antioxidante en las células de mamíferos.⁸³ Otra vía de degradación es la deaminación de homocisteína.⁸¹

La homocisteína, por ser un metabolito pivote entre diferentes vías, presenta una regulación metabólica muy estricta. La metionina sintasa tiene una baja afinidad por homocisteína y la cistation B-sintasa tiene una alta afinidad; es decir que, a bajas concentraciones de homocisteína se favorece la síntesis de metionina, y a altas concentraciones se asegura su eliminación por la vía de transulfuración.^{78,80}

La síntesis de novo de homocisteína para la síntesis de metionina, usa la vía de biosíntesis de aminoácidos derivados de aspartato que produce homoserina, que a su vez produce homocisteína y entonces, en reacción con el metiltetrahidrofolato, sintetiza metionina. Recientemente se ha reportado una vía para la síntesis de metionina desde homocisteína que tiene como intermediario la homocisteína tiolactona.⁷⁹

Metiltetrahidrofolato

El tetrahidrofolato es un metabolito que puede acarrear y donar grupos metilo, sin embargo su potencial de transferencia no es suficiente para realizar la mayoría de las metilaciones biosintéticas, que son realizadas por SAM. En un ciclo denominado como el *ciclo de los folatos*, la homocisteína es remetilada para sintetizar metionina por la transferencia de un grupo metilo desde el N-5-metiltetrahidrofolato, catalizada por la metionina sintasa (N-5-metiltetrahidrofolato-homocisteína metiltransferasa), que requiere de la vitamina B₁₂ como cofactor. El tetrahidrofolato producido puede reducir un átomo de carbono desde una serina en la posición N-5 y/o N-10, produciendo N5,N10 metilene-

tetrahidrofolato y glicina. El ciclo del folato termina con la reacción catalizada por la enzima metileno tetrahidrofolato reductasa para producir N5-metiltetrahidrofolato, que puede metilar nuevamente una molécula de homocisteína.⁷⁹

Metionina

La metionina es un aminoácido que forma parte de la estructura de las proteínas y es el que se utiliza para iniciar la transcripción genética. Las concentraciones de metionina están íntimamente relacionadas con el metabolismo de la homocisteína. Cuando el cuerpo requiere metionina, la homocisteína es remetilada; pero cuando la metionina se encuentra en exceso la homocisteína es catabolizada por la vía cistationina-B-sintetasa.⁸¹

En *E. coli* los genes involucrados en la síntesis de metionina (*met regulon*) se encuentran bajo una estricta regulación mediada por la proteína *MetJ*, y por S-adenosilmetionina SAM que funciona como co-represor; también se ha reportado un transactivador *MetR* que es modulado por la concentración de homocisteína.⁸²

S-Adenosilmetionina SAM^o

La S-adenosilmetionina (SAM) es sintetizada a partir de la metionina a través de la metionina adenosiltransferasa (Mat) (EC2.5.1.6), en una reacción en 2 pasos dependiente de ATP. Mat es una enzima excepcionalmente conservada, mostrando entre *E.coli* y el hombre una identidad del 59% y existe en todos los organismos que se han estudiado genómicamente.⁸³

SAM, por sus cualidades químicas dadas por la posición de alta energía de su átomo de azufre, tiene la posibilidad de participar en dos tipos de reacción: aminopropilación y transmetilación (la transulfuración se realiza directamente a través de la homocisteína).

En la transferencia del grupo propilamina de SAM para la síntesis de poliaminas, SAM es descarboxilada por SAM descarboxilasa (EC 4.1.1.50) y su grupo aminopropil es transferido, primero a putrescina y entonces a espermidina, para formar poliaminas. En condiciones normales en humanos, esta vía representa menos del 5% del metabolismo de SAM, sin embargo este porcentaje aumenta en condiciones de elevada síntesis de poliaminas como ocurre durante la regeneración del hígado.⁸³

En las reacciones de transmetilación SAM es el donador universal de grupos metilo a una gran variedad de aceptores, incluyendo los ácidos nucleicos, proteínas, fosfolípidos y aminas. A su vez, el producto de todas estas reacciones es la S-adenosilhomocisteína SAH. La mayoría de las reacciones de metilación dependientes de SAM, son inhibidas por incrementos de SAH y disminuciones de SAM (en su concentración).⁸³

^o SAM ha sido ampliamente estudiada desde su caracterización química realizada en 1952 por Cantoni.

METILACIÓN

La metilación de compuestos en los seres vivos es de suma importancia. Este fenómeno se ha encontrado en todos los seres vivos estudiados hasta el momento (con la excepción de algunos nemátodos y una levadura). Este proceso es realizado por las metiltransferasas que sustituyen con un grupo metilo una parte de la estructura de un compuesto orgánico. Estas sustituciones, CH_3 por H principalmente, se encuentran en el metabolismo de carbohidratos, aminoácidos, lípidos, etc., y en la modificación de proteínas, DNA, etc.

En procariotos y eucariotos, la metilación de DNA afecta su interacción con proteínas, puede inhibir la transcripción y generalmente inactiva al gen; sin embargo, su hipometilación conlleva inestabilidad en los cromosomas y puede provocar mutaciones.

La metilación de proteínas también es un importante mecanismo en la modificación de sus funciones. Esta metilación se ha relacionado con la reparación y degradación de proteínas que contienen residuos anormales de D-aspartil que aparecen espontáneamente por el fenómeno de racemización.

La metilación de fosfolípidos es importante para el mantenimiento de las membranas celulares: con la inserción de tres grupos metilo -proporcionados desde moléculas de SAM- la fosfatidiletolamina es transformada en fosfatidilcolina. La fluidez o la viscosidad de las membranas, lo que determina la posibilidad de movimiento horizontal de proteínas y receptores, está relacionada a la concentración de fosfatidiletolamina/fosfatidilcolina (a mayor fosfatidiletolamina mayor fluidez o menor viscosidad en la membrana celular).⁸⁴

Una última observación de su importancia es que, las metiltransferasas son específicas en su sustrato, en el proceso metabólico o del ciclo de vida de la célula y, en el tejido en el que se presentan (en el caso de los organismos diferenciados tisularmente), y su actividad es exquisitamente regulada por gran variedad de cofactores. En conjunto, las metiltransferasas involucran un gran número de moléculasceptoras y su actividad está regulada desde lo genético, hasta en su activación o inactivación inmediata dadas las condiciones de la situación celular.⁸⁶ Todo ello indica que, las metiltransferasas son uno de los mecanismos de comunicación intracelular más importantes, más variados y versátiles de los seres vivos, y que aún quedan muchísimas preguntas por responder en relación al papel que realizan en la gran "obra" de la vida como acto de comunicación.

Las metiltransferasas de DNA usan SAM (S-adenosilmetionina) como donador del grupo metilo y se han agrupado para su estudio en:

1. Metiltransferasas asociadas a sistemas de restricción-modificación de DNA: La función de estas enzimas es proteger al DNA propio de la digestión con enzimas de restricción y permite reconocer el DNA propio de aquellos que son reconocidos como extraños. Entre estas enzimas se encuentra la **familia Dcm** (metilan el C-5 de la segunda citocina de las secuencias CC(A/T)GG).

2. Familia DAM^{85,86,87} (metilan el N-6 de la adenina en la secuencia GATC): la metilación por DAM puede alterar las interacciones de proteínas regulatorias con el DNA (puede inhibir o incrementar la transcripción), ya sea por un efecto estérico directo o por la modificación del plegamiento del DNA (indirecto). Las DAM se han denominado dentro del grupo de las α -metilasas por su secuencia. Bacterias mutantes en DAM no tienen regulación por DMP's (patrones de metilación), lo que altera la unión de proteínas regulatorias al DNA en diferentes regiones del cromosoma, por lo que ocurre sobreexpresión de aquellos genes que requieren no estar metilados para su expresión o que requieren de la metilación para la unión del represor y, la ausencia o disminución de aquellos que requieren estar metilados para la unión del activador o enhancer. La sobreexpresión de DAM favorece la metilación por lo que también varía la expresión genética. En diferentes patógenos se ha encontrado que las DAM pueden ser esenciales o no, sin embargo en todos los estudiados, las DAM controlan la virulencia.

3. Familia CCRM^{88,89,88} (metilan el N-6 de adenina de la secuencia GAnTC y no tienen enzimas de restricción asociadas): Todas las CCRM y sus homólogos reportadas hasta la fecha, se han identificado como esenciales para la vida y no están asociadas a enzimas de restricción. Las CCRM se han encontrado en *Caulobacter crescentus*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Sinorhizobium meliloti* y *Brucella abortus* y otras 20 alfa proteobacterias. Las CCRM por su secuencia se agrupan en las metilasas β y se ha propuesto que las CCRM actúan como reguladores globales de la expresión genética porque su inapropiada expresión resulta en morfología anormal e interrupción en el control de la replicación cromosomal, que resulta en aneuploidía (cromosomas múltiples).

La expresión de CCRM está controlada por CtrA (cell cycle transcriptional regulator A) que tiene un papel fundamental en la replicación de cromosomas y previene la iniciación de la replicación de DNA. La transcripción de *ccrM* se encuentra en un estricto control temporal que encuentra su máximo en la fase tardía de la fase S y es removida rápidamente por la proteína Nol (proteasa y chaperona) justo antes de que inicie la división celular. La metilación de CcrM juega un rol en la inhibición de la transcripción de *ccrM*, y a altas concentraciones de CtrA vuelve a iniciarse la transcripción en la fase S del ciclo celular.

En el genoma de *R. etli* es muy probable que se encuentren metiltransferasas de DNA de las tres familias antes mencionadas, así como metiltransferasas que actúen sobre proteínas, lípidos, carbohidratos, etc., y es probable que en la mutante LM13, estas enzimas tengan alteradas su expresión o actividad como un efecto de la mutación en el gen de *sahH*, por lo que es relevante mencionarlas en este capítulo.

Sin embargo, los efectos de la mutación de *sahH* en LM13 resultan en diferentes observaciones que se discuten a continuación.

DISCUSIÓN

Sah H es una proteína altamente conservada

La secuencia del gen de *sahH* de *R. etli* presenta un alto grado de similitud con las secuencias reportadas en especies de los diferentes reinos: 90% con las bacterias, 75% con las plantas y 68% con los mamíferos. Lo que me lleva a apoyar la teoría donde el requerimiento de mantener su estructura primaria para funcionar apropiadamente, es el mecanismo por el cual se explica la reducida divergencia entre las secuencias reportadas⁸⁹ y desestimo la teoría de la transferencia desde un eucarioto, realizada para *R. capsulatus* por ser una bacteria morada que son identificadas como ancestros de las mitocondrias. Queda por definir la transferencia del gen para *sahH* entre los diferentes ancestros evolutivos ya que se presenta en una gran diversidad de seres vivos (como excepción encontramos a *E. coli* y algunas bacterias emparentadas que no presentan este gen).

***sahH* no es un gen esencial en *R. etli* en vida libre**

La capacidad de LM13 de crecer en vida libre utilizando una gran variedad de fuentes de carbono y nitrógeno, nos lleva a demostrar que la ausencia de la actividad de SahH no es letal y que la célula podría tolerar una alteración en el rango de concentración SAM/SAH. Estos datos corroboran el comportamiento de la mutante de *R. capsulatus* y los experimentos con inhibidores de SahH con *Alcaligenes faecalis* y macrofagos de ratón, donde la mutación o la inhibición no es letal.⁹⁰ Sin embargo en contradicción con estos reportes, LM13 no requiere la adición de homocisteína o metionina para sobrevivir en medios mínimos, lo que expone que *R. etli* puede sintetizar *de novo* metionina u homocisteína. Es probable que la cepa LM13 cuando se usa glutamina o glutamato como fuente de carbono y nitrógeno, no pueda sintetizar estos aminoácidos, lo que puede deberse a que las vías de síntesis de metionina y homocisteína se encuentran inhibidas o bien no se encuentran por efecto de la mutación.

sahH* es un gen esencial para la simbiosis de *R. etli* con *P. vulgaris

La mutante LM13 nodula en un 5% y no fija nitrógeno, por lo que la mutación en *sahH*, induce efectos negativos en el establecimiento de la simbiosis. Diferentes trabajos de los factores de nodulación denotan la importancia de las diferentes sustituciones en la especificidad de la relación simbiótica. En el caso de *R. etli* los factores Nod presentan una metilación en la posición R1 y se realiza por la acción de NodS que es una metiltransferasa dependiente de S-adenosilmetionina⁹¹. Es probable que la actividad de NodS se encuentre inhibida (parcial o totalmente por la disminución en la concentración de SAM/SAH) y no se pueda establecer una comunicación eficiente con la planta por esta causa. También es

probable que el cambio en el ciclo celular, necesario para establecer la relación simbiótica, se encuentre alterado por la inhibición de metiltransferasas, lo que puede ejercer cambios en la expresión genética del bacteroide.

La mutación de *sahH* induce cambios en el metabolismo celular

La cepa LM13 de *R. etli* presenta una mutación en el gen de *sahH* que codifica para la enzima S-adenosilhomocisteinasa y no presenta actividad alguna de esta enzima. En nuestro conocimiento LM13 es la primera mutante de SahH en las Rhizobiaceas y la segunda descrita en procariotos y eucariotos. La primera descrita es una mutante de *Rhoseobacter capsulatus*, obtenida y descrita Michael Sganga y Carl Bauer en 1992.

La mutante de *R. capsulatus* de *sahH* requiere la adición de metionina u homocisteína para crecer en medios mínimos, acumula 16 veces más S-adenosilhomocisteína que la cepa silvestre y presenta una disminución en la producción de bacterioclorofila. Este último fenómeno se propone que se debe al cambio en la concentración de SAM/SAH.⁹²

La cepa LM13 no puede crecer en medios mínimos cuando usa como fuente de carbono y nitrógeno, glutamato y glutamina, y reduce su crecimiento en alanina, sin embargo al añadir una fuente de carbono alternativa (succinato o glucosa) mostró un crecimiento similar a la cepa silvestre, no se detectó actividad de S-adenosilhomocisteinasa, y no nodula ni fija nitrógeno; lo que proponemos se debe a que:

- a) La mutación en *sahH* interrumpe el ciclo de la metionina,
- b) La mutación en *sahH* afecta el catabolismo de glu, gln y ala, en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA),
- c) La mutación en *sahH* induce un cambio en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, o
- d) El probable cambio en la concentración de SAM/SAH puede inhibir algunas reacciones de transmetilación, los efectos de algunas de ellas involucradas en el establecimiento de la simbiosis y/o en alguna sección del metabolismo.

A) Efectos en el ciclo de la metionina

La cepa LM13, al tener interrumpido el ciclo de la metionina por la mutación en *sahH*, tendría que producir homocisteína y metionina *de novo* para mantener funcionando este ciclo. En *R. etli* se ha encontrado una mutante de O-succinil sulfidrilasa que requiere que se le adicione metionina, cistationina u homocisteína para crecer pero no O-succinilhomoserina u homoserina, lo que nos ayuda a comprender que la síntesis de metionina en *R. etli* CE3 se realiza por esta vía⁹³; además esta cepa no nodula, de manera similar que LM13.

El comportamiento de nuestra cepa LM13 puede deberse a la acumulación intracelular de gln y glu, lo que podría inhibir las vías de síntesis de metionina y cisteína (precursor de homocisteína) por su papel central como reguladores del metabolismo de aminoácidos azufrados. Se requerirá realizar curvas de crecimiento donde se adicionen precursores de la metionina y de SAH para reconocer el estado de la vía de síntesis de metionina.

B) Efectos en el catabolismo de glutamato, glutamina y alanina

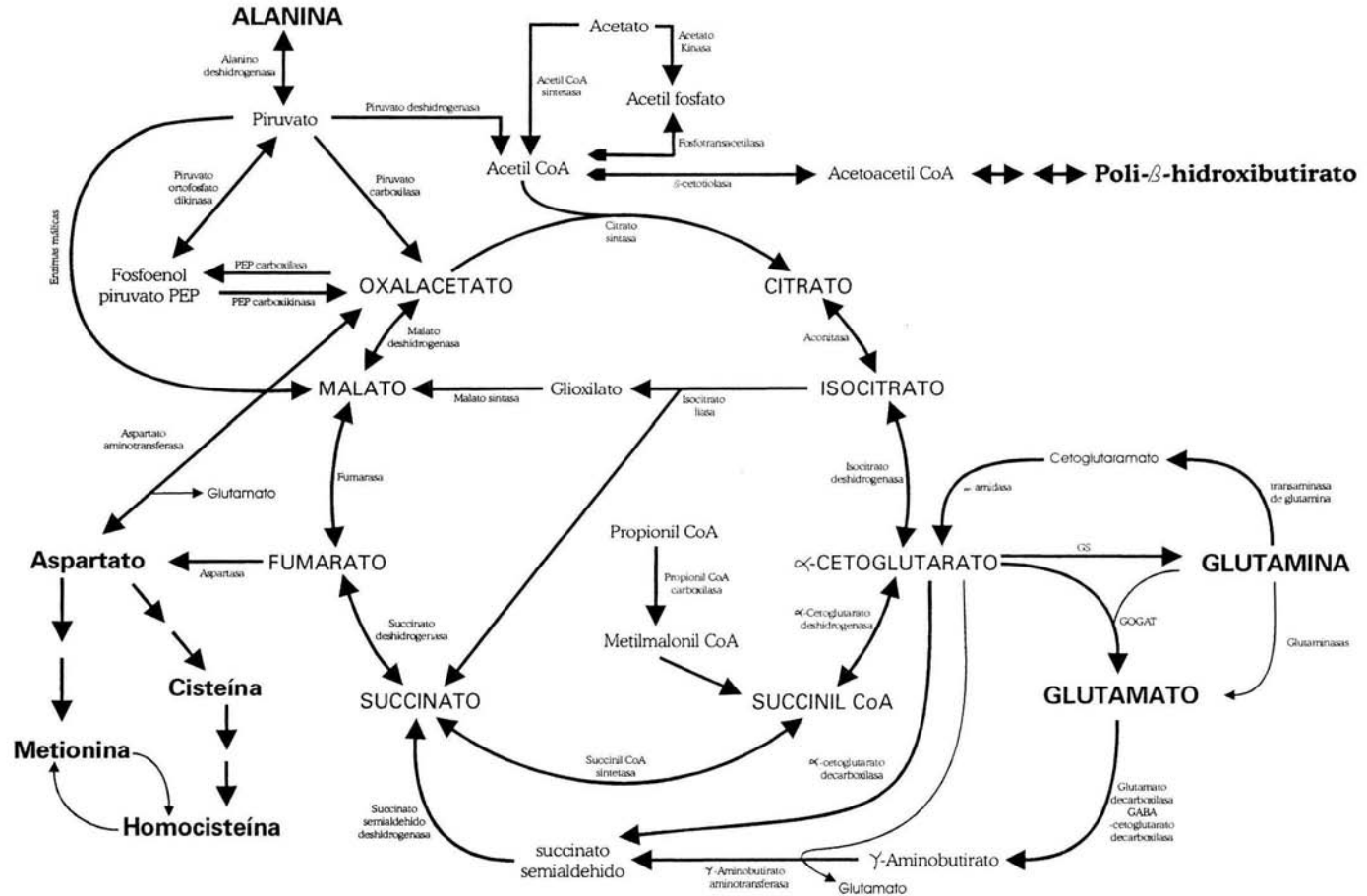
La cepa LM13 no puede crecer cuando usa, como fuente de carbono y nitrógeno, glutamina, glutamato y disminuye su tasa de crecimiento cuando usa alanina, mas al añadir succinato o glucosa con alguno de los aminoácidos anteriores normaliza su crecimiento; y acumula principalmente glutamato, y un poco de glutamina, en su poza intracelular de aminoácidos. Todo esto señala que la cepa LM13 puede transportar aminoácidos y puede utilizarlos como fuente de nitrógeno, pero presenta problemas en su utilización como fuentes de carbono; y que el sistema de transporte de dicarboxilatos y glucosa funciona eficientemente. Por lo que podemos descartar, en la cepa LM13, hipótesis alrededor de un defecto sustantivo en sistemas de transporte y mantener aquellas relacionadas al catabolismo de glu, gln y ala, y su efecto en el ciclo de Krebs.

En las Rhizobiaceas la glutamina puede degradarse a glutamato o a α -cetoglutarato,⁶⁰ el glutamato puede catabolizarse a través del sistema GABA (Glutamato decarboxilasa)³⁸ a succinato o al desaminarse libera α -cetoglutarato; y la alanina al desaminarse libera piruvato.⁴³ El piruvato es un precursor del ciclo de los ácidos tricarboxílicos TCA, mientras que el α -cetoglutarato y el succinato forman parte de él, por lo que puede observarse que este ciclo está íntimamente relacionado con el fenotipo de la cepa LM13. (Figura 12⁹⁴)

En la presente investigación los datos del catabolismo de glutamina realizado por las glutaminasas es similar en la cepa LM13 que en la cepa silvestre⁵⁹. En la síntesis de glutamina por las GS's se encontró una pequeña disminución en GSI, que puede deberse a la acumulación de glutamina o a bajas concentraciones de α -cetoglutarato, pues GSI se encuentra presente cuando el rango de concentración α -cetoglutarato/ glutamina es alto; y en GSII encontramos que la diferencia entre las actividades no son significativas lo que puede relacionarse a la acumulación de glutamina.⁶⁹ Queda por establecerse el papel de la transaminasa de gln- ω -amidasa en el catabolismo de gln, pues aunque pueda considerarse un ciclo futil respecto a la asimilación de amonio, no lo es en relación a los aminoácidos producidos y al α -cetoglutarato liberado, por lo que puede tener relevancia en la interacción del TCA y la síntesis de aminoácidos.³⁸

En relación al catabolismo de alanina, no se observó actividad de alanino deshidrogenasa (ADH) catabólica (dependiente de NAD⁺) en LM13, mas la cepa silvestre mostró una actividad de alrededor de 1.2^{+2} nmol/min/mgProt., lo que no es una actividad significativa para sostener el crecimiento en alanina como fuente de carbono y nitrógeno. La ausencia

METABOLISMO DE CARBONO Y NITRÓGENO EN LAS RHIZOBIACEAS



de ADH catabólica en LM13 podría deberse a que presenta una inhibición ante altas concentraciones de NADH/NAD⁺ (como otras deshidrogenasas dependientes de NAD⁺: α -cetoglutarato deshidrogenasa)⁶² o podría relacionarse a una adaptación en el uso de las vías de degradación de alanina que amortigua otros procesos metabólicos, como podrían ser la acumulación de glutamato y/o glutamina.^{44, 69}

En *R. etli* el catabolismo de glutamato no se realiza por la GDH (pues carece del gen que la codifique), y no se encuentran estudios al sistema GABA/SSDH ni al papel de las transaminasas en que se pueda definir su importancia, sin embargo son las vías por las cuales podría realizarse el catabolismo de glutamato a α -cetoglutarato. El sistema GABA/SSDH se ha agrupado entre las vías accesorias al TCA, que pueden remover el exceso de esqueletos de carbono, NADH o ATP, y pueden redireccionar el flujo dentro del TCA,³⁸ y los datos del comportamiento de esta vía en LM13 podrían ser esenciales para comprender su mecanismo de regulación en *R. etli*. En los bacteroides de una mutante de *B. japonicum* de α -cetoglutarato, la deshidrogenasa (*sucA*) se ha observado que presentan las enzimas del sistema GABA/SSDH, sin embargo la actividad de la glutamato decarboxilasa es baja y muy lenta, por lo que esta vía no es la responsable del catabolismo de glutamato en esta mutante.

C) Efectos en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, TCA

El TCA se puede dividir en 2 vías: de oxalacetato a succinil-CoA que reduce y de citrato a α -cetoglutarato que es oxidativa. El TCA, como muchos otros ciclos metabólicos, requiere un balance entre el ingreso y la salida de intermediarios –muy poco o mucho de un metabolito generalmente inhibe la función. Por ejemplo, el exceso de ingreso o remoción de esqueletos de carbono inhibe el flujo dentro del TCA. El flujo eficiente también requiere de un adecuado balance redox: si la relación de concentración NADH/NAD⁺ es muy alta o pequeña el TCA se inhibe. Por todo ello, se ha podido encontrar que la mayoría de las enzimas del TCA en las Rhizobiaceas pueden ser reprimidas, pero no se tiene evidencia de alguna situación drástica en la regulación genética y en todos los bacteroides que se han medido a la fecha se han encontrado todas las enzimas del TCA y se ha observado que la regulación a la que es sometido es fundamental para la fijación de nitrógeno eficiente.^{38, 86}

El complejo de la α -cetoglutarato deshidrogenasa es una de las enzimas más sensibles a los cambios en la concentración NADH/NAD⁺ y es marcadamente inhibida por NADH⁹⁵, lo que en bacteroides provee de α -cetoglutarato para la síntesis y acumulación de glutamato.⁹⁶ La mutante de la α -cetoglutarato deshidrogenasa (*sucA*) de *R. leguminosarum* no nodula ni fija nitrógeno, no puede crecer en glutamato como fuente de carbono y nitrógeno, lo acumula y aparentemente el exceso intracelular de α -cetoglutarato es convertido a este aminoácido³² Estos datos podrían reflejar una semejanza con la cepa LM13 de *R. etli*, ya que nuestra mutante tampoco nodula y no fija nitrógeno, puede crecer

en glu y lo acumula de manera importante.

Esta mutante de *sucA* de *R. leguminosarum* secreta grandes cantidades de glutamato y α -cetoglutarato al medio y la excreción de glutamato se incrementa cuando se adiciona aspartato, lo que le permite escapar de intoxicarse con aspartato a través de aumentar la transaminación a α -cetoglutarato.³² Por ello resultaría interesante observar si la cepa LM13 puede sobrevivir en un medio con aspartato a concentraciones intoxicantes; si puede detoxificarse es muy probable que sea a través de transaminaciones con α -cetoglutarato y tendría que recurrir a la excreción de glutamato y el exceso de α -cetoglutarato al medio.

Se ha propuesto que las altas concentraciones de glutamato, o un producto directo (como podría ser la glutamina), regulan por alguna modificación post-traducciona a la permeasa de aminoácidos Aap. Esta modificación se realiza cuando la bacteria se encuentra en altas concentraciones intracelulares de glutamato, lo que provoca la inhibición de la ingesta de aminoácidos del medio e inicia su excreción. Además, la mutante de *aapJ* no crece en glutamato como fuente de carbono pero fija y nodula normalmente.³² Por ello, es probable que uno de los mecanismos de regulación de la α -cetoglutarato deshidrogenasa y de la Aap estén relacionados a alguna metilación de proteínas u otro sistema regulatorio que relacione a la concentración de SAM/SAH con la de α -cetoglutarato/glutamato y la de NADH/NAD⁺. La LM13 puede ser una buena herramienta para acercarse a estos temas.

La mutante de α -cetoglutarato deshidrogenasa, *sucA*, de *B. japonicum* crece bien con malato o succinato como fuentes de carbono, incluso puede utilizar glutamato y crecer un poco al usar la vía α -cetoglutarato decarboxilasa, lo que la hace una mutante atípica a las demás que se han encontrado, además de su fenotipo Fix⁺Nod⁺. *B. japonicum*, como *R. etli*, no presenta actividad de GDH por lo que se buscó otra vía para el metabolismo de α -cetoglutarato y se encontró a la enzima α -cetoglutarato decarboxilasa (que es estimulada por tiamina y es independiente de CoA) que produce succinato semialdehído y se reincorpora al TCA como succinato.⁹⁷ Es poco probable que *R. etli* presente esta vía pero localizarla podría ser importante para reconocer mejor este nuevo camino metabólico.

Por otra parte, la mutante de *R. leguminosarum* de Succinil CoA sintetasa acumula glutamato y excreta glutamato y α -cetoglutarato y presenta una actividad residual de α -cetoglutarato deshidrogenasa. Esta última se debe a ambas enzimas se encuentran en el mismo operon *mdh-sucCDAB*, donde *mdh* es la malato deshidrogenasa, *sucCD* la Succinil CoA sintetasa y *sucAB* la α -cetoglutarato deshidrogenasa y se transcriben juntos a través del promotor de *mdh*.³²

La mutante de *S. meliloti* de la enzima Isocitrato dehidrogenasa no puede crecer en glutamato, forma nódulos pero son completamente inefectivos y esto se debe a que no puede producir α -cetoglutarato,⁹⁸ por lo que tampoco hay sustrato para la aspartato aminotransferasa. Por otra parte, la mutante de succinato dehidrogenasa de *S. meliloti* no puede crecer cuando usa succinato, piruvato, acetato, arabinosa y glutamato.⁹⁹

En *R. etli*, *S. meliloti* y *R. tropici* se ha encontrado que al subcultivarlos en medio mínimo disminuyen su crecimiento. *R. etli* presenta un comportamiento de tipo fermentativo donde disminuye el contenido de O₂ y son secretados aminoácidos y ácidos orgánicos, algunos de ellos del TCA y se observa una disminución en la actividad de las enzimas entre las que destacan la α -cetoglutarato deshidrogenasa, la piruvato deshidrogenasa, la citrato sintasa, la malato deshidrogenasa y la β -cetotiolasa (de la vía de síntesis de PHB) y se encontró que este comportamiento no se presenta cuando se añade biotina al medio.¹⁰⁰ Es probable que LM13 esté mostrando una respuesta similar en gln y glu, (disminuye su flujo de esqueletos de carbono dentro del TCA, inhibe sus enzimas y secreta aminoácidos e intermediarios del TCA), sin embargo experimentos en este sentido son necesarios para poder correlacionar ambos estudios y observar si la regulación del comportamiento fermentativo de *R. etli* se correlaciona con la mutación en sahH que presenta LM13.

Por último, revisar la actividad de cada enzima del TCA en diversos medios y cepas (incluyendo a la cepa LM13), y la concentración de los diferentes metabolitos intracelulares como secretados al medio, serán muy importantes para observar la regulación del metabolismo en *R. etli*.

D) Efectos en la transmetilación

En las Rhizobiaceas se han ido identificando experimentalmente algunas metiltransferasas -todas dependientes de SAM. La mayoría de ellas están relacionadas con los procesos simbióticos: la modificación de los factores Nod (NodS), la biosíntesis de fosfolípidos (Pmt), lipooligosacáridos (Lpe) y una enzima constitutiva de *S. meliloti*, la O6-metilguanin-DNA metiltransferasa, que forma parte de la familia CCRM.

Actualmente con las secuencias de los genomas y plásmidos de diversas Rhizobiaceas podemos observar la gran cantidad de genes que podrían codificar metiltransferasas. Por ejemplo, *S. meliloti* presenta 50 genes que codifican para estas enzimas, de los cuales 4 han sido reportados experimentalmente (*pmt*, *cheR*, *ccrm* y *lpe*), 6 se proponen por su homología como una metiltransferasa específica, 9 se identifican como probables y 31 se señalan como putativas.¹⁰¹

Es muy probable que *R. etli* tenga un sistema de metiltransferasas similar al de *S. meliloti*, que la mayoría de estas enzimas sean dependientes de SAM y de SAH, y que se regulen (cuando estén presentes) por diferencias en la afinidad por estos metabolitos. Sin embargo, en la secuencia del plásmido simbiótico (pSym) de *R. etli*, no se ha determinado ninguna metiltransferasa y solo tenemos referencia de la existencia y acción de NodS (que metila al factor Nod) y de Lpe (realiza la metilación de fucosa para la maduración del lipopolisacárido de *R. etli* CE3).¹⁰²

Pero por el momento podemos proponer que, si *R. etli* expresa un gran número de metiltransferasas, la cepa LM13 presenta modificaciones en la actividad de las

metiltransferasas (por la alteración en el rango de concentración de SAM/SAH provocados por la mutación en *sahH*); este cambio puede tener efectos en la regulación epigenética y por lo tanto modifica, en muy diversas funciones y grados, el ciclo celular.¹⁰³ Estudios en esta dirección podrían ser útiles para el desarrollo del conocimiento de las relaciones de expresión genética y el metabolismo celular en *R. etli* y las Rhizobiaceas.

CONCLUSIONES

1. La mutante LM13 se encuentra mutada con el transposon Tn5 en el gen *sahH* que codifica para la proteína S- Adenosilhomocisteinasa (o hidrolasa).
2. En la mutante LM13 no se pudo detectar actividad alguna (en dirección de síntesis de S- Adenosilhomocisteína) de adenosilhomocisteinasa. Lo que corrobora la identidad del gen como *sahH*, y nos hace proponer que *Rhizobium etli* CE3 tiene o expresa un solo gen para SahH.
3. Se reporta la secuencia del gen de *sahH* de *Rhizobium etli*. Este gen de 1400 bases se encuentra en el fragmento GDM 18.26 desde la base 1578 hasta la 2978 y el plásmido pGDM 18.26 complementa a la mutante LM13.
4. El gen de *sahH* de *Rhizobium etli* presenta un alto grado de similitud con las secuencias reportadas para este gen y es altamente conservada: 90% con los de bacterias, 75% con los de plantas y 68% con los de mamíferos.
5. La mutante LM13 en vida libre no puede utilizar como fuente de carbono y nitrógeno al glutamato ni a la glutamina y ve reducida su capacidad de crecimiento cuando usa Alanina. El crecimiento en estos aminoácidos se reestablece al introducir succinato o glucosa al medio.
6. La mutante LM13 presenta el siguiente comportamiento simbiótico: nodula en un 5% y no fija nitrógeno. La mutación en *sahH*, induce efectos negativos en el establecimiento de la simbiosis que pueden relacionarse con modificaciones en el metabolismo simbiótico y/o cambios en la expresión genética en el bacteroide.
7. Esta mutación genera un nuevo estado metabólico donde no se ven afectadas significativamente las actividades de las GS's I y II, las glutaminasas A y B, ni la ADH biosintética. Pero sí se observa un efecto negativo en la actividad de la ADH cuando actúa catabólicamente, más no es significativo para explicar el fenotipo reportado.
8. La mutante LM13 acumula glutamato y glutamina en sus pozas de aminoácidos comparada con la cepa silvestre.
9. La descripción *sahH* en *Rhizobium etli* abre nuevas perspectivas para entender algunos procesos de regulación metabólica en *R. etli* y cómo el metabolismo puede determinar o modificar la expresión genética.

Perspectivas de investigación:

La cepa LM13 para su estudio requerirá en un futuro:

- 1) La presentación de la mutante LM13 ante la comunidad científica requerirá que se realicen algunos experimentos como podrían ser: acumulación intracelular de SAH, SAM, metionina y homocisteína, así como su síntesis; y la concentración intracelular de NADH/NAD⁺.
- 2) Algunos experimentos que pueden ayudar a clarificar el papel de *sahH* en la interacción y regulación del metabolismo de aminoácidos y el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) en *R. etli* pueden ser:
 - a) Medir las concentraciones intracelulares y extracelulares de aminoácidos, intermediarios del TCA (incluyendo NAD⁺ y NADH) y otros metabolitos acumulables como PHB, glioxilato, etc., producidos durante crecimientos con fuentes de carbono y nitrógeno que sean comparables con otros estudios del TCA y el metabolismo de aminoácidos en *R. etli*;
 - b) Medir las enzimas que puedan catabolizar glutamato: la vía GABA/SSDH y las transaminasas dependientes de glutamato y α -cetoglutarato;
 - c) Medir las enzimas que puedan catabolizar α -cetoglutarato: la α -cetoglutarato deshidrogenasa, la α -cetoglutarato decarboxilasa, la vía GS-GOGAT y la transaminasa de glutamina ω -amidasa;
 - d) Medir las enzimas del TCA poniendo especial interés en la piruvato deshidrogenasa la citrato sintasa y la β -cetotiolasa, pues son los puntos que podrían estar relacionados a alguna regulación además de la α -cetoglutarato deshidrogenasa.
- 2) La mutante LM13, así como las construcciones inducibles con el gen *sahH*, son herramientas importantes para determinar la importancia de la S-adenosilhomocisteinasa en el metabolismo de *R. etli*. A través de trabajar en esto, se podrán dilucidar los procesos dependientes de la concentración de SAH, SAM y su regulación. Logrando observar su efecto en los diferentes procesos de diferenciación y del ciclo celular.
 - a) En *R. etli*, es probable que diversos genes y operones se expresen por efecto de la metilación ante diversas condiciones ambientales, estrés, o cambios durante la diferenciación y establecimiento de la simbiosis, por lo que se podrían identificar por fingerprinting con ¹⁴C-S adenosilmetionina. Comparando los patrones de metilación con otras cepas podríamos encontrar pistas sobre la secuencia de activación o inhibición que ocurre ante diversas condiciones. Entre ellas podríamos encontrar la secuencia de activación de las metiltransferasas y su inhibición.
- 3) El problema metabólico que expresa la cepa LM13 podría ayudar descubrir las vías para la síntesis de metionina y homocisteína, las cuales probablemente se encuentren elevadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

CEPAS Y PLASMIDOS

| CEPAS | Características importantes | Referencia |
|------------------------------|---|-------------------------------------|
| <i>Rhizobium etli</i> CE3 | Tipo silvestre nal ^R sm ^R | Noel et. al. (1984) |
| LM13 | sahH::Tn5 derivada de CE3 nal ^R km ^R neo ^R | Dupont & Calderon (1994) |
| CE-3 + pGDM18.26 | Derivada de CE3 nal ^R sm ^R contiene el plasmido pGDM18.26, tc ^R | Este trabajo |
| LM13 + pGDM18.26 | sahH::Tn5 derivada de CE3 nal ^R km ^R neo ^R contiene el plasmido pGDM18.26, tc ^R | Este trabajo |
| LM13 + pLAFR1 | sahH::Tn5 derivada de CE3 nal ^R km ^R neo ^R contiene el plasmido pLAFR1, tc ^R | Este trabajo |
| <i>E. coli</i> HB101 | F ⁻ , recA13 Sm ^r Contiene el pRK2073 (funciona como helper) | Boyer & Roulland- Dussoix (1969) |
| PLASMIDOS | | |
| pSUP 202 | Tn5- <i>mob</i> en LM13, km ^r neo ^r | Simon (1983) |
| pRK2073 | Tra ⁺ , mob ⁺ , sp ^r (helper) | Figurski & Helinski (1979) |
| pLAFRI | Cosmido clonable de amplio rango de hospederos, mob ⁺ , tra ^r , IncP, Tc ^r | Friedman et. al. (1982) |
| PBluescript SK | Vector de clonación Cb ^r | Stratagene |
| pMGD18 | Locus para <i>sahH</i> de <i>R. etli</i> en pLAFR1 Tc ^r 5.5 Kb, complementa a la mutante LM13. | Dupont y Calderon (1994) |
| pGDM18.26 | Subclona del pMGD18 en pLAFRI, Tc ^r 3.5Kb, complementa a la mutante LM13. | Este trabajo |
| pAC20 | sahH::Tn5 de la cepa LM13 en pUC18 | Este trabajo |

MEDIOS DE CULTIVO

Medio rico LB. (Luria Bertani) (Miller, 1972), es un medio rico en donde crece la gran mayoría de bacterias, hongos y levaduras, mientras que *Rhizobium etli* no crece.

Composición:

| | |
|----------------------|-------|
| Peptona de caseína | 1 % |
| Extracto de levadura | 0.5 % |
| Cloruro de sodio | 1.0 % |

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Para preparar medio sólido se agrega 1.5 % de agar antes de esterilizar.

Si se requieren antibióticos estos se preparan en soluciones concentradas mil veces (1000X) y se agrega un mililitro de la solución por litro de medio de cultivo después de esterilizar; (ver preparación de antibióticos al final del capítulo) si se trata de medio líquido cuando está frío, y si se trata de medio sólido cuando está tibio (42 °C) antes de verterlo en las cajas.

- **Medio rico PY** (peptona- levadura) (Beringer, 1974) medio rico de crecimiento para las cepas de *Rhizobium etli*

Composición

| | |
|----------------------|-------|
| Peptona de caseína | 0.5 % |
| Extracto de levadura | 0.3 % |
| CaCl ₂ | 7 mM |

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Para preparar medio sólido se agregan 15 g/l de agar antes de esterilizar.

Por separado se prepara y esteriliza una solución de cloruro de calcio 100 X y se agregan diez mililitros de la solución por litro de medio de cultivo después de esterilizar cuando esté frío o tibio según se trate de medio líquido o sólido.

-**Cloruro de calcio para medio PY 100X (0.7 M).**

| | |
|-------------------------|----------|
| CaCl ₂ | 10.29 g. |
| agua desionizada c.b.p. | 100ml |

Se disuelve el cloruro de calcio y se esteriliza en autoclave

En caso de requerir antibióticos se utilizan las soluciones 1000X y se agregan como en el caso del medio LB (ver preparación de antibióticos al final del capítulo).

- **Medio mínimo MM**

Composición.

| | |
|---------------------------------|-----------|
| MgSO ₄ | 0.4 mM |
| K ₂ HPO ₄ | 1.2 mM |
| CaCl ₂ | 1.5 mM |
| FeCl ₃ | 0.0005 %. |
| Fuentes de nitrógeno | 10 mM |
| Fuentes de carbono | 10 mM |

Para preparar un litro

| | |
|--------------------------------------|---------|
| MgSO ₄ *7H ₂ O | 0.1 g. |
| K ₂ HPO ₄ | 0.22 g. |

Más las fuentes de carbono y nitrógeno esterilizables.

Se ajusta el pH con ácido fosfórico o hidróxido de sodio hasta pH6.8.

Con objeto de facilitar la preparación del medio se hacen soluciones concentradas de las sales.

K₂HPO₄ 100X

Se disuelven 21g de la sal en 1l de agua desionizada, luego se anade 1ml de cloroformo para prevenir la contaminación y se guarda en refrigeración a 4 °C

MgSO₄ 100X

Se disuelven 9.86g de la sal heptahidratada en 1l, se almacena a 4 °C.

Por separado se preparan: una solución de cloruro de calcio 100 X, una de cloruro de hierro III 1000X y soluciones concentradas de las fuentes de carbono y nitrógeno no esterilizables en autoclave.

-Cloruro de calcio 100 X para MM

CaCl₂ *2H₂O 2.2054 g

agua desionizada c.b.p. 100ml

Se esteriliza en la autoclave

-Cloruro de hierro para medio mínimo 100 X

FeCl₃*6H₂O 50 mg.

agua desionizada c.b.p. 10ml

Se esteriliza por filtración y se guarda en alícuotas de 1ml en congelación a -20 °C.

-Biotina.....1000 X

Biotina 10 mg.

agua desionizada c.b.p. 10ml

Se esteriliza por filtración y se guarda en alícuotas de 1ml en congelación a -20 °C.

-FUENTES DE CARBONO Y NITRÓGENO***Glutamina 25X**

Glutamina 1.82 g

Agua desionizada c.b.p. 50ml

(Es la solución más concentrada de glutamina que puede prepararse en agua). Se entibia el agua y una vez disuelta la glutamina se esteriliza por filtración, se agregan 4ml de esta solución para cada 100ml de medio de cultivo ya esterilizado y frío.

***Acido glutámico 100 X**

-sal sódica del ácido glutámico 16.91 g

agua desionizada c.b.p. 100ml

Se disuelve el glutamato y se almacena, se agrega 1ml de la solución por cada 100ml de medio de cultivo.

***Cloruro de amonio 100 X**

NH₄Cl 5.34 g.

Agua desionizada c.b.p. 100 ml

Se agrega 1ml por cada 100ml de medio de cultivo.

***Alanina 100 X**

L-Alanina 8.909g

Agua desionizada c.b.p. 100 ml

Se agrega 1ml por cada 100ml de medio de cultivo.

***Glucosa (Dextrosa) 100 X**

Dextrosa.....18.016 g

Agua desionizada c.b.p. 100 ml

Se agrega 1ml por cada 100ml de medio de cultivo.

***Acido succínico 100 X**

ácido succínico 118 g.
agua desionizada c.b.p. 1 l

Se añaden 75.19g de NaOH y luego se ajusta el pH a 6.8 con hidróxido de sodio diluido. El ácido succínico se agrega al medio antes de esterilizar.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos se preparan en soluciones 1000 X para ser añadidos al medio de cultivo una vez que está frío o tibio.

- **Acido nalidíxico (Nal) 1000 X, concentración final 20 µg/ml.** Se disuelven 20mg por mililitro en una solución de NaOH 0.1 N. se esteriliza por filtración, se guarda en alícuotas de 1ml a -20°C en tubos eppendorf (es fotosensible)

- **Kanamicina (Kn) 1000 X, concentración final 30 µg/ml.** Se disuelven 30mg por mililitro de agua desionizada y se esteriliza por filtración, se guarda en alícuotas de 1ml a -20°C en tubos eppendorf protegidos de la luz.

- **Tetraciclina (Tc) 1000 X, concentración final 10 µg/ml.** Se disuelven 10mg en cada mililitro de metanol, se hacen alícuotas y se guardan a -20 °C protegidas de la luz.

CRUZA DE BACTERIAS

A.- Cruzas biparentales (para plásmidos con genes *tra*).

1.- Inocular las cepas en medios sólidos más antibióticos (*R. etli* en medio PY y *E. coli* en medio LB)

2.- Incubar a 37 °C si es cepa de *E. coli* o a 28 °C las cepas de *R. etli*.

3.- Verter 1ml de solución salina al 0.85% estéril en un tubo eppendorf estéril para cada cepa.

4.- Resuspender cada cepa en la solución contenida en los tubos; guardar células suficientes para las cajas control.

5.- Centrifugar durante 1 minuto a 10 000 r.p.m. en la microfuga.

6.- Decantar.

7.- Agregar 1ml de la solución salina.

8.- Centrifugar durante 1 minuto a 10 000 r.p.m. en la microcentrifuga.

9.- Decantar.

10.- Resuspender en el menor volumen posible, buscando que las cepas estén a la misma concentración.

11.- Agregar una cantidad equivalente de cada cepa en un tubo estéril.

12.- Mezclar con la micropipeta.

13.- Verter la cruz sobre una placa de medio LB sin antibióticos si se cruzan dos cepas de *E. coli* o, en una placa de medio PY sin antibióticos si se cruzaron una cepa de *E. coli* y una de *R. etli*.

14.- Esperar que la cruz pierda agua hasta poder invertir la caja sin que las células caigan.

15.- Incubar durante una noche a 37°C las cruzas de *E. coli* y a 28°C las cruzas de *Rhizobium* con *E. coli*.

16.- Tomar una asada de la cruz y sembrar por agotamiento en cajas de medio rico más la mezcla de antibióticos que se espera resista la nueva cepa. Sembrar cantidades similares de las cepas con las que se hizo la cruz.

- Si se requiere conocer la frecuencia de la conjugación se realizan cuentas por dilución de cada tipo de célula.

B.- Cruzas triparentales.

1.- Inocular en medios semisólidos las cepas:

E. coli HB101 con el plásmido que se pretende conjugar en LB más el antibiótico de la resistencia del plásmido.

E. coli HB101 con el plásmido colaborador pRK2073 en medio LB más espectinomicina.

La cepa de *R. etli* que va ser hospedera del plásmido.

2.- Incubar a 37 °C las cepas de *E. coli* y a 28 °C las cepas de *R. etli*.

3.- Resuspender las bacterias de cada cepa en solución salina al 0.85 % estéril en tubos eppendorf

4.- Centrifugar durante 1 minuto a 10 000 r.p.m. en la microcentrífuga.

5.- Decantar.

6.- Agregar 1ml de solución salina.

7.- Resuspender la pastilla celular.

8.- Centrifugar durante 1 minuto a 10 000 r.p.m. en la microcentrífuga.

9.- Decantar.

10.- Resuspender un volumen de solución salina que aproxime la misma concentración de cada cepa.

11.- Mezclar en un tubo la cepa de *Rhizobium* con la cepa que tiene el plásmido de interés.

12.- Mezclar en un tubo una cantidad similar de la cepa que tiene el plásmido de interés, la cepa con el plásmido colaborador y la cepa de *Rhizobium*.

13.- Centrifugar durante unos segundos a 10 000 r.p.m. en la microcentrífuga.

14.- Decantar.

15.- Resuspender en el menor volumen posible.

16.- Verter las cruas por separado en cajas con medio PY sin antibióticos.

17.- Dejar secar la cruz hasta poder invertir la caja.

18.- Incubar a 28 °C durante una noche.

19.- Tomar una asada de cada una de las cruas y estriar en cajas de medio PY mas ácido nalidixico y el antibiótico al cual el plásmido que se transfiere proporciona resistencia.

20.- Estriar en el mismo medio que en 19.- las cepas con la que se hizo la cruz.

21.- Incubar a 28 °C hasta aparición de colonias (3 a 5 días).

SELECCION FENOTÍPICA DE CEPAS DE *R. etli* EN CAJA.

A: Para fenotipos de utilización de fuentes de carbono y nitrógeno.

1.- Se preparan cajas de Petri con medio mínimo más las fuentes de carbono o nitrógeno a las concentraciones indicadas. (ver medios de cultivo).

2.- Se utilizan además de los anteriores los medios PY, medio mínimo amonio succínico y LB.

3.- Las placas de agar se colocan sobre un disco de papel con números de 1 al 100 uniformemente distribuidos.

4.- Se toma con un palillo de madera estéril cada colonia de interés.

5.- Con el palillo se pican las placas de medio de cultivo, cuidando de picar en todas el mismo número; el orden de picado de los medios debe ser establecido de forma que primero se pique el que contenga menos nutrientes y al final el medio LB.

6.- Se incuba a 30°C el tiempo necesario para diferenciar crecimientos de la colonias (entre 3 y 5 días).

7.- Se leen los crecimientos contra los controles.

B: Para fenotipos de resistencia a antibióticos.

- 1.- Se utilizan medio PY mas los antibióticos, los controles son medio PY sin antibióticos y medio LB.
- 2.- Se colocan la cajas sobre el disco numerado.
- 3.- Se toma cada colonia de interés con un palillo de madera estéril.
- 4.- El orden de picado es PY sin antibióticos, PY mas antibióticos y LB.
- 5.- Se incuban las cajas a 30°C .
- 6.- Se leen las cajas contra los controles.

CURVAS DE CRECIMIENTO (para *R. etli*)

- 1.- Sembrar las cepas requeridas en cajas de Petri con medio PY sólido más los antibióticos correspondientes a cada cepa.
- 2.- Incubar a 30°C durante 3 días.
- 3.- Inocular con las células matraces Erlenmeyer con 100ml de PY más los antibióticos correspondientes a cada cepa.
- 4.- Incubar a 30°C con agitación de 200 r.p.m. durante 15 a 18 horas.
- 5.- Centrifugar los cultivos en botellas para centrifugación estériles; durante 10 minutos, 10 000 r.p.m. y 4°C. (rotor GSA).
- 6.- Resuspender la pastilla celular en 100ml de solución de sales para medio mínimo previamente enfriada a 4°C.
- 7.- Centrifugar a 10 000 r.p.m., 4°C, 10 minutos.
- 8.- Resuspender la pastilla en 3ml de sales para medio mínimo a 4°C.
- 9.- Diluir la suspensión 1:10 y 1:100 partiendo de 100 µl de suspensión.
- 10.- Leer la absorbancia de las diluciones a 540nm contra blanco (solución de sales para medio mínimo).
- 11.- Calcular el volumen necesario para inocular cada uno de los matraces de acuerdo a la siguiente expresión: (utilizar la dilución cuyo valor de densidad óptica esté comprendido entre (0.2 y 0.8)

$$VR = (VF * D.Oi) / (D.Om * dil).$$

- donde: VR es el volumen de la dilución necesario para inocular cada matraz.
VF es el volumen del medio de cultivo que se quiere inocular (100ml)
D.Oi representa la densidad óptica requerida al inicio (se utiliza 0.05)
D.Om es la densidad óptica de la dilución.
dil representa el inverso de la dilución.

- 12.- Inocular los matraces que contienen el medio requerido (100ml) con la cantidad calculada.
- 13.- Tomar 2 muestras de 1ml con pipeta estéril, una de ellas se deposita en un tubo de ensayo de 13X100 mm, mientras que la segunda se vierte en un tubo eppendorf de 1.5ml. (agitar bien el matraz antes de tomar la muestra).
- 14.- Incubar los matraces a 30°C y agitación de 200 r.p.m.
- 15.- Centrifugar la muestra del tubo eppendorf durante 4 minutos a 14 000 r.p.m.
- 16.- Aspirar el sobrenadante del tubo con ayuda de una jeringa con aguja.
- 17.- Agregar a 500 µl de ácido tricloroacético al 5% a cada tubo eppendorf.
- 18.- Leer la densidad óptica a 540 nm. de la muestra que está en el tubo de ensayo.
- 19.- A las 4, 8, 12 y 24 horas de incubación se retiran los matraces de la incubadora y repetir 13 a 18.
- 20.- Determinar el contenido de proteínas de cada condición mediante el método de "Lowry micro".
- 21.- Graficar la densidad óptica y la cantidad de proteínas contra el tiempo para cada cepa en cada medio de cultivo.

Determinación de proteínas para curvas de crecimiento

MÉTODO DE LOWRY MICRO

- 1.- Centrifugar los tubos que tienen las muestras con ácido tricloroacético al 5% durante 4 minutos a 14000 r.p.m.
- 2.- Aspirar el líquido hasta extraer la mayor cantidad posible.
- 3.- Resuspender en 200 μ l de una solución de NaOH 0.4 N.
- 4.- Preparar una dilución 1:3 de Folin en agua
- 5.- Preparar solución ABC (98A + 1B + 1C).
6. Agregar a un tubo limpio de 13X100 mm:

| Reactivos (ul) | Blanco | Estándar | Muestras |
|----------------|--------|----------|----------|
| Agua | 200 | 100 | 160 |
| Muestra | --- | --- | 40 |
| Estándar | --- | 100 | --- |
| Solución ABC | 1000 | 1000 | 1000 |

- 7.- Agitar en el vortex.
- 8.- Esperar 10 minutos.
- 9.- Agregar 100 μ l de folin 1:3.
- 10.- Agitar en el vortex, esperar 30 minutos.
- 11.- Leer absorbancia en el espectrofotómetro a 625nm.
- 12.- Calcular la cantidad de proteína en cada muestra por:

$$\text{Cantidad de prot (ug prot/ml).} = \text{D.O. muestra} \times \text{F}$$

$$\text{F} = \text{Conc. albúmina} / (\text{D.O. standard} \times \text{vol sol ABC} \times \text{alícuota})$$

-SOLUCIONES PARA DETERMINACIÓN DE CANTIDAD DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE LOWRY.

-Solución A.

NaOH 0.1N

Na₂CO₃·2 H₂O 2%

Para preparar un litro de la solución se pesan y disuelven 4g de NaOH y 20g de bicarbonato de sodio en 1l de agua desionizada, se guarda en frascos ámbar a temperatura ambiente.

-Solución B.

Tartrato de sodio y potasio 2%.

Para preparar 100ml se pesan y disuelven 2g de tartrato de sodio y potasio en 100ml de agua desionizada, se almacena a 4 °C.

-Solución C.

CuSO₄·5H₂O 1%

Se pesa y disuelve un gramo de sulfato de cobre II en 100ml de agua desionizada, se guarda en refrigeración.

-Solución estandar de albúmina (400 ug/ml)

se pesan 20mg de albúmina sérica bovina y se disuelven en 50ml de agua desionizada, se hacen alícuotas de 1ml en tubos eppendorf y se almacenan a -20 °C.

EXTRACCIÓN DE DNA

QUICK CLONE ANALYSIS (modificado).

- 1.- Preparar cultivos líquidos de bacterias de entre 12 y 18 horas de incubación a 37°C y 200 r.p.m. de agitación (para el caso de cultivos de *E. coli*).
- 2.- Llenar un tubo eppendorf con el cultivo.
- 3.- Centrifugar durante 1 minuto a 14 000 r.p.m. en la microcentrífuga.
- 4.- Aspirar el sobrenadante con una punta de micropipeta conectada a un matraz kitasato conectado a su vez a la línea de vacío.
- 5.- Repetir dos veces los puntos 2 a 4.
- 6.- Agregar a la pastilla 100µl de solución A.
- 7.- Resuspender con el vortex.
- 8.- Agregar 200µl de solución B.
- 9.- Agitar invirtiendo el tubo repetidas veces hasta lograr homogeneidad.
- 10.- Incubar 5 minutos en baño de hielo.
- 11.- Agregar 150µl de solución C.
- 12.- Agitar en vortex durante algunos segundos.
- 13.- Reposar durante 10 minutos en baño de hielo.
- 14.- Centrifugar durante 6 minutos en microcentrífuga a 14 000 r.p.m.
- 15.- Verter el sobrenadante en un tubo nuevo.
- 16.- Agregar 1ml de etanol absoluto frío.
- 17.- Reposar durante 30 minutos en el congelador de -20 °C.
- 18.- Centrifugar a 14 000 r.p.m. durante 5 minutos.
- 19.- Aspirar el sobrenadante con ayuda de la línea de vacío.
- 20.- Agregar 300µl de etanol al 70 %.
- 21.- Centrifugar durante 3 minutos a 14 000 r.p.m. en la microcentrífuga.
- 22.- Aspirar el sobrenadante con vacío.
- 23.- Secar en un horno de vacío durante 30 o 40 minutos.
- 24.- Disolver la muestra en amortiguador TE. (20µl si no se va a purificar y 100µl si se quiere purificar). Mantener a -72°C las muestras para su conservación.

- SOLUCIONES PARA LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE DNA.

- Solución A

EDTA 10 mM

Tris pH8 25 mM

Se preparan soluciones de EDTA 0.5 M y Tris pH8, 2 M; se agregan 2ml de la solución de EDTA y 1.25ml de la solución de Tris, se lleva el volumen a 100ml.

*EDTA 0.5 M pH8

EDTA*2Na 16.81g

agua desionizada c.b.p. 100ml.

El reactivo se vierte en el agua y se agregan lentejas de NaOH para ayudar a la disolución, se mide el pH con el potenciómetro. se esteriliza por autoclave.

*Tris 2.0 M pH8

Tris base 24.228 g.

agua desionizada c.b.p. 100ml.

El pH se ajusta con HCl y se esteriliza en autoclave.

-Solución B

NaOH 0.2 N

SDS 1.0 %

Esta solución se prepara cada vez que se necesita; se utilizan soluciones concentradas de SDS al 20 % y NaOH 10N.

NaOH 10 N 100 ul

SDS 20 % 250 ul

agua esteril 4.650ml

Primero se agrega la solución de hidróxido de sodio y se agita, después la de SDS para evitar precipitación del detergente, se mezcla en un tubo de ensayo estéril.

***NaOH 10 N**

NaOH 400 g.

agua esteril 1 l

Se disuelve en un vaso de pp. esteril . Se puede guardar hasta por dos meses.

***SDS 20 %**

Dodecilsulfato de sodio 20g

agua esteril c.b.p. 100ml.

Se agrega el detergente y se calienta ligeramente hasta disolución, evitando que se formen burbujas.

PURIFICACIÓN DE DNA MEDIANTE EXTRACCIÓN FENOL-CLOROFORMO.

- 1.- Agregar a la solución de DNA que se quiere purificar el mismo volumen de una solución de fenol estabilizado-cloroformo 1:1 vol/ vol.
- 2.- Agitar con el vortex durante 10 segundos.
- 3.- Centrifugar en la microcentrífuga a 14 000 r.p.m. durante 5 minutos.
- 4.- Retirar el sobrenadante con ayuda de una micropipeta cuidando de no extraer la interfase, colocarla en otro tubo eppendorf nuevo y estéril. (repetir los pasos 1 a 4 hasta que no tengan interfase).
- 5.- Agregar cloroformo en una relación 1:1, vol/vol.
- 6.- Agitar en el vortex durante 10 segundos.
- 6.- Centrifugar a 14 000 r.p.m. durante 5 minutos.
- 8.- Recuperar el sobrenadante y colocarlo en un tubo nuevo y estéril.
- 9.- Agregar solución de acetato de sodio 0.3 M a una relación 1:10 vol/vol.
- 10.- Agregar etanol absoluto frío a una relación 1:1 vol/vol.
- 11.- Reposar a -20 °C durante 20 minutos.
- 12.- Centrifugar durante 5 minutos a 14 000 r.p.m.
- 13.- Retirar el sobrenadante con ayuda de un matraz kitasato y una línea de vacío.
- 14.- Agregar 300µl de etanol frío al 70 %.
- 15.- Centrifugar durante 2 minutos a 14 000 r.p.m.
- 16.- Aspirar el sobrenadante con ayuda de una línea de vacío.
- 17.- Secar la muestra en un horno de vacío durante 20 minutos.
- 18.- Disolver en amortiguador TE 1:10 vol/vol.

-SOLUCIONES PARA PURIFICACION DE DNA.

-Fenol estabilizado - cloroformo

Fenol estabilizado 50ml.

cloroformo 50ml.

Luego de hacer la mezcla se guarda en refrigeración en un frasco ambar.

***Fenol estabilizado**

- 1.- Se licua fenol grado biología molecular a 70 °C.
- 2.- Se agrega Tris 1M, pH8 en relación 1:1 vol/vol en el mismo frasco ambar del fenol.
- 3.- Se lleva al cuarto frío y se mantiene en agitación constante con el frasco cerrado.
- 4.- Se hace un cambio de amortiguador de Tris a las 4 horas de agitación.
- 5.- Se mantiene en agitación en el cuarto frío.
- 6.- Se mide el pH de la solución de Tris y del fenol, cuando el pH de las dos fases sea de 7.6 se cambia el Tris 1 M por Tris 0.1 M.
- 7.- Se mantiene en agitación en frío durante 3 horas más.
- 8.- Se hacen alícuotas y se guardan en congelación a -20 °C

ELECTROFORESIS HORIZONTAL DE DNA.

A)

- 1.- Pesar 2.5g de agarosa de punto normal de fusión.
- 2.- Añadir a 250ml de amortiguador TBE 1X contenidos en un matraz Erlenmeyer de 500ml.
- 3.- Calentar en el horno de microondas hasta disolución de la agarosa.
- 4.- Dejar enfriar hasta aproximadamente 40°C.
- 5.- Agregar 3µl de una solución de bromuro de etidio de 10mg/ml.
- 6.- Agitar.
- 7.- Cerrar los extremos abiertos del soporte del gel con papel adhesivo de 1cm para formar un molde.
- 8.- Fijar el peine para formar los pozos separado del fondo del soporte el grueso de una hoja de papel.
- 9.- Retirar el trozo de papel.
- 10.- Verter la agarosa sobre el soporte hasta obtener una capa de entre 3 y 6mm de espesor.
- 11.- Dejar enfriar.

B)

- 12.- Agregar a las muestras de DNA un décimo de su volumen de la mezcla de colorantes para corrida. (Si solo se quiere utilizar una parte de la muestra, se mezcla con la solución de colorantes sobre un pedazo de parafilm)
- 13.- Mezclar hasta la homogeneidad.
- 14.- Centrifugar durante 5 segundos a 14 000 r.p.m. (solo si se trata de tubos)
- 15.- Retirar las cintas que se utilizaron para contener a la agarosa en el soporte.
- 16.- Introducir el gel en la cámara para electroforesis.
- 17.- Llenar el primer pozo con 5µl de marcador de peso molecular de DNA (ladder).
- 18.- Llenar los pozos con las muestras.
- 19.- Hacer una relación escrita de los pozos y las muestras.
- 20.- Correr el gel a 100 V durante 1 hora o hasta separación de las bandas de los colorantes.
- 21.- Observar el gel en el transiluminador de luz U.V.

-SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS DE DNA.

-Amortiguador Tris-Boratos-EDTA 10X.

Tris base 0.089 M

Acido bórico 0.089 M

EDTA 0.002 M

Para prepara el amortiguador 1 X se hace una dilución 1:10.

EXTRACCIÓN DE ENZIMAS CITOPLASMÁTICAS PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.

- 1.- Sembrar las cepas requeridas en cajas de Petri con medio PY semisólido más los antibióticos correspondientes a cada cepa.
- 2.- Incubar a 30°C durante 3 días.
- 3.- Inocular con las células matraces Erlenmeyer con 100ml de PY más los antibióticos correspondientes a cada cepa.
- 4.- Incubar a 30°C con agitación de 200 r.p.m. durante 15 a 18 horas.
- 5.- Centrifugar los cultivos en botellas para centrifugación estériles; durante 10 minutos, 10 000 r.p.m. y 4°C. (rotor GSA).
- 6.- Resuspender la pastilla celular en 100ml de solución de sales para medio mínimo previamente enfriada a 4°C.
- 7.- Centrifugar a 10 000 r.p.m., 4°C, 10 minutos.
- 8.- Resuspender la pastilla en 3ml de sales para medio mínimo a 4°C.
- 9.- Diluir la suspensión 1:10 y 1:100 partiendo de 100µl de suspensión.
- 10.- Leer la absorbancia de las diluciones a 540nm contra blanco (sales para medio mínimo).
- 11.- Calcular el volumen necesario para inocular cada uno de los matraces de acuerdo a la siguiente expresión: (utilizar la dilución cuyo valor de densidad óptica esté comprendido entre (0.02 y 0.8).

$$VR = (VF * D.Oi) / (D.Om * dil).$$

- donde: VR es el volumen de la dilución necesario para inocular cada matraz.
VF es el volumen del medio de cultivo que se quiere inocular (100ml)
D.Oi representa la densidad óptica requerida al inicio (se utiliza 0.05)
D.Om es la densidad óptica de la dilución.
dil representa el inverso de la dilución.

- 12.- Inocular los matraces que contienen el medio requerido (250ml) con la cantidad calculada.
- 13.- Incubar los matraces a 30°C y agitación de 200 r.p.m. por 18 horas.
- 14.- Centrifugar a 10 000 r.p.m., 4°C, 10 minutos.
- 15.- Resuspender la pastilla en 100ml de agua desionizada a 4°C.
- 16.- Centrifugar a 10 000 r.p.m., 4°C, 10 minutos.
- 17.- Decantar y secar la botella con papel.
- 18.- Resuspender la pastilla en 2ml de amortiguador de extracción.
 - Para actividad de GS: Amortiguador PIPES 10mM pH6.7 (Kahn), o amortiguador de imidazol 0.1M cloruro de manganeso 0.1 M.a pH 7.
 - Para actividad de glutaminasas: Amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 8.
 - Para actividad de GDHc y ADH: Amortiguador Tris HCl 50mM pH7.6 con β-mercaptoetanol 10mM.
 - Para actividad de Transaminasas: Amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 8.

- 19.- Sonicar 3 minutos a 14-16 micrones de amplitud.
- 20.- Centrifugar 2 minutos a 14 000 rpm en microfuga. La porción a utilizar es el sobrenadante.
- 21.- Cuando sea necesario, el sobrenadante se divide en dos. Una parte se guarda a 4°C y la otra se calienta a la temperatura requerida durante 15 minutos(o los que se requieran)
- 22.- La parte calentada se centrifuga 2 minutos a 14 000 rpm en microfuga. Se guarda el sobrenadante.

PREPARACIÓN DE LOS AMORTIGUADORES DE EXTRACCIÓN

PARA ACTIVIDAD DE GLUTAMINASAS:

Amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 8.

KH₂PO₄ 0.1 M 1.361g

H₂O.....100ml

Ajustar el pH a 8

PARA ACTIVIDAD DE GS:

Amortiguador de imidazol 0.1M cloruro de manganeso 0.1 M a pH7.

Imidazol 10mM.....0.0681g

MnCl₂ 10mM.....0.0197g

H₂O 100ml

Ajustar el pH a 7.0

PARA ACTIVIDAD DE ADH:

Amortiguador Tris HCl 50mM pH7.6 con β-mercaptoetanol 10mM.

Tris HCl 50mM 0.788g

H₂O 100ml

Ajustar el pH a 7.6

Agregar β-mercaptoetanol 10mM. 0.078ml

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE GLUTAMINASA.

La actividad enzimática de glutaminasa se determinó a través de medir el amonio formado por la desamidación hidrolítica de la glutamina, mediante un método colorimétrico (Chaney y Marbach, 1962), modificado para glutaminasa en *E. coli* en volúmenes pequeños.

MEZCLA DE REACCIÓN

| | EXTRACTO | AMORTIGUADOR CON GLN | AMORTIGUADOR SIN GLN |
|----------|----------|-------------------------|-------------------------|
| BLANCO | 10 μl | | 40 μl |
| PROBLEMA | 10 μl | 40 μl | |

La reacción se incuba a 37°C y se detiene con 50 μl de TCA al 1.5%

Se centrifugan los eppendorfs de reacción 2 minutos a 12 000 rpm. en microfuga y se decanta el sobrenadante en otro tubo.

Con el sobrenadante se corre una reacción para medir el NH₄⁺

REACCIÓN PARA MEDIR LIBERACIÓN DE NH₄⁺

| | PROBLEMA | STANDARD | BLANCO |
|---------------------------------------|----------|----------|--------|
| SOBRENADANTE | 20 ul | ----- | ----- |
| H2O | 180 ul | 180 ul | 200 ul |
| NH₄⁺ 2mM | ----- | 20 ul | ----- |
| SOLUCIÓN 1 | 1ML | 1ML | 1ML |
| SOLUCIÓN 2 | 1ML | 1ML | 1ML |

Se deja en reposo durante 1 hora

Se lee la densidad óptica a 625 nm

De las lecturas obtenidas, se determina la actividad enzimática con la fórmula siguiente:

40 nmoles de NH₃ (del standard) (0.25 DO a 625nm)

Act. nmoles = (40 nmoles x DO625nm de la reacción) / 0.25 DO a 625nm

El resultado obtenido en nmoles se divide entre el tiempo de la reacción, para obtener así nmoles/minutos de actividad, y entre la proteína para obtener la actividad específica, en nmoles /mgP/minuto.

SOLUCIONES PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE GLUTAMINASA.

Amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 8.

KH₂PO₄ 0.1 M 1.361g

H₂O.....100ml

Ajustar el pH a 8

Amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 8 con glutamina 10mM

Glutamina.....1.1825 g

Amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 8.....10ml

Solución 1

fenol 0.1 M

Nitroprusiato de sodio 0.05g

H₂O..... 1 l

Solución 2

NaOH 0.12 M

NaCl 0.42g

H₂O..... 1 l

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ALANINO DESHIDROGENASA* BIOSINTETICA (ADH)

En las celdas del espectrofotómetro se prepara la reacción completa y de cada control, partiendo de cocteles, se ajusta el cero con el control sin NADH, agregar el piruvato a las reacciones que lo llevan, mezclar y leer en el espectro a 340 nm por 15 min, leer y graficar cada 2 minutos cada reacción.

| | Reacción completa | control -NH4Cl | Control Piruvato | control -antimivina | Control -Extracto |
|-----------------------|-------------------|----------------|------------------|---------------------|-------------------|
| amortiguador reacción | 200 μ l | 200 μ l | 200 μ l | 200 μ l | 200 μ l |
| NH4Cl | 200 μ l | ----- | 200 μ l | 200 μ l | 200 μ l |
| NADH | 100 μ l | 100 μ l | 100 μ l | 100 μ l | 100 μ l |
| H ₂ O | ----- | 200 μ l | 100 μ l | 300 μ l | 200 μ l |
| EXTRACTO | 200 μ l | 200 μ l | 200 μ l | 200 μ l | ----- |
| Antimicina | 200 μ l | 200 μ l | 200 μ l | ----- | 200 μ l |
| Piruvato | 100 μ l | 100 μ l | ----- | 100 μ l | 100 μ l |

*El metodo de extracción para la determinación de la ADH biosintética y catabólica cambia ya que se inocula a una D.O.alta y se deja incubando solamente 4 horas.

*Se preparan las soluciones el día que se determina la actividad, los amortiguadors se preparan con anticipación y unicamente se agrega el β -mercaptoetanol al amortiguador que lo lleva el día que se determina la actividad.

Graficar los datos de actividades enzimáticas vs. tiempo

Determinar la proteína por el método de Lowry.

Calcular la actividad de la ADH. Las actividades de la ADH biosintética y catabólica se calculan igual:

$$0.1 \text{ umol} \text{-----} 0.62 \text{ D.O.}$$

$$X \text{ -----} * \text{ D.O.}$$

$$X = \mu\text{mol}/*t$$

$$X \mu\text{mol}/*t = Y \text{ umol}/\text{min}$$

$$Y \mu\text{mol}/\text{minutos} / \text{Proteína en } 200\mu\text{l} = \text{Actividad enzimática en } \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mgprot}$$

Calcular la actividad específica restando la actividad de la reacción completa, a la actividad en la reacción sin piruvato para la ADH biosintética, y la actividad de la reacción completa menos la actividad de la reacción sin alanina para la ADH catabólica.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ALANINO DESHIDROGENASA CATABOLICA (ADHc)

En las celdas del espectrofotómetro se prepara la reacción completa y de cada control, partiendo de cocteles, se ajusta el cero con el control sin extracto. Agregar el extracto a las reacciones que lo llevan, mezclar y preincubar por 10 minutos a temperatura ambiente, agregar la alanina para iniciar la reacción y leer en el espectro a 340 nm por 15 min, leer y graficar cada 2 minutos cada reacción.

| | Reacción completa | Control -Alanina | Control -extracto |
|---|-------------------|---------------------|----------------------|
| Amortiguador reacción | 200 μ l | 200 μ l | 200 μ l |
| NAD ⁺ (o NADP ⁺) | 200 μ l | 200 μ l | 200 μ l |
| H ₂ O | ----- | 200 μ l | 100 μ l |
| Antimicina | 200 μ l | 200 μ l | 200 μ l |
| Extracto | 200 μ l | 200 μ l | ----- |
| Alanina | 200 μ l | ----- | 200 μ l |

SOLUCIONES PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE ADH BIOSINTÉTICA Y CATABÓLICA.

Amortiguador de extracción

Tris HCl 50mM
Ajustar el pH a 7.6
Agregar β -mercaptoetanol 10mM. 0.078ml

NADH

NADH 2.5mM

Antimicina A

Antimicina A 0.24mM
Etanol al 80 %

Piruvato

Ac piruvico 200mM
Ajustar el pH a 7.6

Amortiguador de reacción

Tris HCl 250mM
Ajustar el pH a 7.6

NADPH

NADPH 2.5mM

NH₄Cl

NH₄Cl 200mM

Alanina

L-Alanina 250 mM

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GS

El cultivo tiene que ser bastante grande (1000ml) inocular a 0.1 D.O. y recuperar a las 8 horas de crecimiento a 30 °C a 200rpm en MM Glu-Succ.

Resuspender la pastilla en amortiguador de imidazol.

Para la determinación de transferasa se añade: 400 μ l de coctel transferasa+100 μ l de extracto

- 1.-Se arranca la reacción con 50 μ l de gln 0.2 M, en el Heat block a 30 °C,
- 2.-Medir los tiempos 0, 2.5,5,10 minutos.
- 3.-Parar con 1ml de stop mix.
- 4.-Centrifugar 2 minutos a 12 000 rpm

5.-Leer a 540 nm

Para la determinación de la sintetasa se añade: 400µl de coctel sintetasa + 100µl de extracto

1.- Arrancar la reacción con 60µl de ATP 0.2 M en el Heat block a 30 °C,

2.-Medir los tiempos 0, 30, 60, 120minutos.

3.-Parar con 1ml de stop mix.

4.-Centrifugar 2 minutos a 12 000 rpm.

5.-Leer a 540 nm .

SOLUCIONES PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE GS

Amortiguador de imidazol 0.1M cloruro de manganeso 0.1 M.a pH7.

| | | |
|-----------------------------|---------|----------|
| Imidazol 10mM..... | 0.0681g | 0.03405g |
| MnCl ₂ 10mM..... | 0.0197g | 0.0985g |
| H ₂ O | 00ml | 50ml |

Ajustar el pH a 7.0

Hidrocloruro de Imidazol 1 M pH 7.5

| | |
|-------|--------|
| 100ml | 10ml |
| 6.81g | 0.681g |

MnCl₂ 0.1M

| | |
|---------|---------|
| 20ml | 2ml |
| 0.3958g | 0.0396g |

Arseniato de Na 0.28 M pH 7.0

| | |
|--------|---------|
| 50ml | 5ml |
| 4.368g | 0.4368g |

STOP MIX

| | | |
|------------------------|------|-------|
| | 1L | 100ml |
| FeCl ₂ 3.2% | 55g | 5.5 g |
| TCA 4% | 20g | 2g |
| HCL 0.5M | 21ml | 2.1ml |

filtrar por 0.45m

Hidrocloruro de hidroxilamina 0.8 M

| | |
|--------|---------|
| 50ml | 5ml |
| 2.779g | 0.2779g |

MgCl₂ 3M

| | |
|--------|--------|
| 50ml | 5ml |
| 30.49g | 3.049g |

Glutamina 0.2 M

5ml
0.1461g

Glutamato 0.85M pH7

15ml
1.875g

EL MISMO DÍA

| | | |
|------------------|---------|---------|
| ADP 0.04M pH 7.0 | 5ml | 1ml |
| | 0.0854g | 0.0171g |
| ATP 0.2M pH 7.0 | 10ml | 5ml |
| | 1.23g | 0.123g |

Para obtener la actividad de GS de 50 tubos

| Coctel transferasa | | Coctel sintetasa | |
|-------------------------------------|---------|-------------------------------------|--------|
| Hidrocloruro de Imidazol pH 7.5 | 3.4ml | Hidrocloruro de Imidazol pH 7.5 | 2.38ml |
| H ₂ O | 13.67ml | H ₂ O | 6.08ml |
| Hidrocloruro de hidroxilamina 0.8 M | 0.56ml | Hidrocloruro de hidroxilamina 0.8 M | 1.49ml |
| MnCl ₂ | 0.068ml | MgCl ₂ 3M | 0.48ml |
| Arseniato de K o Na 0.28 M pH 7.0 | 2.27ml | Glutamato monosódico 0.85 M | 10ml |
| ADP 0.04 M pH 7.0 | 0.23ml | | |

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA S-ADENOSIL HOMOCISTEINASA DE *R. etli*.

Crecimiento y obtención del extracto enzimático celular.

- 1.- Crecer las cepas en cajas con medio PY con antibióticos por 3 días.
- 2.- Crecer en medio líquido PY con antibióticos por al menos 10 horas (una noche).
- 3.- Inocular a aproximadamente 0.01 D.O. 540nm, 100 ml de PY líquido sin antibióticos. Crecer durante 14 horas.
- 4.- Centrifugar a 10 000 r.p.m., a 4°C , 10 minutos.
- 5.- Resuspender en el amortiguador A en frío.
- 6.- Centrifugar a 10 000 r.p.m., a 4°C , 10 minutos.
- 7.- Resuspender el pellet en 1ml fr amortiguador A frío.
- 8.- Sonicar en baño de hielo 2 minutos a 14 micrones.
- 9.- Centrifugar 2 minutos a 12 000r.p.m.
- 10.- Recuperar el sobrenadante e incubarlo en hielo.

Amortiguador A: 1mM EDTA + 50 mM KH₂PO₄, pH 7.2

Cóctel de reactivos para actividad de SahH (síntesis de S-adenosilhomocisteína)

Homocisteína 5mM y adenosina 0.02 mM en amortiguador A.

En cada reacción se utilizarán 170µl del coctel de reactivos, 30 µl de extracto enzimático y se detendrá la reacción con 10 µl de HClO₄ 5N.

Reacciones

- 1.- Se precalienta la mezcla de sustratos en amortiguador A, a 30°C.
- 2.- Se agrega HClO₄ al tiempo cero.
- 3.- Se adiciona el extracto enzimático y se detiene la reacción con HClO₄ 5N (1/20 del volumen total)
- 4.- Se centrifuga 2 minutos a 12 000 r.p.m.
- 5.- Se inyectan 20 µl al HPLC.

Condiciones del HPLC.

Columna ultrasphere ODS 4.6X250mm, de 5 µm (tamaño de partícula)

Flujo: 1.0 ml /min

Amortiguador en bomba A: KH₂PO₄ 0.05M pH 4.5

Amortiguador en bomba B: metanol

Gradientes: La inyección de la muestra es al minuto 1.

Desde 0 minutos= 10% de B.

A partir de 8 min= 28% de B.

Desde 8 minutos= 28% de B.

A partir de 28 min= 34% de B.

Detectar en UV a 254 nm.

Los tiempos de retención de la mezcla de estándares: Inosina 6.05 min; Adenosilhomocisteína 7.12 minutos y Adenosina 9.08 min.

Calcular las nanomoles dividiendo el área del pico / el factor resultante del estándar (área/nanomoles del estándar). Esta operación da nanomoles en los 20 µl inyectados al HPLC. Por lo que se tiene que multiplicar por 210 (nanomolas obtenidas en la reacción) y dividir entre el tiempo de reacción (15, 20 y 40 min); y dividir nuevamente entre la cantidad de proteína del extracto enzimático en 30µl. Por lo que se obtiene el resultado en nanomolas/min/mg prot.

NOTAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., 1993. Principles of Biochemistry., 2ª Ed. Worth Publishers, Inc.
- 2 Del wiche C.C. 1970. The nitrogen cycle. Scientific American. 223: p.136-146.
- 3 Mora J., Calderón J, Hernandez G., 1988. Search, assimilation and turnover of nitrogen in some fungi. In Nitrogen source control of microbial processes. Ed. Sanchez-Esquivel. CRC Press inc., p. 59-81
- 4 Mora J., Lara F. 1988. Nitrogen metabolism: an overview. In Nitrogen source control of microbial processes. Ed. Sanchez-Esquivel. CRC Press inc., p. 1-20
- 5 Alexander, M. 1981. Introduction to soil microbiology. John Willey and Sons, Inc New York. p. 277-302.
- 6 Sprent, J. I., 1986. The ecology of nitrogen cycle . Cambridge University press. England p. 151-155
- 7 Belser, L.W., 1979. Population ecology of nitrifying bacteria. Annual Review of Microbiology 33: p. 309
- 8 Newton, W., 1981 Kirk-Othmer: Encyclopedia of chemical technology. 3Ed. V15, 942-968. Jhon Wiley.
- 9 Karl, D.M., 2002. Nutrient dynamics in the deep blue sea, Trends in microbiology, 10:9, p. 410-418.
- 10 Long, S.R., 1989. *Rhizobium*-legume nodulation:life together in the underground. Cell 56: p. 206-214
- 11 Beringer, J. E., Brewin, N., Johnston, A.B.W., Shulman, H. and Hopwood D.A.,1979. The *Rhizobium*-legume symbiosis. Proceedings of the Royal Society of London 204: p. 219-233.
- 12 Martinez, E. D., Romero, D and Palacios, R., 1990, the *Rhizobium* genome. Critical Reviews Plant Science 9: p. 59-93.
- 13 R. Palacios, J. Mora, W Newton (eds), 1993. New Horizons in Nitrogen fixation, 777-778. P. Young, E. Martinez, J. Cooper & K. Lindstrom, Report of the Taxonomy meeting, subcommittee on Agrobacterium and Rhizobium., Kluwer Academic Publishers, Netherlands,
- 14 Segovia L, Young JP, Martinez-Romero E., 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli type I* strains as *Rhizobium etli sp. nov.* International Journal of Systemic Bacteriology. 43:2, p. 4-7.
- 15 Aguilar OM, Lopez MV, Riccillo PM, Gonzalez RA, Pagano M, Grasso DH, Puhler A, Favelukes. 1998. G.Prevalence of the *Rhizobium etli*-like allele in genes coding for 16S rRNA among the indigenous rhizobial populations found associated with wild beans from the Southern Andes in Argentina. Applied Enviromental Microbiology. 64:9, p. 3520-4.
- 16 Laguerre G, Fernandez MP, Edel V, Normand P, Amarger N. 1993. Genomic heterogeneity among French *Rhizobium* strains isolated from *Phaseolus vulgaris* L. International Journal of Systemic Bacteriology 43:4, p. 761-7.
- 17 Bergman,K., Gualash-Hoffe, M., Huestadt, R.E., Larosiliere, R.C., Ronco, P.G and Su, L. 1988, Physiology of behavioral mutants of *Rhizobium meliloti*: evidence for a dual chemotaxis pathway. Journal of bacteriology. 170: p. 3249-3254.
- 18 Caetano-Anollés, G., Crist-Estes, D.J., and Bayer, W. D.,, 1988., Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteoin requires functional nodulation genes. Journal of Bacteriology. 170: p. 3164-3169.
- 19 Shalaman, H.R., Okker, R.J., Lugtenberg, B.J., 1992, Regulation of nodulation gene expresión by NodD in *Rhizobium*. Journal of Bacteriology. 174:16, p. 5177-5182.
- 20 Van Rhijn, P., Venderleyden, J., 1995, The *Rhizobium*-plant simbiosis. Microbiological reviews. 59:1, p. 124-142.
- 21 Fisher, R.F. & Long, S.R., 1992, *Rhizobium*-plant signal exchange. Nature 357: p. 655-59.

-
- 22 R. Palacios, J. Mora, W Newton (eds), 1993. New Horizons in Nitrogen fixation,, J. Denaire, F. Debelle, g Truchet & J.C. Prome, *Rhizobium* and legume nodulation: A molecular dialogue. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. p. 19-30
- 23 Kondorosi, E., Banfalvi, Z., and Kondorosi, K., 1991, Overview on genetics of nodule induction by *Rhizobium meliloti*. In advances in molecular genetics of plant-microbe interaction, Vol 1., De. H. Hennecke and D.P.S. Verma. Kluwe Acadedmic Publishers, p.111-118.
- 24 Dudley, M.E., Jacobs, T.W & Long, S.R., Microscopic studies of cell divisions induced in alfalfa roots by *Rhizobium meliloti*. *Planta* 171, p. 289-301.
- 25 Callaham, D.A., and Torrey, J, JG., 1981, The structural basis for infection of root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. *Canadian Journal of Botanycs*. 59: p. 1647-1664.
- 26 Shultze, M., y Kondorosi, A., 1998, Regulation of symbiotic root nodule development, *Annual Review of Genetics*. 32: p. 33-57.
- 27 Udvardi M.K. y Day D.A., 1997, Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules, *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48: p. 493-523.
- 28 McKay, I.A., Dilworth, M.J., and Glenn, A.R., 1989, Carbon catabolism in continuous culture and bacteroids of *Rhizobium leguminosarum* MNF3841. *Archives of Microbiology*. 152: p. 606-610.
- 29 Arwas, R., McKay, I.A., Rowey, F.R.P., Dilworth, M.J., and Glenn, A.R., 1985. Properties of organic acid utilization by mutants of *Rhizobium leguminosarum* strain 300. *Journal of Genetics and Microbiology*. 1313: p. 2059-2066.
- 30 Finan, T.M., Wood, J.M., and Jordan, D.C. 1983. Symbiotic properties of C4-dicarboxylic acid transport mutants of *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of Bacteriology*. 154: p. 1403-1413.
- 31 Duncan, M.E., and Fraenkel, D.G., 1979, α -ketoglutarate dehydrogenase mutant of *Rhizobium meliloti*. *Planta* 171: p. 289-301.
- 32 Walshaw, D.L., Wilkinson A., Mundy, M., Smith, M., and Poole P.S., 1997, Regulation of the TCA cycle and the general aminoacid permease by overflow metabolism in *Rhizobium leguminarum* *Microbiology*. 143: Pt 7, p. 2209-21.
- 33 Gardiol, M.J., Arias, A., Cervansky, C. and Martinez-Drets, G., 1982, Succinate dehydrogenase mutant of *Rhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*. 151: p. 1621-1623.
- 34 Ronson, C.W., and Primrose, S.B., 1979. Carbohydrate metabolism in *Rhizobium trifolii*: identification and symbiotic properties of mutants. *Journal of Gen. and Microbiology*. 112: p. 77-88.
- 35 Glenn, A.R., McKay, I.A., Arwas, R. and Dilworth, M.J., 1984. Sugar metabolism and symbiotic properties of carbohydrat mutants of *Rhizobium legfuminosarum* . *Journal of Gen. and Microbiology*. 130:p.239-245.
- 36 Finan, T.M., Mc Whinnie, E., Driscoll, B. & Watson, R.J., 1991, Complex simbiotic phenotypes result from gluconeogenic mutations in *Rhizobium meliloti*. *Molecular Plant-microbe interaction* 4, p. 386-392.
- 37 McKay, I.A., Glenn, A.R., & Dilworth, M.J., Gluconeogenesis in *Rhizobium leguminosarum* MNF3841. *Journal of Gen. and Microbiology*. 131, p. 2067-2073.
- 38 Poole, P., Allaway, D., 2000, Carbon and Nitrogen metabolism in *Rhizobium*, *Advances in microbial physiology* 43: p. 117-164.
- 39 Rastogi, U.K., and Watson, R.J. 1991. Aspartate aminotransferase activity is required for aspartate catabolism and symbiotic nitrogen fixation in *Rhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology* 173p.2879-2887.
- 40 Fitzmaurice, A.M., and O`Gara, F. 1988. Involvement of glutamate as a carbon source in supporting nitrogen fixation activity in *Rhizobium meliloti*. In: *Nitrogen fixation: Hundred years after*. E d. H. Bothe, F.J., De Bruijn and Newton W.E., Gustav Fisher Stuttgart, New York USA, p.558.

-
- 41 Rosendahl, L., Dilworth, M.J., & Glenn, A.R., 1992, Exchange of metabolites across the peribacteroid membrane in pea root nodules. *Journal of Plant Physiology* 139, p.635-638.
- 42 Lodwig, E.M., Hosle, A.H., Bourdés, A., Findlay, K., Allaway D., Karunakaran, R., Downie J.A., Poole, P.S., 2003. Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Nature* 422, p. 722-726.
- 43 Smith M.T., and Emerich D.W.,1993, Alanine dehydrogenase from soybean nodule bacteroids: Kinetic mechanism and pH studies., *The journal of biological chemistry*, 268:15, p. 10746-10753.
- 44 Smith M.T., and Emerich D.W.,1993, Alanine dehydrogenase from soybean nodule bacteroids: Purification and properties., *Archives of biochemistry and biophysics* 304:2, p. 379-385.
- 45 Appeals, M.A., & Haaker, H., 1991, Glutamate oxalacetate transaminase in pea root nodules-participation in a malate/aspartate shuttle between plant and bacteroid. *Plant physiology* 95, p. 740-747.
- 46 Ali, H., Niel, C., and Guillaume, J., 1981, The pathway of ammonium assimilation in *Rhizobium meliloti*. *Archives of Microbiology*. 129, p. 391-394.
- 47 Bravo, A., Mora, J., 1988, Ammonium assimilation in *Rhizobium phaseoli* by the Glutamine synthetase-glutamate synthase pathway., *Journal of bacteriology*. 170:2, p. 980-984.
- 48 Merrick, M.J., 1983., Nitrogen control of the nif regulon in *Klebsiella pneumoniae*: involmnet of the ntrA gene and analogies between ntrC and nifA. *EMBO Journal*. 2, p. 39-45.
- 49 Merrick, M.J., 1988, Nitrogen regulation of nitrogen fixation. In: Nitrogen source control of microbial processes. De. Sanchez-Esquivel, S. CRC Press inc. p. 170-193.
- 50 Castillo A., Taboada, H., Mendoza A., Valderrama, B., Encarnación, S., Mora, J., 2000, Role of GOGAT in carbon and nitrogen partitioning in *R. etli*., *Microbiology* 146, p. 1627-1637.
- 51 Burgess, B. K., 1985, Nitrogenase mechanism an overview. In Nitrogen fixation research progress. Newton et al., Eds Martinus Nijhoff, Dordrecht, p. 543-550.
- 52 Morteson, L.E., and Thornely, R.M.F., 1979, Structure and function of nitrogenase. *Annual Review of Biochemistry*. 48: p. 387-418.
- 53 Ruvkun, G.B., and Ausubel, F.M., 1980, Interspecies homology of nitrogenase genes., *Proceedings of the Natl. Academy of Science USA*. 17, p. 191-198.
- 54 Boistard, P., Batut, J., Doveran, M.L., David, M., GgRNAerone, A.M., Li, R.Y., and Kahn, D., 1988, The regulatory pathway of nif and fix genes in *Rhizobium meliloti*. In: *Molecular plant-microbe interactions*. e d. D.P.S. Verma y R. Palacios. APS Press. p. 96-100.
- 55 Long, S.R., 1989., *Rhizobium* legume nodulation: life togueter in the underground., *Cell* 56: p. 203-214.
- 56 Corbin, D., Barran, L., and Ditta, G., 1983, Organization and expression of *Rhizobium meliloti* nitrogen fixation genes., *Proceedings of the Natl. Academy of Science USA*., 80: p. 3005-3016.
- 57 R. Palacios, et. al (eds), *New Horizons in Nitrogen fixation*., P Ludden, nif gene products and their roles in Nitrogen fixation, 1993. p. 101-104.
- 58 Espin, G., Moreno, S., Wild, M., Meza, R., and Iaccarino, M., 1990, A previously unrecognised glutamine synthase expressed in *Klebsiella pneumoniae* from glnT locus of *Rhizobium leguminosarum* , *Molecular gene and genetics*, 223, p. 513-516.
- 59 Duran, S., Calderón, J., 1996, Role of glutaminase in *Rhizobium etli*: studies with a new mutant. *Biochemistry and genetics* 34:11-12, p.453-465.
- 60 Duran, S., Calderón, J., 1995, Role of glutaminase amidase pathway and glutaminase in glutamine degradation in *Rhizobium etli*. *Microbiology* 141, p. 589-595.

-
- 61 Bravo, A., Becerril B., y Mora, J., Introduction of the *Escherichia coli* *gdh A* gene into *Rhizobium phaseoli*: Effect on nitrogen fixation., *Journal of Bacteriology*. 170:2, p. 985-988. Y Mendoza A., Valderrama B., Leija A., Mora J., 1998, NifA-dependent expresión of glutamate dehydrogenase in *Rhizobium etli* modifies nitrogen partitioning during symbiosis, *Molecular Plant micobe interaction*, Vol. 11 (2) p. 83-90.
- 62 Toshinisa Oshima & Kenji Soda, 1990 Biochemistry and biotechnology of aminoacid dehydrogenases, In *Advances in biochemical engeenering/ biotechnology*, Vol. 42. p. 1360-1366.
- 63 De Bruijin, F.J., Rossbach, S., Scheider, M., Ratet, P., Messemer, S., Szeto, W.W., Ausubel, F.M., and Schell, J., 1989, *Rhizobium meliloti* 1021 has three differentially regulated loci involved in glutamine biosynthesis, none or which is essential for symbiotic nitrogen fixation. *Journal of Bacteriology*. 171: p. 1673-1682.
- 64 Chiurazzi m., Meza R., Lara M., Lahm A., Defez., Defez R., Iaccarino M., Espin G., 1992, The *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* *glnT* gene, encoding glutamine synthetase III, *Gene* 119(1) p. 1-8.
- 65 Somerville, J.E., Shatters, R.G. and Kahn, M.L., 1989, Isolation, characterization and complementation of *Rhizobium meliloti* 104A14 mutant that lack glutamine synthetase II activity. *Journal of Bacteriology*. 171: p. 5079-5086.
- 66 Bishop, P.E., Guevara, J.G., Engelke, J.A. and Evans, H.J., 1976, On the relation between glutamine synthetase and nitrogenase activities in the symbiotic assotiation between *Rhizobium japonicum* and *Glicine max*. *Plant Phisiology*. 57: p. 542-546.
- 67 Carlson, T.A., Guerinet, M.L., and Chelm, B.K., 1985, Characterization of the gene encoding glutamine synthetase Y (*glnA*) from *Bradrhizobium japonicum*. *Journal of Bacteriology*. 162: p. 698-703.
- 68 Carlson, T.A., Martin, G.B., and Chelm, B.K., 1987, Differential transcription of the two glutamine synthetase genes of *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Bacteriology*. 169: p. 5861-5866.
- 69 Bravo, A., Mora, J., 1988, Ammonium asimilation in *Rhizobium phaseoli* by the glutamine sintetasa-glutamate sintase pathway, *Journal of Bacteriology*, 170:2, p.980.984.
- 70 Aksamit, R. R., Buggy, J.J., Bauer C.E., 1995. Expression of rat liver ADOHCY Hidrolase in a *Rhodobacter capsulatus ahcY* mutant restores pigment formation and fotosynthetic growth. *Biochemical and biophysica research communications* 207:1, p. 265-272.
- 71 Porcelli, M., Fusco S., Inizio, T., Zappia, V., Cacciapuoti, 2000. Expresion, purification, and caracterization of recombinant S-adenosylhomocysteine hydrolase from the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Protein expresion and purification* 18, p. 27-35.
- 72 Hoffman, D.R., Marion, D.W., Cornatzer, W.E., Duerre, J.A., 1980, S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocisteine metabolism in isolated rat liver., *The Journal of Biological Chemistry*, 255:22, p. 10822-10827.
- 73 Palmer, J. L., Abeles, R. H., 1976. Mechanism for enzymatic thioeter formation. Mechanism of action of S-adenosylhomocysteinase. *Journal of Biological Chemistry* 251:18, p. 5817-5819.
- 74 Palmer, J. L., Abeles, R. H., 1979. The mecanism of action of S-adenosylhomocysteinase. *Journal of Biological Chemistry* 254:1, p. 22-25.
- 75 Bethin KE, Cimato TR, Ettinger MJ., 1995, Copper binding to mouse liver S-adenosylhomocysteine hydrolase and the effects of copper on its levels., *Journal of Biological Chemistry* 270:35, p. 20703-20711.
- 76 Hoffman D. R., Cornatzer W. E., Duerre J.A., 1979. Relationship between tissue levels of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine and transmetilation reactions. *Canadian Journal of Biochemistry* 57:1, p.56-65.
- 77 Tanaka H, Masuta C, Uehara K, Kataoka J, Koiwai A, Noma M., 1997, Morphological changes and hypomethylation of DNA in transgenic tobacco expressing antisense RNA of the S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase gene., *Plant Molecular Biology* 35:6. p.981-6.

-
- 78 Yi X, Weis RM. 2002, The receptor docking segment and S-adenosyl-L-homocysteine bind independently to the methyltransferase of bacterial chemotaxis. *Biochemica and Biophysica Acta* 1596:1 p.28-35.
- 79 Finkelstein, J.D., Martin, J.J., 2000, Homocysteine, *The international Journal of biochemistry & Cell Biology*, 32, p. 385-389.
- 80 Medina, M.A., Urdiales, J.L., Amores-Sánchez, M.I., 2001, Roles of homocysteine in cell metabolism. Old and new functions, *European Journal of Biochemistry* 238, p. 3871-3882.
- 81 Lieber, C.S., y Packer, L., 2002, S-Adenosylmethionine: molecular, biological and clinical aspects—an introduction, *American Journal of Clinica and Nutrition* 76(suppl): p. 1148S-50S.
- 82 Weissbach, H. y Brot, N., 1991, Regulation of methionine syntesis in *Escherichia coli*, *Molecular microbiology* 5-7: p. 1593-1597.
- 83 Martínez-Chandar, M.L., 2002, García T., Ujue L., Pérez M., et al., Importance of a deficiency in S-adenosyl-L-methionine síntesis in pathogénesis of liver injury, *American Journal of Clinica and Nutrition* 76(suppl): p. 1177S-82S.
- 84 Bottiglieri, Teodoro., 2002 S-Adenosyl-L-methine (SAME): from the bench to the bedside—molecular basis of a pleiotrophicmolecule, *American Journal of Clinica and Nutrition* 76(suppl): p. 1151S-7S.
- 85 Barras, F., Marinus, M.G., 1989, The great GATC, DNA methylation in *E.coli*, *TIG*, 5: p. 5 review area.
- 86 Low, D.A., Weyand, N.J., y Mahan, M.J., 2001, Roles of DNA adenine methylation in regulating bacterial gene expression and virulence. *Infection and Inmunity* 69:12, p. 7197-7204.
- 87 Reisenauer, A., Kahng L.S., McCollum, S., y Lucy Shapiro, 1999, Bacterial DNA methylation: a cell cycle regulator?. *Journal of bacteriology*, 181:17, p. 5135-519.
- 88 Wright, R., Stephens, C., Lucy Shapiro, 1997, The CcrM DNA Methyltransferase is widespread in the alpha subdivision of proteobacteria, and its essential functions are conserved in *Rhizobium meliloti* and *Caulobacter crescentus.*, *Journal of Bacteriology*, 179:18 p. 5869-5877.
- 89 Kasir, J., Aksamit, R.R., Backlund, P.S., y Cantoni, G.L., 1988, *Biochemie and Biophysica Res Commun.* 153. p. 359-364.
- 90 Perna AF, Ingrosso D, Lombardi C, Acanfora F, Satta E, Cesare CM, Violetti E., 2003., Possible mechanisms of homocysteine toxicity. *Kidney International Supplement.* 84 p.137-140.
- 91 Geelen D., Leyman B., Mergaert P., Klarskov K., Van Montagu M., Geremia R., Holsters, 1995, NodS is an S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase that methylates chitooligosaccharides deacetylated at the non-reducing end, *Molecular Microbiology* 17:2. p.387-97.
- 92 Sganga, M.W., Aksamit, R.R. Cantón, G.L., y Bauer, C.E., 1992, Mutational and nucleotide secuencia análisis of S-adenosil-L-homocysteine hidrolase from *Rhodobacter capsulatus.*, *Procedings of the Natl Academy of Science USA* 89: p. 6328-6332.
- 93 Tate, R., Riccio, A., Caputo, E., Iaccarino M., Patr5iarca E. J., 1999 The rhizobium *metZ* gene is essential for methionine byosynthesis and nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 12:1, P. 22-34.
- 94 Dunn, M. F., 1998. Tricarboxilic acid cycle and anaplerotic enzymes in *Rhizobia*, *FEMS Microbiology reviews* 22, p. 105-123.
- 95 Salminen, S. o Streeter, J. G., 1990. Factors contributing to the accomulation of glutamate in *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids under microaerophilic conditions. *Journal of gen microbiology* 136, p. 2119-2126.
- 96 Salminen, S. o Streeter, J. G., 1992. Labelling of carbon pools in *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium leguminosarum bV. vivae* bacteroids following incubation of intact nodules with $^{14}\text{CO}_2$. *Plant Physiology* 100, p. 597-604.

-
- 97 Green, L. S., Li, Y., Emerlich, D. W., Bergensen, F. J., Day, D. A., 2000. Catabolism of α -Ketoglutarate by a *sucA* mutant of *Bradyrhizobium japonicum*: evidence for an alternative tricarboxylic acid cycle. *Journal of bacteriology* 182:10, p. 2838-2844.
- 98 McDermott T. R., Kahn M. L., 1992. Cloning and mutagenesis of the *Rhizobium meliloti* Isocitrate dehydrogenase gene. *Journal of bacteriology* 174:14, p. 4790-4797.
- 99 Gardiol, A., Arias, A., Cervaňský C., Martínez-Drets G., 1982. Succinate dehydrogenase mutant of *Rhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology* 151:3. p. 1621-1623.
- 100 Encarnación S., Dunn, M., Willms, K., Mora, J., 1995. Fermentative and aerobic metabolism in *Rhizobium etli*. *Journal of Bacteriology*, 177:11, p. 3058-3066.
- 101 www.ncbi.nlm.nih.gov Genoma completo de *Sinorhizobium meliloti*.
- 102 Dénarié, J., Debelle, F., Promé J. 1996. *Rhizobium* lipooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry* 65, p. 503-535.
- 103 Moffat, B.A., Stevens Y.Y., Allen, M.S., Snider, J. D., Pereira, L.A., Todorova, M.I., Summers P.S., Werwiltynk E.A., Martin-McCaffrey, Wagnr C., Adenosine Kinase deficiency is associated with developmental abnormalities and reduced transmethylation. *Plant physiology* 128:3, p. 812-821.