



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

CENTRO DE CIENCIAS GENOMICAS

UNA VISION METABOLICA Y GENETICA DE LA
SINTESIS DE LA TIAMINA DURANTE EL
METABOLISMO AEROBICO Y FERMENTATIVO DE
Rhizobium etli CE3

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

P R E S E N T A:
HERMENEGILDO TABOADA CASTRO

ASESOR: Dr. SERGIO MANUEL ENCARNACION
GUEVARA



Cuernavaca, Mor. 2009



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.

A nuestros niños Fabiola Taboada Figueroa y a Martín Taboada Figueroa por disfrutar la vida con ellos.

A mis hermanos Arturo, Sergio y Feliciano.

A Don Romis y Doña Chabe y a sus hijos Chivis, Juani, Isma, Clau, Luis, Jorge y Trini por darme tanto en la vida. Así como a sus familias con cariño.

A Juanita y Manuel a Normis, Ceci, y Lalo.

A mis tíos Blanquita y Domingo y a toda su gran familia que es la mía.

A Pepe y Lucia.

A Todos con mucho Amor.

Dedico este trabajo a mi tutor de la primera parte de la tesis el Dr. Jaime Mora, gracias por su valioso tiempo, entusiasmo, sus enseñanzas y por darme la oportunidad de entrar a trabajar y estudiar en la UNAM.

Gracias a Dr. Sergio Manuel Encarnación por la tutoría de la segunda parte de la tesis y acompañarme hasta el examen del doctorado.

A la Química Yolanda Mora por sus enseñanzas siempre en todo para el desarrollo de este trabajo.

Mi agradecimiento a mi comité tutorial de la Maestría en Investigación Biomédica Básica: Dr. Jaime Mora, Dra. Georgina Hernández y Dra. Esperanza Martínez.

También a mi comité tutorial del Doctorado: Dr. Jaime Mora, Dr. Sergio Manuel Encarnación, Dr. Guillermo Dávila y Dr. Mario Soberón.

Gracias por la revisión de esta tesis a: Dr. Sergio Encarnación, Dr. Antonio Velázquez, Dr. Enrique Merino, Dra. Rosa Laura Camarena y Dr. Víctor Manuel González.

A Mike Dunn por tanta ayuda

A mis compañeros de siempre: Sergio, Carmen, Sandra, Migue, Agustín, Emmanuel, Alfonso, Juan, Brenda, Dr. Dunn, Dra. Girard, Rafael, Humberto, Alex, Gaby, Martha, Cintia, Yunuen, Rica y Katy.

También a Pedrito, Sra. Chela, Doña Ful, Adriana y Zitla.

A todos mil gracias.

1	Titulo 4
1.1	Resumen 4
1.2	Abstract 5
1.3	CAPITULO 1. AMPLIACION DE LA DISCUSION DEL ARTICULO: Thiamine limitation determines the transition from aerobic to fermentative-like metabolism in <i>Rhizobium etli</i> CE3. 6
1.4	Introducción. 6
1.5	La tiamina. 7
1.6	La función de la tiamina. 7
Figura 1	Actividades del complejo multienzimático de la piruvato deshidrogenasa (Voet., 1995). 9
Figura 2	Síntesis de la tiamina pirofosfato en <i>Bacillus subtilis</i> . (Modificado de Joo-Heon Park <i>et al.</i> , 2003) 10
1.7	Síntesis de la tiamina Pirofosfato. 10
1.8	Biosíntesis del tiazol de la tiamina (HET-P). 10
1.9	Biosíntesis de la pirimidina de la tiamina (HMP-PP). 11
1.10	Síntesis de la tiamina in vitro. 11
1.11	Regulación de la síntesis de la tiamina. 13
1.12	Presencia de otros genes thi en <i>Rhizobium</i> . 14
Tabla 1	Presencia de los genes thi en especies de <i>Rhizobium</i> y especies relacionadas 16
1.13	Formación de los precursores para la síntesis de la tiamina. 18
1.14	Síntesis de la biotina en <i>Rhizobium</i> y contenido de genes bio en distintas especies. 18
1.15	Regulación de la síntesis de la biotina. 20
Tabla 2	Contenido de genes bio en especies de <i>Rhizobium</i> y especies relacionadas. 21
1.16	El papel de la tiamina y la biotina en la simbiosis. 22
1.17	Relación metabólica de la piruvato deshidrogenasa-TPP y la piruvato carboxilasa-Biotina dependientes.23
Figura 3	El ciclo de Krebs en <i>Rhizobium etli</i> CE3. 25
1.18	El metabolismo aeróbico y fermentativo de la cepa <i>R. etli</i> CE3. 25
1.19	Objetivos generales. 7
1.20	Objetivos particulares. 7
1.21	Hipótesis. 28
1.22	Manuscrito; Thiamine limitation determines the transition from aerobic to fermentative-like metabolism in <i>Rhizobium etli</i> CE3. 28
1.23	Discusión. 29
1.24	CONCLUSIONES CAPITULO I. Thiamine limitation determines the transition from aerobic to fermentative-like metabolism in <i>Rhizobium etli</i> CE3. 31
2	CAPITULO II. ANALISIS TRANSCRIPTOMICO DEL METABOLISMO AEROBICO Y FERMENTATIVO DE <i>R. etli</i> CE3. 32
2.1	Material y metodos. 33
2.1.1	Metodología para el transcriptoma. Purificación de mRNA. 33
2.1.2	La calidad del mRNA total. 34
2.1.3	El marcaje del mRNA. 34
2.1.4	Purificación del cDNA marcados. 34
2.1.5	Fijación del microarreglo. 35
2.1.6	Pre-hibridización del microarreglo. 36
2.1.7	Hibridización del microarreglo. 36

2.1.8	Lavado de la hibridización.	36
2.1.9	Análisis del microarreglo.	37
2.1.10	Soluciones.	37
2.2	Resultados y discusión de los transcriptomas SA-SAB y SA-SAT.	39
2.2.1	Transcriptoma SA-SAB.	39
2.2.1.1	Genes que se sobre-expresaron más en SA que en SAB (Tabla 3).	39
Figura 4	Síntesis de aminoácidos de la familia del aspártico.	40
Figura 5	La vía de las pentosas fosfato.	41
Figura 6	La gluconeogénesis en la cepa <i>R. etli</i> CE3.	42
2.2.1.2	Genes que se expresaron más en SAB que en SA (Tabla 4).	46
2.2.1.3	Resumen de la discusión del transcriptoma SA-SAB.	51
2.2.1.4	CONCLUSIONES CAPITULO II. Transcriptoma SA-SAB.	53
Tabla 3	Transcriptoma SA-SAB, genes que elevaron su transcripción en SA.	57
Tabla 4	Transcriptoma SA-SAB, genes que elevaron su transcripción en SAB.	64
2.2.2	Transcriptoma de SA-SAT.	74
2.2.2.1	Genes que se sobre-expresaron más en SA que en SAT (Tabla 5).	74
Figura 7	La tiamina está relacionada con distintas vías metabólicas.	75
2.2.2.2	Genes que se sobre-expresaron más en SAT que en SA (Tabla 6).	78
2.2.2.3	Resumen de la discusión del transcriptoma SA-SAT.	82
2.2.2.4	CONCLUSIONES CAPITULO II. Transcriptoma SA-SAT.	85
Tabla 5	Genes del Transcriptoma SA-SAT, genes que elevaron su transcripción en SA.	88
Tabla 6	Transcriptoma SA-SAT, genes que elevaron su transcripción en SAT.	91
3	CAPITULO III. RELACION DE LA SINTESIS DE LA TIAMINA CON EL ESTRÉS OXIDATIVO, LA DISMINUCIÓN DE LA OXIDACIÓN DEL CARBONO Y LA SUPLEMENTACION DE PIRIDOXAL-HCl.	96
3.1	Introducción.	96
3.2	Material y métodos.	97
3.2.1	Subcultivos en medio mínimo succinato amonio o piruvato amonio de <i>R. etli</i> CE3.	97
3.2.2	Determinación de proteínas por el método de Lowry (Lowry et al., 1951).	99
3.2.3	Determinación de H ₂ O ₂ intracelular en <i>R. etli</i> CE3.	99
3.2.4	Determinación de H ₂ O ₂ extracelular en <i>R. etli</i> CE3.	100
3.2.5	Medición de la actividad de aconitasa en <i>R. etli</i> CE3 (Modificación de Dingman y Sonenshein, 1987).	100
3.3	Resultados y discusión de la relación del estrés oxidativo con la síntesis de la TPP.	101
3.3.1	Síntesis de la TPP en la mutante sin catalasa <i>katG</i> ⁻ de <i>R. etli</i> CE3.	101
Figura 8	Crecimiento de la cepa <i>R. etli</i> CE3 y la mutante <i>katG</i> ⁻ en medio mínimo succinato amonio (SA) suplementado con biotina o tiamina durante el primer y segundo subcultivo a 30 °C y 200 rpm.	102
Figura 9	Comparación de los niveles de H ₂ O ₂ intra y extracelulares de la cepa <i>R. etli</i> CE3 y la mutante <i>katG</i> ⁻ en SA a las 5 horas de crecimiento a 30°C y 200 rpm.	103
Figura 10	Actividad de piruvato deshidrogenasa con TPP (ensayo completo) y sin TPP de la cepa <i>R. etli</i> CE3 y la mutante <i>katG</i> ⁻ en succinato amonio con tiamina a las 8 horas durante el primer cultivo y segundo subcultivo en SA a 30 °C y 200 rpm.	104
Figura 11	Actividades de piruvato deshidrogenasa de la cepa <i>R. etli</i> CE3 y la mutante <i>katG</i> ⁻ a las 8 horas del primer cultivo en SA con biotina o tiamina a 30 °C y 300 rpm.	104

Figura 12 Actividades de aconitasa de la cepa *R. etli* CE3 y la mutante *katG*⁻ en SA con biotina a las 8 horas del primer cultivo a 30 °C y 200 rpm. 105

3.3.2 Contenido de TPP en la mutante *katG*⁻. 105

Figura 13 Niveles endógenos de tiamina pirofosfato (TPP) en la cepa *R. etli* CE3 y *katG*⁻ cultivadas en SA con biotina-tiamina y SA a las 24 horas del primer cultivo y a las 32 horas (las 32 horas son las 8 horas del segundo subcultivo) a 30 °C y 200 rpm. 106

3.3.3 Resultados y discusión de la disminución de la oxidación de carbono y su relación con la síntesis de la TPP. 106

3.3.3.1 La síntesis de la TPP en la mutante *phbC*⁻ de *R. etli* CE3. 106

Figura 14 Niveles endógenos de tiamina pirofosfato (TPP) en la cepa *R. etli* CE3 y SAM100 *phbC*⁻ cultivadas en SA con tiamina+biotina y SA a las 24 horas del primer cultivo y a las 32 horas (las 32 horas corresponde a 8 horas del segundo subcultivo) a 30 °C y 200 rpm. 107

3.3.4 Resultados con discusión de la suplementación de piridoxal-HCl y su relación con la síntesis de la TPP. 107

3.3.4.1 Efecto de la suplementación del piridoxal-HCl sobre el crecimiento de la cepa *R. etli* CE3 en succinato-amonio (SA) y piruvato-amonio (PA). 107

Figura 15 Crecimiento de la cepa *R. etli* CE3 en piruvato amonio con biotina o piridoxal-HCl a 30 °C y 200 rpm. 109

3.3.5 Resumen de la discusión capítulo III. Relación de la síntesis de la tiamina con el estrés oxidativo, la disminución de la oxidación de carbono y la suplementación de piridoxal-HCl. 109

3.3.6 CONCLUSIONES CAPITULO III. Relación de la síntesis de la tiamina con el estrés oxidativo, la disminución de la oxidación de carbono y la suplementación de piridoxal-HCl. 110

ONCLUSIONES GLOBALES. 111

5 PERSPECTIVAS. 113

6 LITERATURA CITADA. 114

1 Título

Una visión metabólica y genética de la síntesis de la tiamina durante el metabolismo aeróbico y fermentativo de *Rhizobium etli* CE3.

1.1 Resumen

El contenido de TPP de la cepa *R. etli* CE3 en succinato amonio (SA) fue de 36% comparado con succinato amonio con biotina (SAB) durante el segundo subcultivo, por lo que se propone que la limitación de tiamina determina la transición del metabolismo aeróbico a fermentativo, en respuesta la bacteria sobre-expresa los operones *thiCOSGE* y *thiMEeD* para la síntesis de la tiamina, así como el operón *bioMNY* para importar la biotina. En el genoma de *R. etli* CE3 no se encuentran completas las vías metabólicas para la síntesis de la tiamina y la biotina, por lo que se propone que la bacteria recluta proteínas que probablemente tengan una afinidad muy baja por sus sustratos, que en una condición de baja oxidación de carbono como lo es el metabolismo fermentativo, la síntesis de la tiamina sea aún más ineficiente y por lo tanto insuficiente. Los datos de actividades enzimáticas y fusiones transcripcionales fueron confirmados en los transcriptomas SA-SAB y SA-SAT (SA con tiamina), tales como; la elevación de la transcripción de genes de la piruvato deshidrogenasa, oxoglutarato deshidrogenasa, genes de la vía de síntesis de las tiamina y de importación de la biotina, lo que apoya la propuesta de que *R. etli* CE3 subcultivado en SA presenta una limitación de sustratos para la síntesis de estas vitaminas. Se observó que la síntesis de la tiamina y piridoxal fosfato dependen del carbono gluconeogénico. La actividad enzimática de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, primera enzima de la gluconeogénesis en SA es baja comparada con SAB lo que sugiere que se encuentra limitado el carbono gluconeogénico, de acuerdo con esto, la bacteria solamente sobre-transcribe el gen *zwf1* de la vía de las pentosas fosfato en SA mientras que en SAB sobre-expresa los genes *purF*, *dht*, *iunH2*, *carA* y *nadA* para el metabolismo de las purinas y pirimidinas. Así mismo, en SA del transcriptoma SA-SAT, se observó elevada la transcripción de genes que participan en vías metabólicas dependientes de fosforibosilpirofosfato; *hisF1*, *hisCch3*, *ndk* y *add*, lo que sugiere que la bacteria está limitada de carbono gluconeogénico mientras que en SAT se sobre-transcribieron los genes de la gluconeogénesis *pgk* y *dme*. El contenido de TPP en las mutantes *katG* y *phbC* es bajo comparado con la cepa silvestre, la mutante *phbC* tiene una oxidación de carbono baja, lo que apoya la propuesta de que la disminución de la oxidación del carbono de la cepa *R. etli* CE3 durante el metabolismo fermentativo limita la síntesis de la tiamina y probablemente el piridoxal fosfato.

1.2 Abstract

In this work it was proposed that thiamine limitation determines the transition from aerobic to fermentative-like metabolism in *R. etli* CE3 strain. Thiamine pyrophosphate (TPP) content was 36% in ammonium succinate (AS) as compared with SA supplemented with biotin (ASB), as a response to thiamine limitation, *R. etli* CE3 over-expressed the thiamine operons *thiCOSGE* and *thiMEeD*, as well as operon *bioMNY* to import biotin. The *R. etli* CE3 genome does not contain orthodox complete pathways for thiamine and biotin synthesis, and then it was proposed that proteins are recruited for synthesis which may have higher affinity constants for their substrates, that under a low oxidation condition and flux of carbon during the fermentative-like metabolism, thiamine synthesis can become inefficient and also insufficient. Enzymatic activity data and transcriptional thi-fusions were confirmed in the AS-ASB and AS-AST (AS supplemented with thiamine) transcriptomes, such as in AS, higher level of enzymatic activities of pyruvate dehydrogenase, α -ketoglutarate dehydrogenase and the level of thi-box genetic fusions. This data suggest that *R. etli* CE3 subcultivated in AS becomes limited of carbon substrates for vitamin synthesis. It was observed that thiamine and piridoxal phosphate synthesis depend on the gluconeogenic carbon; the enzymatic activity for the gluconeogenic pathway phosphoenolpyruvate carboxylase is low in AS compared with ASB, which suggests that carbon flux in this pathway is limited. In addition, only *zwf1* was over-transcribed in AS while in ASB were *purF*, *dht*, *iunH2*, *carA* and *nadA* for metabolism of purine and pyrimidine. Moreover, data from transcriptomes conditions AS-AST show that in AS, genes *hisF1*, *hisCch3*, *ndk*, and *add* from phosphoribosylpyrophosphate dependent pathways were over-transcribed, while in an efficient AST growth condition, *pgk* and *dme* were found for gluconeogenesis, this suggests that gluconeogenic carbon is limited in *R. etli* CE3 during fermentative-like metabolism. Low TPP content of *R. etli* mutants *katG* and *phbC* as compared with wild type *R. etli* CE3 strain, shows a correlation of a low oxidation capacity of mutant *phbC* with thiamine synthesis, which supports the hypothesis that in *R. etli* CE3 strain, low oxidation of carbon limits the thiamine synthesis and probably piridoxal phosphate.

1.3 CAPITULO 1. AMPLIACION DE LA DISCUSION DEL ARTICULO: Thiamine limitation determines the transition from aerobic to fermentative- like metabolism in *Rhizobium etli* CE3.

1.4 Introducción.

Fijación biológica de nitrógeno.

México posee una población de 103 263 388 habitantes (INEGI, 2005), por lo que la demanda de alimento se encuentra en aumento y gran parte de esta población adquiere una parte de su ración proteica del frijol (*Phaseolus vulgaris*). Desde la revolución verde en los años sesenta, el fertilizante nitrogenado es el más utilizado en la agricultura, por ser el nitrógeno el nutriente más limitante para la mayoría de los cultivos. Para su fabricación, se utiliza el proceso desarrollado por Haber-Bosh, el cual consume mucha energía, se volatiliza en forma de óxidos de N₂ a la atmósfera, agota fuentes no renovables, provoca un desequilibrio en el ciclo global del nitrógeno en la atmósfera, y genera lixiviados de NO₃⁻ que contaminan mantos freáticos. La fijación biológica de nitrógeno es la alternativa viable a la fertilización química. Los únicos organismos capaces de transformar el N₂ del aire en NH₃ y después en aminoácidos y proteínas, son organismos procariotas como eubacterias, actinomicetos y cianofíceas (Elkan., 1992).

Entre las bacterias que realizan la fijación simbiótica del nitrógeno con plantas de la familia Leguminosaeae se encuentra la familia Rhizobiaceae.

Esta familia incluye bacterias como; *R. etli*, *R. tropici* subgrupos A y B, *S. meliloti*, *Mesorhizobium loti*, *Bradyrhizobium japonicum*, *R. leguminosarum* biovar *viciae*, *phaseoli* y *trifolii*, que son nombradas colectivamente como rhizobia. Estas bacterias inducen el desarrollo del nódulo en las raíces de las leguminosas mediante un diálogo químico con la planta, ya que estas plantas secretan al suelo una variedad de compuestos flavonoides (genisteína, luteolina etc.). Estos compuestos son reconocidos por los productos de los genes *nod* del *Rhizobium*.

En conjunción, los flavonoides actúan como co-inductores con la proteína NodD para la activación transcripcional de un número de genes *nod* inducibles. Los productos de los genes *nod* activan una ruta biosintética específica para la síntesis de lipo-quitooligosacáridos, que son moléculas señal que el *Rhizobium* secreta en la rizósfera, las cuales inician la morfogénesis del nódulo en la planta hospedera (Schultze y Kondorosi., 1998). Las bacterias entran al citoplasma de las células de la raíz a través de los hilos de infección,

diferenciándose en bacteroides y empezando la fijación de nitrógeno y el intercambio metabólico.

La nitrogenasa es el complejo enzimático que cataliza la reducción de nitrógeno atmosférico a amonio: $N_2 + 8H + 8e^- + 16ATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16P_i$

La nitrogenasa es un complejo enzimático muy uniforme y conservado en todos los procariotes que fijan nitrógeno. El nitrógeno reacciona con una forma reducida de un cofactor (FeMo) que se encuentra en un complejo proteico tetramérico. Como el nitrógeno está enlazado al cofactor, una molécula de hidrógeno es desplazada. El complejo de la nitrogenasa es entonces reducido por la transferencia de el electrón de un adenosina trifosfato (ATP), unido a una proteína que contiene fierro.

La fijación de nitrógeno requiere altas cantidades de ATP y el complejo enzimático de la nitrogenasa es altamente sensible a la desnaturalización por oxígeno, por lo que este proceso se puede llevar a cabo en anaerobiosis, microaerobiosis o bajo condiciones donde el oxígeno libre esté excluido del sitio catalítico de la nitrogenasa (Brewin *et al.*, 1992).

1.5 La tiamina.

La tiamina, vitamina B1, tiamina pirofosfato, tiamina difosfato, TPP o cocarboxilasa, es un componente esencial de la dieta humana porque no la sintetizamos, requerimos un consumo diario de 1.4 mg de ésta vitamina. La tiamina se produce mediante síntesis química en el orden de 3 300 toneladas por año y es sintetizada por bacterias y plantas entre otros microorganismos (Begley *et al.*, 1999b). La tiamina pirofosfatada (TPP) es un cofactor de enzimas que realizan descarboxilaciones oxidativas en el metabolismo central del carbono tales como: piruvato deshidrogenasa (PDH), oxoglutarato deshidrogenasa (ODH), transcetolasa (TKT), y 1-deoxi-xilulosa-5-fosfato sintasa (DXS) (Schörken *et al.*, 1998). Estos compuestos participan en vías metabólicas importantes como el ciclo de Krebs, la vía de las pentosas fosfato, biosíntesis de los aminoácidos y en la síntesis de tiamina y piridoxal fosfato.

La deficiencia de tiamina en los humanos causa las enfermedades conocidas como beri-beri y síndrome de Werminke-Korsakoff. Hay dos tipos de beri-beri, el beri-beri húmedo afecta el sistema cardiovascular, el cual provoca edemas progresivos por insuficiencia cardiaca, el beri-beri seco y el síndrome de Werminke-Korsakoff afecta el sistema nervioso, la tiamina en la dieta previene y en su caso revierte estos trastornos, excepto en caso de pacientes que pierden la capacidad de absorber B1 a nivel intestinal y que es hereditaria, el cual se conoce como beri-beri genético.

1.6 La función de la tiamina.

La tiamina pirofosfato tiene la función de estabilizar el acil carbanión (Schowen., 1998). Participa en la descarboxilación del piruvato en complejos multienzimáticos como la piruvato deshidrogenasa, entre otras. La piruvato deshidrogenasa es un complejo

multienzimático compuesto de tres enzimas; E1 (piruvato deshidrogenasa), E2 (dihidrolipoil transacetilasa) y E3 (dihidrolipoil deshidrogenasa) (Fig. 1).

La enzima E1 es un subcomplejo heterotetramérico $\alpha_2\beta_2$ el cual se reorganiza de tal forma que favorece la pérdida del protón del carbono 2 del anillo del tiazol de la TPP, lo cual genera el carbanión que es el estado activado, esto sucede una vez que se ha unido el piruvato (Frank *et al.*, 2004), (Fig. 1, reacción 1).

En la descarboxilación del piruvato, 2 de 3 átomos del piruvato son portados en el carbono 2 del anillo tiazólico en la forma de intermediario E1-hidroxietyl, en el complejo multienzimático de la piruvato deshidrogenasa (Fig. 1, reacción 1), el intermediario E1-hidroxietyl es transferido a la enzima dihidrolipoil transacetilasa, (E2) (Fig. 1 reacción 2), del complejo multienzimático, la reacción ocurre por ataque del grupo E1-hidroxietyl sobre el grupo lipoamido-disulfuro del E2, con la consecuente liberación de la TPP, la regeneración del E1 y la formación en la E2 del acetyl-dihidrolipoamido (Fig. 1, reacción 2) mientras que el intermediario hidroxietyl carbanión de E1 es oxidado a un grupo acetyl en E2.

La enzima E2 cataliza la transferencia del grupo acetyl a la CoA-SH produciendo acetyl-CoA (Fig. 1 reacción 3) y la reducción del dihidrolipoamido de la enzima E2, lo cual ocurre por un ataque del sulfidril de la CoA-SH al acetyl de la dihidrolipoamido del E2.

Finalmente en la reacción del complejo de la piruvato deshidrogenasa, el tercer participante es la dihidrolipoil deshidrogenasa, E3, (Fig.1 reacción 4-5) la cual oxida el dihidrolipoamido del E2 en una reacción dependiente de NAD^+ .

Es importante destacar que el intermediario carbanión tiene una tendencia muy fuerte a formar un nuevo enlace, es decir que es muy inestable. El anillo del tiazol de la TPP en el subcomplejo E1, estabiliza el carbanión intermediario por proveer una estructura electrofílica dentro de la cual los electrones carbaniones pueden ser deslocalizados por resonancia (Nelson y Cox., 2000; Voet., 1995).

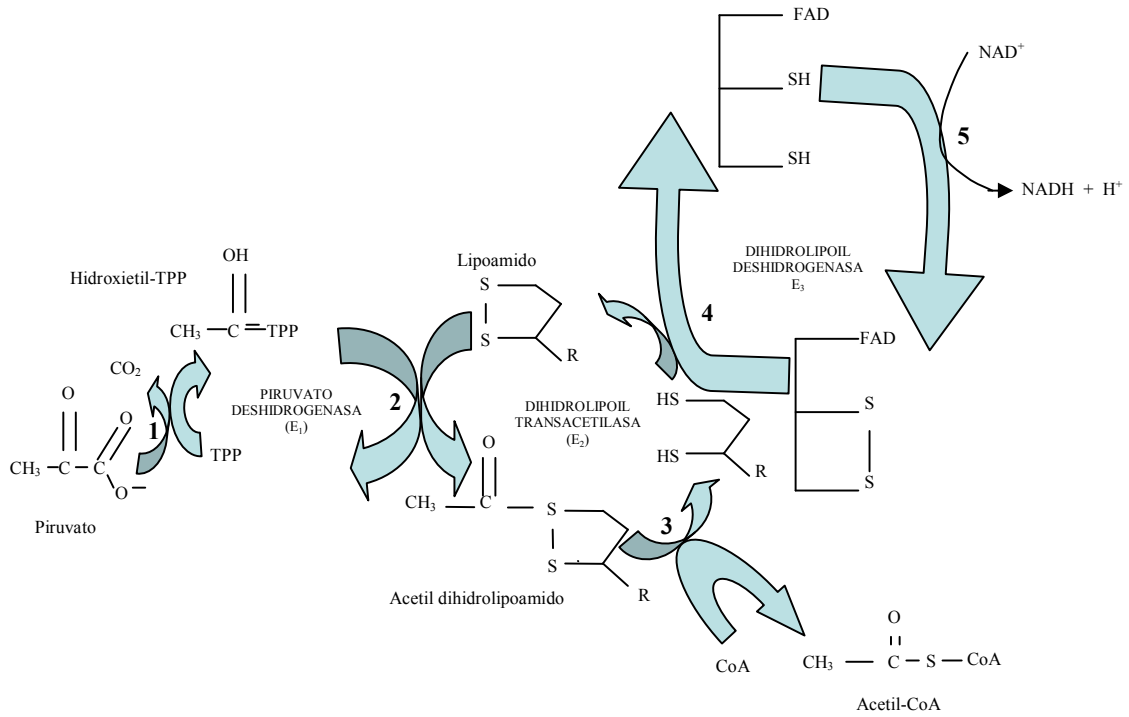


Figura 1 Actividades del complejo multienzimático de la piruvato deshidrogenasa (Voet., 1995).

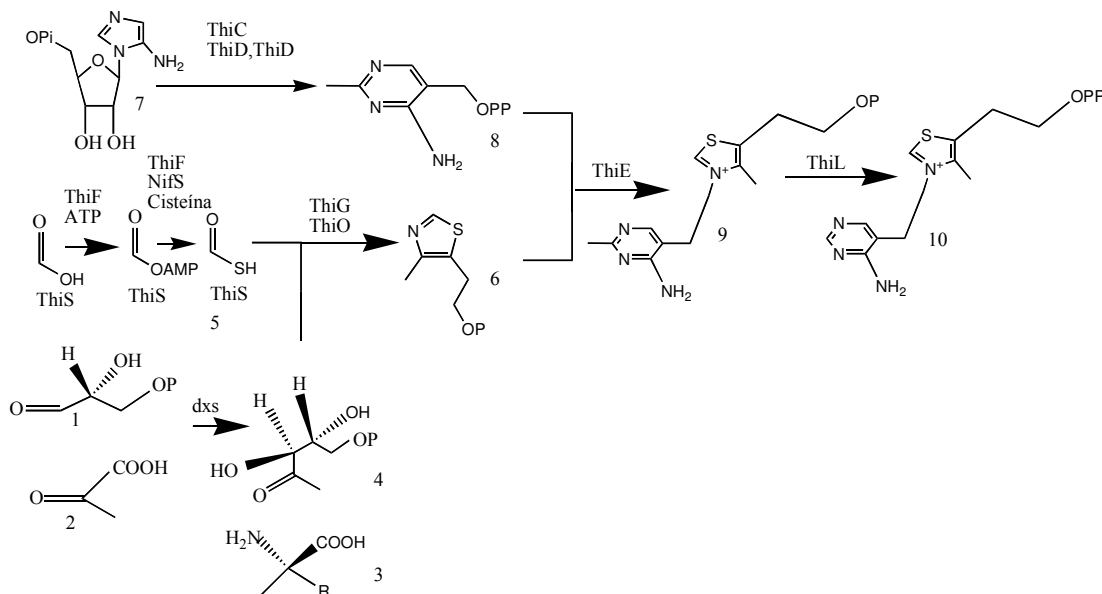


Figura 2 Síntesis de la tiamina pirofosfato en *Bacillus subtilis*. (Modificado de Joo-Heon Park *et al.*, 2003)

1.7 Síntesis de la tiamina Pirofosfato.

Para la síntesis de TPP en *E. coli* y *B. subtilis* (Settembre *et al.*, 2003) se requiere de la participación de al menos 11 enzimas (Settembre *et al.*, 2003). La TPP está formada por dos compuestos heterocíclicos los cuales se sintetizan de manera independiente: el 4-metil-5-(β-hidroxietil) tiazol monofosfato (HET-P) (Fig. 2, compuesto No. 6) y el 4-metil-5-hidroxitiazol-2-metilpirimidin pirofosfato (HMP-PP) (Fig. 2, compuesto No. 8). La tiamina monofosfato sintasa ThiE une covalentemente a HET-P y HMP-PP y produce la tiamina monofosfato (Fig. 2, compuesto No. 9). La proteína ThiL lleva a cabo una segunda fosforilación de la tiamina monofosfato produciendo la tiamina pirofosfato TPP (Fig. 2 compuesto No. 10).

1.8 Biosíntesis del tiazol de la tiamina (HET-P).

Los genes para la síntesis del componente HET-P de la tiamina son: *thiO*, *thiS*, *thiG*, *dxs*, *thiM*, *thiI*, *thiF*, *nifU*, *nifS*, *moeB*, *thiJ*. La síntesis del HET-P (Fig. 2, compuesto No. 6) de la tiamina inicia con la enzima Dxs la cual sintetiza deoxi-D-xilulosa 5 fosfato (Fig. 2, compuesto 4) a partir de gliceraldehído 3-P (Fig. 2, compuesto 1), piruvato (Fig. 2, compuesto No. 2) y TPP como cofactor, mientras que la enzima ThiS, en presencia de ATP se adenila enzimáticamente por la proteína ThiF, para dar el acil adenilato ThiS-Co-AMP, este intermediario es el aceptor del azufre para dar el tiocarboxilato ThiS-Co-SH (Fig. 2, compuesto No. 5). Como se observa en el esquema, se necesita cisteína y la participación de NifS-piridoxal fosfato dependiente con NifU para la reacción de transferencia del azufre de la cisteína a la proteína NifS (Zheng *et al.*, 1993). ThiI presente en *E. coli* participa en la

tiouridilación de los tRNA en la uridina en la posición 8 (Taylor *et al.*, 1998), el cual es un adaptador que acepta el azufre sulfuro de IscS para donarlo al ThiS acil-adenilato (Settembre *et al.*, 2003), mientras que la proteína ThiJ descrita en *E. coli* participa en la transferencia del azufre para la síntesis del tiazol (Begley *et al.*, 1999a).

Cuando el tiazol se encuentra en el medio, las bacterias lo transportan y es fosforilado por la proteína ThiM la cual está presente en *E. coli*, mientras que en *B. subtilis* está fosforilación la lleva a cabo ThiK (Settembre *et al.*, 2003).

La Oxidasa ThiO de *B. subtilis* y especies de *Rhizobium* (Tabla 1) cataliza la oxidación de la glicina (Fig. 2, compuesto No. 3) para dar el intermediario glicino imino los cuales forman el C-2 y el N-3 del anillo del tiazol, ésta enzima presenta una alta similitud con sarcosina oxidasas y con oxidasas de D-aminoácidos. Cabe destacar que en las enterobacterias el compuesto imino intermediario es sintetizado por ThiH, la cual presenta un centro Fe-S, el centro Fe-S de ThiH interacciona con S-adenosil metionina (SAM), lo que permite la generación del radical 5'-deoxiadenosil produciendo mediante una serie de reacciones un radical tirosilo que resulta en un glicino-imino (Settembre *et al.*, 2003; Martínez-Gómez *et al.*, 2004). La tiazol sintasa ThiG participa en la formación del anillo del tiazol fosfato (Fig. 2, compuesto No. 6) a partir de ThiS-Co-SH (Fig. 2, compuesto No. 5), glicina-imina (Fig. 2, compuesto No. 3) y deoxixilulosa fosfato (Fig. 2, compuesto 4) (Park *et al.*, 2003; Dorrestein *et al.*, 2004).

1.9 Biosíntesis de la pirimidina de la tiamina (HMP-PP).

La biosíntesis de la parte pirimidina (Fig. 2, compuesto 8) de la tiamina inicia con el ácido 5-aminoimidazol-4-carboxamido ribonucleótido (AIR) que es un intermediario de la síntesis de las purinas (Fig. 2, compuesto 7) (Newell y Tucker., 1968). La proteína ThiC junto con participación de ThiD la cual es una quinasa, convierte el AIR en hidroximetilpirimidino-monofosfatado (HMP), se requiere una segunda quinación del HMP por la proteína ThiD para generar hidroximetilpirimidino-difosfato HMP-PP (Fig. 2, compuesto 8). En *Salmonella typhimurium* se describió además la presencia del gen *apbE*, la interrupción de este gen provoca la auxotrofia del componente hidroximetilpirimidino de la tiamina, este gen codifica para una proteína transmembranal (Beck y Downs., 1998), y se encuentra en 76 de un total de 155 especies (Uchiyama., 2003), faltan aún por descubrirse procesos bioquímicos relacionados en la conversión del ácido AIR a HMP-PP en procariotes.

1.10 Síntesis de la tiamina *in vitro*.

La reconstitución de la síntesis de la tiamina ha mostrado una bioquímica fascinante, porque son reacciones químicas que no se habían descrito anteriormente, no solo en la síntesis de la parte tiazólica en la que sucede una reacción tipo amadori del grupo imino seguida de una adición nucleofílica de la proteína acarreadora del azufre ThiS-tiocarboxilato a este grupo carbonilo (Dorrestein *et al.*, 2003), sino además en la parte

pirimidínica que involucran reacciones químicas sin precedente en la literatura (Lawhorn *et al.*, 2004).

La síntesis del tiazol-P en *E. coli* la lleva a cabo la proteína ThiH (Martinez-Gomez *et al.*, 2004) mientras que en *B. subtilis* así como en *R. etli* se realiza mediante la oxidasa producto del gen *thiO*, el sustrato inicial de la proteína ThiH es tirosina, mientras que ThiO usa glicina (Joo-Heon *et al.*, 2003). La síntesis del tiazol-P *in vitro* con ThiH no se ha completado porque ésta se inactiva en presencia de oxígeno, ya que es una enzima que tiene un centro $[4\text{Fe-4S}]^+$ (Leonardi *et al.*, 2003). En *B. subtilis*, ThiO no tiene este centro Fe-S y no se inactiva por oxígeno, por lo que para la síntesis del tiazol-P *in vitro* se sobre-expresó en *E. coli thiO* junto con los genes *thiSG*, *thiG* y *thiF* ingenierados con colas de histidina.

Las proteínas se purificaron en columnas de afinidad de Ni-NTA, las colas de histidina no interfieren con la actividad de estas proteínas. Para la síntesis del tiazol-P se mezclaron glicina, DXP (deoxixilulosa-3-P) y cisteína con las proteínas purificadas de ThiO, ThiF, ThiSG y NifS, el producto de ésta reacción se continuó hasta la formación de tiamina-P en presencia de ThiD, ThiE, ATP y MgCl_2 , ya que el tiazol-P es difícil de visualizarlo, la tiamina-P fue derivatizada para formar el tiocromo fosfato y analizarlo mediante fluorescencia después de una cromatografía en HPLC (Joo-Heon *et al.*, 2003). Además de llevar a cabo cada una de las reacciones individuales de las proteínas para la síntesis del tiazol-P, probaron distintas cisteína desulfurasas identificadas en *B. subtilis*: NifS, YrvO, NifZ y CSD, contrario a lo esperado NifZ seguida de NifS fue la enzima más eficiente en la formación de ThiS-COSH en una mezcla de reacción con $[^{35}\text{S}]$ -cisteína, ATP, ThiGS, ThiF y cada una de las cisteína desulfurasas. En este trabajo se demostró que es posible sustituir NifS, ATP, cisteína, ThiS y ThiF por 1 mM de Na_2S (sulfito de sodio) con ThiO, ThiG, DXP glicina y DTT para la formación del ThiS-tiocarboxilato el cual fue analizado mediante espectroscopia de ESI-FTMS (Electrospray ionization-Fourier transform mass spectrometry). El ThiS-COSH fue evaluado en la formación de tiazol-P, la mezcla simplificada fue de Na_2S , amonio, DXP, glioxilato y ThiG, incubados 1 hora a 25 °C, lo que dio una eficiencia de 70%, demostrando además en este experimento que la sintasa del tiazol es ThiG (Joo-Heon *et al.*, 2003), el papel de la proteína ThiI no es claro ya que en estas condiciones su presencia no mejoró los rendimientos de tiazol-P (Joo-Heon *et al.*, 2003).

La síntesis de la pirimidina de la tiamina-P (HMP-P) se lleva a cabo con la participación de las proteínas ThiC y ThiD, la detección del HMP-P es mediante su incorporación en la tiamina-P, la cual posteriormente se oxida a tiocromo para su detección mediante fluorescencia en presencia de tiazol-P, ThiE, ATP y MgCl_2 . Es importante anotar que la mayor eficiencia de la síntesis del HMP-P en presencia de ácido amino-imidazol ribótido (AIR) y ThiC es con NADH, NADPH y s-adenosil metionina (SAM) y de un factor proteico aún no determinado proveniente de una cepa de *E. coli thiC*, el grupo metilo de SAM no se incorpora en el HMP y tampoco sirve como una fuente de radical 5'-deoadenosil, su función aun no es clara (Lawhorn *et al.*, 2004). De manera preliminar se sabe a partir de estudios con isótopos que todos los carbonos del AIR se incorporan en el

HMP (Lawhorn *et al.*, 2004), el tiazol-P fue sintetizado *in vitro* a partir de un extracto de células de *E. coli* 83-1 y proteínas purificadas ThiGH-histidinas en condiciones anaeróbicas para proteger la actividad de la ThiH, la cepa de *E. coli* se cultivó en presencia de adenina.

Se ha reportado que en ésta condición la tiamina decrece, las enzimas que la usan aumentan y las enzimas dependientes de TPP se incrementan, por ésta razón se usó ésta cepa (Lawhorn *et al.*, 2004).

1.11 Regulación de la síntesis de la tiamina.

El gen *thiC* del operón *thiCOSGE* de *R. etli* contiene en su región líder una caja conservada, la caja "thi" de 38 pb. así como en el *thiC* de distintas especies (Miranda-Ríos *et al.*, 1997), además del operón *thiMD* de *S. typhimurium* (Petersen y Downs 1997). El análisis transcripcional de fusiones *thiC::lacZ* de la región líder de *thiC*, mostró que la actividad de B-galactosidasa dependía del tamaño de la región líder, estos experimentos sugieren que la caja *thi* está relacionada con la represión de la expresión de *thiC* (Miranda-Ríos *et al.*, 2001). No se encontró una proteína que estuviera involucrada en la represión de la expresión de *thiC* (Miranda-Ríos *et al.*, 2001; Begley *et al.*, 1999a). En ausencia de tiamina, la expresión del gen *thiC* es constitutiva, la región líder no participa en la modulación de *thiC*, por tanto se traduce mRNA de *thiC*, mientras que en presencia de tiamina, la región líder adopta una estructura de tallo asa que bloquea el acceso del sitio de unión a ribosomas del mensajero, lo que provoca una terminación prematura de la traducción (Miranda-Ríos *et al.*, 2001).

Cuando se mezcla *in vitro* 240 nt mRNA de *thiC* o 165 nt de mRNA de *thiM* con un exceso de compuestos derivados de tiamina, sea tiamina, tiamina monofosfato o TPP, los mensajeros son capaces de interactuar con la tiamina o la TPP sin la presencia de cofactores proteicos. Para demostrarlo, esta reacción fue digerida con nucleasas, ya que los fragmentos o dominios de la molécula de mRNA que no están acomplejados a los derivados de la tiamina formando estructuras secundarias son mas sensibles a la degradación, mientras que fragmentos de mRNA acomplejados a la tiamina son mas resistentes, el producto de esta digestión fue analizada en geles de poliacrilamida, obteniéndose un patrón de bandas característico. Adicionalmente, se observó que la TPP interactúa con la caja *thi* de manera específica, mientras que los compuestos con una estructura semejante a la TPP como la oxitiamina no lo hacen. Los complejos mRNA-tiamina, generan estructuras que secuestran el sitio de unión a ribosoma lo cual reduce la síntesis de la proteína ThiC cuando hay un exceso de TPP, cuando el nivel de TPP disminuye por debajo de la afinidad de la caja *thi*, el mRNA adopta una forma de anti terminador en estructura de tallo-asa que permite la traducción de mRNA (Winkler *et al.*, 2002).

En las bacterias Gram negativas a ésta estructura en la región líder del mensajero que inhibe la traducción mediante el enmascaramiento de la secuencia Shine-Dalgarno (SD) se le conoce como riboswitch (Miranda-Ríos 2007), uno de los trabajos pioneros del desarrollo del concepto del riboswitch como un modelo de regulación que define la interacción de metabolitos con la región líder del mRNA, fue con la región líder del gen

thiC de *R. etli* CE3 (Miranda-Ríos *et al.*, 2001). El plegado de la caja *thi* permitió definir estructuras que son semejantes en diversos riboswitches, la caja *thi* se pliega en una estructura parecida a un diapasón, en la que el brazo izquierdo del diapasón está representado por las estructuras de tallo P2, J3-2, P3 y L3, mientras que al lado derecho están J1-4, P4, J4-5, P5 y L5 ambas sostenidas de un tallo P1, cada uno de estos brazos tiene una función definida, el brazo P2/J3-2//P3/L3 está involucrado en la unión de la parte HMP, mientras que el brazo P4/J4-5/P5/L5 une el grupo pirofosfato de la TPP, por lo tanto la TPP une a los dos brazos del diapasón, los dos brazos del diapasón están unidos por el tallo P1, la formación del tallo P1 en presencia de tiamina-PP permite la formación de un tallo terminador o el secuestro del sitio Shine Dalgarno (Miranda-Ríos 2007).

En *B. subtilis* se describió el operón *ywbl-thiME*, el gen *ywbl* codifica para un regulador transcripcional tipo LysR, el segundo gen *thiM* codifica para una quinasa de tiazol y *thiE* codifica para una tiamina fosfato sintasa. Así mismo, se describió que cuando la cepa silvestre CU1065 de *B. subtilis* se cultivó en medio mínimo suplementado con 20 uM de tiazol, la transcripción de este operón disminuyó parcialmente durante el crecimiento exponencial (Zhang *et al.*, 1997).

1.12 Presencia de otros genes *thi* en *Rhizobium*.

Existen genes para la síntesis de la tiamina que se encuentran solo en algunas especies de *Rhizobium* (Tabla 1). *R. etli* carece del operón *thiBPQ* que codifica para una permeasa de tiamina tipo ABC dependiente de ATP, pero tiene una permeasa con un identificador RHE_PF00282 (*ypf00134*) que contiene un dominio pfam 02133 para el transporte de citosina purinas, uracilo, alantoína y tiamina. El gen *thiM* en *R. etli* codifica para una quinasa del tiazol, indispensable cuando se suplementa con tiazol al medio de cultivo, lo que genera HET-P. *thiI* en *E. coli* y *S. typhimurium* codifica para una proteína adaptadora que transfiere el azufre al acil adenilato de la proteína ThiS para la síntesis del HET-P (Settembre *et al.*, 2003 y Webb *et al.*, 1997). El gen *thiH* participa en la síntesis del HET-P, se encuentra en enterobacterias, mientras que en *B. subtilis* y especies de *Rhizobium* se encuentra el gen *thiO*. El gen *thiK* es una quinasa del HET-P, *thiJ* participa en la transferencia del azufre para la síntesis de thiS-Co-SH para la síntesis del HET-P, se encuentra en *B. subtilis* (Begley *et al.*, 1999a), el gen *moeB* codifica para una proteína similar a proteínas E1 y a ThiF, el complejo proteico MoeB-MoaD realiza la síntesis del intermediario acil-adenilato de MoaD, que en presencia de *IscS* sintetiza el MoaD-Co-SH, el cual es muy semejante a la reacción que realiza el complejo proteico ThiS-ThiF (Taylor *et al.*, 1998) (ver síntesis de la tiamina).

No se ha reportado que ThiF sea sustituido por MoaB en la síntesis de la tiamina, probablemente porque no puedan formar complejos proteicos como ThiF en el residuo cys-184 con el extremo carboxilo de ThiS, este complejo ThiS-ThiF es esencial en la síntesis del tiazol de la tiamina (Xi *et al.*, 2001). El gen *tenI* es un parálogo de *thiE* en la síntesis del HET-P.

El gen *goxB* codifica para una flavoproteína como las D-aminoácido oxidasas y sarcosina oxidasas, un análisis de estructura-función de *goxB* demostró que no se puede correlacionar con la síntesis de tiamina, y su estructura no muestra en qué forma podría interactuar con ThiS en *B. subtilis* (Mörthl *et al.*, 2004), datos de este trabajo mostraron que *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* 3841 tiene anotado el gen *goxB* en su genoma pero no se encontró reportado el gen *thiO* (Tabla 1). El gen *yloS* fue renombrado *thiN*, codifica para una pirofosfoquinasa de tiamina (Melnick *et al.*, 2004) se encuentra presente en *R. etli*, *S. meliloti*, *M. loti* y *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* pero no en *B. japonicum*, *Bradyrhizobium* sp., *A. tumefaciens* y *R. palustris*.

Contenido de los genes *thi* en especies de *Rhizobium* y especies relacionadas.

CEPA	GENES												
	<i>thiC</i>	<i>thiO</i>	<i>thiS</i>	<i>thiG</i>	<i>thiE</i>	<i>dxs</i>	<i>thiM</i>	<i>thiI</i>	<i>thiF</i>	<i>thiH</i>	<i>thiD</i>	<i>apbE</i>	
<i>R. etli</i> CE3	+	+	+	+	3*	+	+				+		
<i>S. meliloti</i> 1021	+	+		+	2	+			+		+		
<i>M. loti</i>													
MAFF303099	+	+		+	+							+	
<i>M. loti</i> R7A	+	+	+	+	+						+		
<i>B. japonicum</i>													
USDA 110	+	+		2	2	+					+		
B.sp. ORS278	+	+	+	+	4	+					+	+	
B. sp. BTA11	+	+	+	+	2	+					+	+	
<i>Rhizobium leguminosarum</i>													
biovar viciae 3841	+	+			2	+	+				+	+	
<i>A. tumefaciens</i> C-58	+	+	+	+	+	+					+		
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> CGA009	+	+		2	+	+					+		

+* Se refiere a que el genoma contiene una copia del gen.

*- Se refiere al número de copias que ese genoma contiene.

Continuación de la Tabla 1. Presencia de los genes *thi* en *Rhizobium* y especies relacionadas

CEPA	GENES											
	<i>thiB</i>	<i>thiP</i>	<i>thiQ</i>	<i>thiK</i>	<i>thiL</i>	<i>thiJ</i>	<i>nifU</i>	<i>nifS</i>	<i>moeB</i>	<i>tenI</i>	<i>goxB</i>	<i>yloS</i>
<i>R. etli</i> CE3							3	2	+			
<i>S. meliloti</i> 1021	+	+	+					+				
<i>M. loti</i>												
MAFF303099	+	+	+				+	4				
<i>M. loti</i> R7A								+				
<i>B. japonicum</i>												
USDA 110					+			3	2			
B.sp. ORS278					+		3	2	+			
B. sp. BTA11					+		3	2	+			
<i>Rhizobium leguminosarum</i>												
biovar viciae 3841						+	+	+				+
<i>A. tumefaciens</i> C-58	+	+	+						+			
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> CGA009					+	+	4	2	+			

+* Se refiere a que el genoma contiene una copia del gen.

*- Se refiere al número de copias del gen que ese genoma contiene.

1.13 Formación de los precursores para la síntesis de la tiamina.

Para la síntesis del HET-P de la tiamina se requiere de deoxixilulosa-P, la cual se sintetiza mediante la actividad de la enzima DXS dependiente de TPP a partir de 2 compuestos; gliceraldehído 3P y piruvato de la vía de gluconeogénesis (Sprenger *et al.*, 1997; Neidhardt., 1996). Así como cisteína y piridoxal fosfato en la reacción de transulfuración para la generación del ThiS-tiocarboxilato del HET-P. El azufre de la cisteína proviene del Mg_2SO_4 , la vía para la obtención del azufre en forma de sulfuro requiere de una reducción enzimática en la que se gastan 9 electrones en *E. coli*, (Voet *et al.*, 1995), mientras que la glicina para la síntesis del tiazol proviene de la vía piruvato-serina-glicina, es decir de la gluconeogénesis.

Para la síntesis del HMP-P de la tiamina se requiere el compuesto AIR el cual es intermediario de la síntesis de las purinas, la enzima AIR carboxilasa, PurE, de las síntesis de las purinas, compite con la proteína ThiC de la síntesis de la tiamina por el compuesto AIR. La vía de síntesis de las purinas requiere de ATP y ribosa 5-P, la cual proviene de la vía de las pentosas fosfato, para producir fosforibosil pirofosfato (PRPP) mediante la actividad de la enzima ribosa fosfato pirofosfoquinasa. PRPP también es un precursor para la biosíntesis de los aminoácidos histidina y triptófano (Voet *et al.*, 1995).

Para el crecimiento de *S. enterica* se requiere de 1000 moléculas de purinas y solo una de TPP, por tanto, los flujos metabólicos son importantes para la síntesis de la TPP (Allen *et al.*, 2002). En resumen, la síntesis de la TPP depende de la vía de las pentosas fosfato, que genera ribosa-5P para la síntesis del AIR en la vía de las purinas, de las vías de síntesis de los aminoácidos glicina y cisteína y de los cofactores piridoxal fosfato y TPP.

1.14 Síntesis de la biotina en *Rhizobium* y contenido de genes *bio* en distintas especies.

La biotina es un cofactor de enzimas carboxilasas tales como: la piruvato carboxilasa (PC) y la acetil CoA carboxilasa (ACC), *Rhizobium* a diferencia de las enterobacterias posee PC (Dunn *et al.*, 1996). En la síntesis de la biotina se requiere de al menos la participación de 5 enzimas (Streit y Entcheva, 2002; Streit y Entcheva., 2003; Guillén-Navarro *et al.*, 2005b). BioW en presencia de ATP y CoA convierte el ácido pimélico en pimeloil-CoA, BioF la cual usa alanina como donador del grupo amino (ésta reacción es dependiente de piridoxal fosfato), convierte al ácido pimeloil-CoA en el ácido 7-ceto-8-aminopelargónico (KAPA). BioA en presencia de S-adenosilmetionina convierte KAPA en el ácido 7,8 diaminopelargónico (DAPA), BioD en presencia de ATP y CO_2 cataliza la conversión de DAPA en d-detiobiotina y finalmente BioB en presencia de NADPH, S-adenosilmetionina, flavodoxina y azufre proveniente del centro 4Fe-4S de BioB produce d-biotina a partir de d-detiobiotina (Streit y Entcheva, 2002; Guillén-Navarro *et al.*, 2005b). El sustrato inicial para la síntesis de la biotina no está definido y probablemente es diferente entre las especies de *E. coli* y *Bacillus spp.* En *B. sphaericus* y *B. subtilis* este sustrato es el ácido pimélico y este es convertido a pimeloil CoA mediante la actividad de las proteínas codificadas por los genes *bioI* y *bioW* (Streit y Entcheva *et al.*, 2002).

R. etli, a diferencia de *E. coli*, es capaz de usar ácido pimélico para sintetizar biotina (Guillén-Navarro *et al.*, 2005b), sin embargo, carece de los genes *bioI* y *bioW* y del gen *bioZ* presentes en *M. loti* para sintetizarlo (Tabla No. 2). El gen *bioZ* de *M. loti* es capaz de complementar una mutante *bioH* de *E. coli* (Sullivan *et al.*, 2001), BioZ cataliza la condensación de un tioéster con un compuesto de carbono impar para producir pimeloil-ACP, seguida de una transacetilación del pimeloil-ACP para generar pimeloil-CoA (Sullivan *et al.*, 2001). En *S. meliloti* 1021 se ha identificado el gen *bioH*, mediante un análisis tipo blastX y blastP (Cummings *et al.*, 2002) (Tabla No. 2), pero este gen no complementa la mutante *bioH* de *E. coli* BM7086, por lo cual se piensa que otro gen podría estar participando en la síntesis de pimeloil-CoA (Entcheva *et al.*, 2002).

El gen *bioS* solamente está presente en *S. meliloti* 1021 (Tabla No. 2), el producto de este gen es un posible regulador tipo LysR, con un sitio de unión a DNA. Este gen se expresa en fase estacionaria en presencia de biotina. Mutantes en este gen incrementan la absorción de biotina exógena, extienden la fase estacionaria en presencia de biotina, mejoran el crecimiento y también la competitividad, además se expresa en las raíces durante la simbiosis con la planta de alfalfa, lo que denota su importancia durante la interacción bacteria-planta (Heinz *et al.*, 1999). Es interesante mencionar que *bioS* se expresa en SA con biotina y coincide con la expresión del gen *bdhA* (β -hidroxibutirato deshidrogenasa) para la degradación del polímero PHB (Hofman *et al.*, 2000). Sabemos por trabajos realizados en este laboratorio que *R. etli* CE3 en SA suplementado con biotina sintetiza PHB y lo degrada por lo que no se acumula en la fase estacionaria (Encarnación *et al.*, datos no publicados).

Los genes *bioMNB* (Tabla 2) fueron inicialmente descritos en *S. meliloti* 1021 (Entcheva *et al.*, 2002), el gen *bioM* es similar a *cbiO* que codifica para una proteína que une ATP en un transportador tipo ABC, *bioN* no presenta homología con proteínas o genes conocidos. Las mutantes en *bioM* o *bioN* de *S. meliloti* 1021 disminuyeron su crecimiento en medios sin biotina, en tanto que el efecto polar de las inserciones en *bioM* o *bioN* sobre la transcripción de *bioB* fue de menor importancia, lo cual fue confirmado mediante complementaciones *en trans* con el gen *bioB* bajo la influencia del promotor del gen *nodD3*. Se realizaron experimentos de transporte de biotina marcada con carbono 14, en mutantes *bioM* y *bioN* de *S. meliloti* 1021, y se observó que pueden transportar la biotina igual que la cepa silvestre durante los primeros 8 minutos, después de este tiempo las mutantes mostraron una notable baja en el contenido de biotina C¹⁴, de lo que se concluye que estas mutaciones afectan un sistema que sirve para mantener elevado el nivel intracelular de biotina mas no para su transporte. Lo anterior fue confirmado cuando las mutantes *bioM* y *bioN* se complementaron con el operón *bioABCFD* de *E. coli* ya que excretaron el doble de biotina comparado con la cepa silvestre control (Entcheva *et al.*, 2002). El gen *bioB* fue renombrado *bioY*, el cual pertenece a la familia de proteínas interPro IPR003784 las cuales tienen 6 dominios transmembranales, a diferencia del *bioB* de *E. coli* que es una biotina sintasa (Guillén-Navarro *et al.*, 2005).

El operón *bioMNY* también fue caracterizado en *R. etli*, sus secuencias presentan una similitud de 60%, 47% y 54% con el operón *bioMNB* de *R. meliloti* 1021,

respectivamente (Tabla 2). Guillén-Navarro y colaboradores (2005a) demostraron mediante experimentos de transporte de biotina con la mutante *bioM* de *R. etli* que el operón *bioMNY* conforma un sistema de transporte de alta afinidad por biotina a diferencia de *S. meliloti* 1021, y que *bioY* expresado en *trans* fue capaz de complementar parcialmente el defecto de transporte de la mutante *bioM*. Una mutante en el gen *bioY* creció menos que la cepa silvestre pero más que la mutante *bioM*, lo que sugiere que *bioY* también es un transportador de biotina. La transcripción del gen *bioM* se regula negativamente en presencia de biotina entre un 20 a 40% con respecto a SA. En SA con tiamina la transcripción de este promotor fue ligeramente inferior, se sabe que la tiamina estimula la síntesis de la biotina porque mantiene la actividad de la piruvato carboxilasa y correlaciona con su nivel de biotinilación en geles desnaturalizantes revelados con anticuerpos anti-estreptavidina conjugados con peroxidasa (Guillén-Navarro *et al.*, 2005a).

1.15 Regulación de la síntesis de la biotina.

En enterobacterias la incorporación de la biotina en las carboxilasas es mediante la participación de la proteína BirA. En *E. coli*, BirA-biotinilado se encarga de transferir su biotina a la subunidad de la acetil-CoA carboxilasa acarreadora de la biotina (BCCP) en una reacción dependiente de ATP. A BirA también se le conoce como Proteína ligasa de la biotina. Esta proteína presenta en su extremo amino terminal un sitio de unión a ADN por lo que es capaz de reprimir la transcripción de genes para la síntesis de la biotina cuando hay un exceso de complejos BirA-Biotinoil-AMP, lo cual no ocurre en condiciones de limitación de biotina ya que la biotina es transferida a las enzimas carboxilasas (Cronan, J. E. 1989). En *M. loti*, *B. japonicum*, *S. meliloti*, *R. etli* y *R. leguminosarum* la proteína BirA no tiene en su extremo amino el sitio de pegado a ADN y solo conserva los dominios para la biotinilación de las enzimas carboxilasas, lo que sugiere en rhizobia un mecanismo diferente para la regulación de la transcripción de los genes de la síntesis de la biotina (Guillén-Navarro *et al.*, 2005b).

Contenido de genes *bio* en especies de *Rhizobium* y especies relacionadas.

	<i>bioB</i>	<i>bioF</i>	<i>bioD</i>	<i>bioA</i>	<i>bioZ</i>	<i>bioS</i>	<i>bioC</i>	<i>bioH</i>	<i>bioW</i>	<i>bioM</i>	<i>bioN</i>	<i>bioY</i>
<i>R. etli</i> CE3				+						+	+	+
<i>S. meliloti</i> 1021		+				+		+		+	+	+
<i>M. loti</i>												
MAFF303099	3*	+	+		+							+
<i>M. loti</i> R7A	+	+	+	2	+							
<i>B. japonicum</i>												
USDA 110	+	+	+	2								
B.sp. ORS278	+											
B. sp. BTA11	+	+	+	+								
<i>Rhizobium leguminisarum</i>												
bv. <i>viciae</i> 3841												+
<i>A. tumefaciens</i> C-58	+	+	+	4						+	+	+
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> CGA009	+	+	+	+								

+* Significa que el genoma contiene una copia del gen.

3* Significa el número de copias que contiene ese genoma.

1.16 El papel de la tiamina y la biotina en la simbiosis.

Los factores de crecimiento en la rizósfera son importantes para la colonización de las bacterias del genero *Rhizobium*, es interesante que en los exudados de la raíz de la alfalfa se encontraron vitaminas solubles en agua como; biotina, tiamina y riboflavina (Rovira y Harris, 1961). Ahora se sabe que la suplementación de estas vitaminas en la rizósfera de la alfalfa promueven el crecimiento de *S. meliloti* 1021, de manera interesante el secuestro de la biotina de los exudados de la raíz de la alfalfa por la estreptavidina limita el crecimiento de *S. meliloti* 1021 (Streit y Phillips, 1996). En *S. meliloti* se observó la sobreproducción de biotina en una mutante en la síntesis de la biotina, complementada con el operón *bioABFCD*, provocando una mayor densidad celular en SA y 650 veces mas biotina que la cepa silvestre en un periodo de 7 días (Streit y Phillips, 1996). Inesperadamente se afectó la viabilidad de la cepa modificada mediante ingeniería genética notablemente a las 72 horas de un cultivo libre de biotina, solo el 1% de las bacterias fueron viables, lo que sugiere que la producción de biotina con un mejoramiento del crecimiento probablemente permitió la acumulación de un producto que incrementó la muerte celular. Este fenómeno de la pérdida de la viabilidad también se presentó en la rizósfera con la alfalfa, lo que no permitió evaluar el efecto de la biotina sobre la fijación de nitrógeno mediante la reducción de acetileno (Streit y Phillips, 1996). La colonización de la raíz de alfalfa por la mutante *bioM* de *S. meliloti* 1021 se afectó sensiblemente durante un periodo de evaluación de 140 horas (Entcheva *et al.*, 2002). En experimentos de competencia se coinoculó en proporción 1:1 la cepa silvestre y una cepa mutante *bioM* de *R. etli*, la cual presentó una disminución de la capacidad de formar nódulos en la simbiosis con la planta del frijol. Sin embargo a tiempos mas largos la mutante *bioM* no presentó diferencias estadísticamente significativas en reducción de acetileno, numero de nódulos, peso seco de la planta y peso seco de los nódulos (Guillén-Navarro *et al.*, 2005a).

Recientemente Karunakaran *et al.*, (2006), reportó que una mutación en el gen *thiM* del operón *thiMED* de *R. leguminosarum* biovar viciae no afecta negativamente la reducción de acetileno ni el peso seco de la planta a las 6 semanas de la simbiosis, pero sí está afectada en la competitividad ya que en experimentos de coinoculación con la cepa silvestre, la mutante solo ocupó el 35% de los nódulos. Fue interesante observar que una cepa derivada de la cepa silvestre transformada con la fusión de los genes *thiME* a la proteína verde fluorescente, en simbiosis dio fluorescencia en la raíz del frijol, lo cual nos sugiere que la tiamina es limitante en el exudado del frijol, ya que este promotor contiene en la región líder la caja *thi* que regula negativamente la la traducción generando un anti terminador en presencia de tiamina. Los experimentos de competencia demostraron que *thiMED* de *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae es la vía para la recuperación de tiamina del medio ambiente cuando la bacteria tiene que competir con un número mayor de bacterias en el suelo (Karunakaran *et al.*, 2006).

Previamente, fueron reportadas cepas con una alta capacidad respiratoria mediante la oxidación del compuesto N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina (TMPD), la cepa CFN037, presentó una oxidación elevada de este compuesto (TMPD++), tiene una inserción de *Tn5-mob* en la región promotora del gen *thiC* del operón *thiCOGE*, acorde con su alta capacidad de oxidación del TMPD fue su expresión de la citocromo oxidasa *cbb3*, lo que dio a los 19 días de la simbiosis el doble de actividad de nitrogenasa de la cepa *R. etli* CE3 medida por la reducción de acetileno (Soberón *et al.*, 1990). La inserción del *Tn5* dentro de la caja *thi* abrió un promotor y provocó que se

sobre-expresara el operón *thiCOSGE*, con un nivel mayor a las 12 horas que a las 24 horas comparada con la cepa silvestre, en cultivos con manitol y extracto de levadura comparada con la cepa *R. etli* CE3.

El inicio de la transcripción de *thiC* en la cepa *R. etli* CE3 inició 59 pb río arriba de la secuencia de la caja *thi* de 39 pb, mientras que en la cepa CFN037 inició 88 pb antes del final del *Tn5mob* dentro de la caja *thi*, se propuso que el fenotipo simbiótico de la cepa CFN037 se debió a que la sobre-expresión de *thiC* toma más AIR y baja el nivel de 5-aminoimidazol-4-carboxamidoribonucleotido (AICAR) u otro metabolito relacionado con este compuesto intermediario de la vía de síntesis de las purinas, lo cual funciona como efector negativo de la expresión de *fixN* del operón *fixNOQP* que codifica para la oxidasa simbiótica *cbb₃* (Miranda-Ríos *et al.*, 1997).

No se tienen evidencias directas de que la TPP sea indispensable en el metabolismo de las rhizobia durante el proceso de infección o para el establecimiento de una simbiosis efectiva. En *R. etli* se sabe que la auxotrofia de aminoácidos que requieren TPP para su síntesis, presentan afectada la simbiosis con *P. vulgaris*, auxótrofos en L-leucina, L-fenilalanina, en el intermediario shikimato para la síntesis de los aromáticos triptófano, tirosina y fenilalanina cuyo sustrato inicial para su síntesis es la eritrosa-4-P, que requiere la actividad de la transcetolasa TPP-dependiente en la vía de las pentosas fosfato (Ferraioli *et al.*, 2002). Las mutantes de *R. etli* CTNU36 *leuC*⁻ (isopropil malato isomerasa), CTNU18 *pheA*⁻ (corismato mutasa) y CTNU26 *aroK*⁻ (shikimato kinasa) presentaron 12% 11% y 4% de nódulos con relación a la cepa silvestre y la reducción de acetileno notablemente disminuye a niveles indetectables (Ferraioli *et al.*, 2002). La mutante en el gen *ilvC* (acetohidroxi-acido-isomero-reductasa) de *S. meliloti* fue incapaz de nodular alfalfa. El producto de este gen participa en la síntesis de los aminoácidos valina e isoleucina, la primera enzima de ésta vía es la acetolactato sintasa TPP-dependiente. Estos estudios mostraron que en la simbiosis de la planta del frijol y de la alfalfa, las rhizobia tienen activas vías metabólicas dependientes de la TPP (Aguilar *et al.*, 1991, Hassani *et al.*, 2002). Estos resultados sugieren que la planta está dando TPP a la bacteria, por lo anterior una fusión transcripcional de *thiME* a la proteína verde fluorescente tendría que estar reprimida, no obstante, presentó fluorescencia en los pelos radiculares del frijol (ver arriba), lo que indica que la TPP proveniente del exudado de la planta podría ser muy baja.

1.17 Relación metabólica de la piruvato deshidrogenasa-TPP y la piruvato carboxilasa-Biotina dependientes.

Es importante destacar que en rhizobia el ciclo de Krebs está alimentado por 2 vías anapleróticas, vitamina dependiente; la piruvato carboxilasa-biotina (PC-biotina) dependiente y la piruvato deshidrogenasa-TPP (PDH-TPP) dependiente (Fig. 3), es decir que depende indirectamente de dos vitaminas, a diferencia de las enterobacterias que carecen de PC y el ciclo de Krebs solo depende de tiamina. El sustrato de ambas enzimas es piruvato, proveen de oxaloacetato y de acetyl-CoA al ciclo de Krebs, respectivamente (Fig. 3), los cuales a su vez son sustratos de la enzima citrato sintasa para generar citrato. Además, la Acetyl-CoA producida por PDH se requiere como activador alostérico para la actividad de PC (Dunn *et al.*, 1997). La PDH libera CO₂ y la PC requiere el CO₂, la PDH produce NADH para la síntesis de ATP en la cadena respiratoria y la PC consume ATP. La PDH promueve de manera indirecta el consumo de la biotina evitando su acumulación, ya que el Acetyl-CoA producto de la PDH es a su

vez sustrato de la Acetil-CoA carboxilasa-biotina dependiente, la cual participa en la síntesis de ácidos grasos, promoviendo la síntesis de más biotina, y en consecuencia más síntesis de tiamina para la actividad de PDH (Fig. 3). De manera semejante la producción de citrato en el ciclo de Krebs estimula el consumo de tiamina, ya que se incrementa la actividad de oxoglutarato deshidrogenasa-tiamina dependiente, lo que promueve la síntesis de más tiamina (Fig. 3). Por lo que es importante destacar que existe una interrelación metabólica muy importante entre estas dos enzimas.

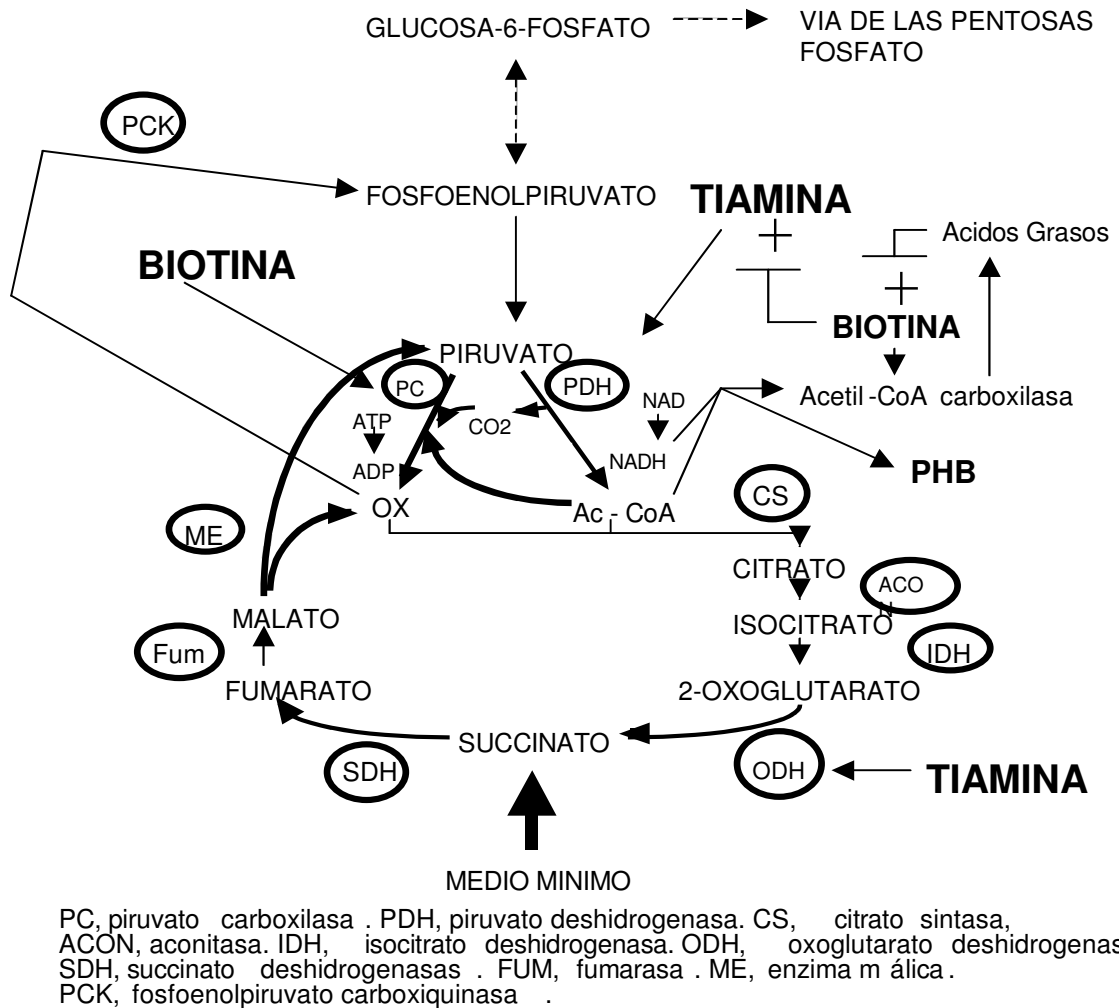


Figura 3 El ciclo de Krebs en *Rhizobium etli* CE3.

1.18 El metabolismo aeróbico y fermentativo de la cepa *R. etli* CE3.

Durante el metabolismo fermentativo, *R. etli*, *S. meliloti* 1021 y *R. tropici* CIAT899, disminuyen gradualmente su crecimiento cuando son sucesivamente subcultivadas en medio succinato amonio (SA), excretan aminoácidos al medio tales como; glutámico, aspártico y alanina, ácidos orgánicos como fumarato, malato, 2-oxoglutarato, γ -hidroxibutirato, piruvato y lactato, incrementan la agregación celular durante los subcultivos, así como la síntesis y acumulación del polímero de reserva poli- β -hidroxibutirato (PHB). Las actividades de enzimas del ciclo de Krebs citrato sintasa, isocitrato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, piruvato carboxiquinasa, así como

las actividades anapleróticas PC y PDH disminuyen drásticamente durante los subcultivos.

En contraste, el metabolismo aeróbico de *Rhizobium* se presenta cuando el medio mínimo es suplementado con biotina o tiamina entre otros, (ver abajo). La bacteria crece eficientemente durante los subcultivos, disminuye notablemente la agregación celular, así como la acumulación de PHB, los aminoácidos y ácidos orgánicos excretados al medio en la fase exponencial pre-estacionaria son reabsorbidos en la fase estacionaria, todas las enzimas del ciclo de Krebs se mantienen elevadas, así como PC y PDH (Encarnación *et al.*, 1995).

Los proteomas de la cepa *R. etli* CE3 en condiciones de metabolismo aeróbico en medio rico formulado a base de peptona y extracto de levadura (PY), el de SA suplementado con tiamina y SA suplementado con biotina se compararon con el proteoma del metabolismo fermentativo de SA. Se observó que de las 966 proteínas presentes en PY se compartieron 529 en SA con biotina y 532 en SA con tiamina (metabolismo aeróbico), mientras que al comparar los proteomas de las células cultivadas en PY y SA, (metabolismo aeróbico y fermentativo respectivamente), solo se compartieron 336 proteínas, es decir que existe una marcada diferencia el proteoma es más diferente entre el metabolismo aeróbico y fermentativo mientras que ésta diferencia disminuye al comparar el proteoma de las cepas cultivadas en condiciones aeróbicas. Fue muy significativo que las condiciones aeróbicas tuvieron en común 382 proteínas, de las cuales 208 son exclusivas del metabolismo aeróbico, por lo cual, no se encuentran presentes en el metabolismo fermentativo, lo que permitió establecer 5 clases distintas de proteínas. En la clase I fueron clasificadas las proteínas que solo se expresaron en el metabolismo aeróbico, como la pirofosfato-fructosa-6-fosfato-1-fosfotransferasa, el componente E2 de la piruvato deshidrogenasa, enzimas para la degradación de leucina, la catalasa *KatG*, la superóxido dismutasa, la proteasa Clp, la folil poliglutamato sintasa para la síntesis de ácido fólico. En la clase II proteínas presentes en ambos tipos de metabolismos (aeróbico y fermentativo) pero con niveles de expresión mayor en el metabolismo aeróbico, por ejemplo se pueden mencionar del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) a la succinil-CoA sintetasa y a la malato deshidrogenasa. De la gluconeogenesis, a la enolasa, y otras como la superóxido dismutasa, la proteína ribosomal 50S, la peptidil-prolil-cis-trans isomerasa B. En la clase III se agruparon proteínas expresadas en ambos tipos de metabolismo, GroEL, DnaK, AniA y PhaB (acetoacetyl-CoA reductasa). La clase IV está constituida por 121 proteínas que solo se expresan en condiciones fermentativas, dentro de este grupo están proteínas para la respuesta general de estrés, porque se sabe que estas células son más resistentes a distintos tipos de estreses. Está en curso la identificación del resto de estas proteínas mediante espectrometría de masas (Encarnación *et al.*, 2003).

1.19 Objetivos generales.

Realizar un análisis genético y metabólico de la síntesis de la tiamina en *R. etli* CE3 durante la transición del metabolismo aeróbico a fermentativo.

Lograr una visión global del transcriptoma de *R. etli* CE3 en el metabolismo aeróbico y fermentativo y su relación con la síntesis de la tiamina.

Comprender las señales genéticas y metabólicas que determinan en *R. etli* CE3 el cambio de metabolismo aeróbico a fermentativo.

Entender en *R. etli* CE3 la relación del estrés oxidativo y la disminución de la oxidación de carbono con la síntesis de la tiamina.

Entender la relación de la síntesis de la tiamina con la síntesis de otros cofactores enzimáticos como la biotina, el piridoxal fosfato y el pantotenato.

1.20 Objetivos particulares.

Analizar la síntesis de la tiamina en la cepa *R. etli* CE3 mediante fusiones transcripcionales a los genes *thiC*, *thiEb* y *thiD* durante la transición del metabolismo aeróbico a fermentativo.

Proponer en *R. etli* CE3 los genes diferencialmente transcritos en condiciones de fermentación en MM comparados con el metabolismo aeróbico de MM suplementado con biotina o tiamina y su relación con la síntesis de la tiamina.

Estudiar la síntesis de la tiamina en la mutante *katG*⁻ de *R. etli* CE3 para entender la relación de la síntesis de la tiamina con el estrés oxidativo.

Estudiar la síntesis de la tiamina en la mutante *phaC*⁻ para entender la relación de la síntesis de la tiamina con la disminución de la oxidación de carbono.

Estudiar el efecto de la suplementación de la piridoxal fosfato sobre el crecimiento de la cepa *R. etli* CE3 en medio mínimo (SA) y piruvato amonio (PA) durante los subcultivos.

Establecer en *R. etli* CE3 una relación funcional de la síntesis de la tiamina con genes expresados para la síntesis de la biotina, homoserina, aminoácidos de la familia del aspártico y el piridoxal fosfato en el metabolismo aeróbico y fermentativo.

Proponer qué vías metabólicas podrían estar limitadas de carbono durante el metabolismo fermentativo de la cepa *R. etli* CE3 con relación al metabolismo aeróbico.

1.21 Hipótesis.

R. etli CE3 cultivada en succinato como fuente de carbono tiene que alimentar de carbono vía gluconeogénesis al ciclo de las pentosas y a la vía Entner-Doudoroff (ED), en estas vías se generan intermediarios de carbono para la síntesis de tiamina, piridoxal fosfato, pantotenato, así como los precursores fosforibosil pirofosfato, ribosa 5P, eritrosa 4P y NADPH.

Encarnación *et al.*, (1995), reportaron que la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PCK) que produce fosfoenolpiruvato a partir de oxaloacetato se encuentra disminuida, en tanto que la enzima málica que produce piruvato a partir de oxaloacetato no presenta cambios en su actividad, la cual es aparentemente baja comparada con PCK.

Se sabe que en *R. etli* CE3 durante el metabolismo fermentativo también se limita la síntesis de la biotina (Guillén-Navarro *et al.*, 2005b), lo que disminuye la aportación de oxaloacetato al ciclo de Krebs (Fig. 3).

Los genes de la vía clásica de síntesis de la tiamina (Taboada *et al.*, 2008) y la biotina están incompletas (Guillén-Navarro *et al.*, 2005b), por lo que se sugiere que para su síntesis se reclutan otras enzimas.

Entonces, es probable que en *R. etli* CE3, durante el metabolismo fermentativo, disminuya la síntesis de la tiamina, (que requiere TPP para su propia síntesis), la biotina, el piridoxal fosfato y el pantotenato, debido a que hay limitación de sustratos de carbono para su síntesis, probablemente carbono gluconeogénico, lo que conllevaría una disminución notable del flujo de carbono en las vías metabólicas dependientes de tiamina pirofosfato (TPP) entre otras (Fig. 7).

1.1 Manuscrito; Thiamine limitation determines the transition from aerobic to fermentative-like metabolism in *Rhizobium etli* CE3.

1.2 Discusión.

Si bien *R. etli* CE3 no es un auxótrofo de tiamina o biotina, debido a que presencia de biotina sintetiza tiamina o en presencia de tiamina sintetiza biotina, manteniendo un crecimiento aeróbico durante los subcultivos.

La cepa *R. etli* CE3 es capaz de sintetizar biotina o tiamina en SA pero no lo suficiente para crecer aeróbicamente. La presencia de una de las vitaminas, por ejemplo biotina, es suficiente para elevar las actividades del ciclo de Krebs, con lo cual se incrementa el flujo de carbono en el metabolismo aumentando la síntesis de las otras vitaminas (Encarnación *et al.*, 1995), por lo que se definió como un "bradytrofo" de biotina (Guillén-Navarro *et al.*, 2005), y en este proyecto se propone que también es un bradytrofo de tiamina. Es conveniente mencionar que a diferencia de *R. etli* CE3, *R. tropici* 899 y *S. meliloti* 1021, las cepas *R. tropici* CFN299 (Encarnación *et al.*, 1995), *M. loti* MAFF303099, *M. loti* R7A y *Agrobacterium tumefaciens* C58 son capaces de crecer aeróbicamente durante los subcultivos, y no requieren de suplementos para mantener elevadas las actividades de PC, PDH y enzimas del ciclo de Krebs (Encarnación *et al.*, 1995; Encarnación, datos no publicados).

No obstante, el genoma de la cepa de *R. etli* CE3 (González *et al.*, 2006) no contiene los genes clásicos; *thiL* que codifica para la fosfatasa de la tiamina monofosfato (Imamura y Nakayama., 1982), *thiF* para la síntesis del tiazol y *apbE* para la síntesis de la pirimidina de la tiamina (Beck y Downs., 1998) (Tabla 1). Cabe destacar que *thiL* codifica para una enzima que recupera tiamina del medio y no se considera como parte de las reacciones de biosíntesis de la tiamina, *thiF* forma parte de la vía biosintética mientras que para *apbE* no se ha definido su participación en la biosíntesis del HMP-PP, es conveniente señalar que la síntesis *in vitro* del HMP-PP se puede llevar a cabo sin el producto del gen *apbE* pero en presencia de un factor proteico no identificado (ver arriba, Lawhorn *et al.*, 2004). *R. etli* CE3 a diferencia de las cepas *S. meliloti* 1021, *M. loti* MAFF303099 y *A. tumefaciens* C-58 tampoco tiene los genes *thiBPQ* para el transporte de tiamina.

La suplementación de tiazol al SA no estimuló la síntesis de la tiamina a pesar de que la cepa *R. etli* CE3 tiene el gen *thiM* que codifica para la quinasa de tiazol (datos

no mostrados). La cepa *R. etli* CE3 en presencia de tiazol exógeno, probablemente no es capaz de sintetizar la otra parte de la tiamina, el HMP-PP, de manera eficiente. En *R. etli* CE3 probablemente son limitantes ambos componentes (HMP-PP y el HET-P). El HMP-PP no debería ser limitante porque el flujo de carbono en la vía de síntesis de las purinas si bien en SA podría no ser tan elevado como en SA con biotina, sí debería ser suficiente para sintetizar el HMP-PP dado que la cepa *R. etli* CE3 está aun creciendo durante el segundo subcultivo. Esto a pesar de que la oxidación de carbono disminuye notablemente, y que probablemente el flujo de carbono disminuiría en la vía de síntesis de las purinas y las pentosas fosfato, sin embargo no se explica cómo requiriendo concentraciones tan bajas de carbono para la síntesis del HMP-PP, la cepa *R. etli* CE3 no lo sintetice en cantidades suficientes para crecer aeróbicamente. Este razonamiento es igualmente aplicable para la síntesis de la biotina ya que se requieren concentraciones muy bajas de biotina para un crecimiento eficiente de la cepa *R. etli* CE3 comparado con tiamina (Encarnación *et al.*, datos no publicados). El análisis fisiológico de la cepa mutante CFN037 mostró que aún con una transcripción constitutiva elevada del operón *thiCOSGE* (ver arriba) no fue suficiente para aumentar la síntesis de la TPP en SA durante los subcultivos ni en simbiosis, desde que aumentó el flujo de AIR vía ThiC por lo que se propuso que disminuyó la concentración de AICAR (ver arriba) (Miranda-Ríos *et al.*, 1997, datos no mostrados).

El genoma de *R. etli* CE3 no presenta los genes clásicos *bioB*, *bioF*, *bioD* y *S. meliloti* 1021 no presenta los genes *bioB*, *bioD*, *bioA*, contrariamente *B. japonicum* USDA 110, *A. tumefaciens* C-58 y *M. loti* MAFF303099 contienen la vía completa para la síntesis de la biotina (Tabla. 2; Entcheva *et al.*, 2002; Guillén-Navarro *et al.*, 2005b). Recientemente, Morett *et al.*, 2008, propusieron que debido a la naturaleza reactiva fuerte de los sitios activos de las enzimas, era posible encontrar reacciones secundarias gratuitas en las enzimas y que aun la célula más pequeña tiene el potencial de realizar numerosas reacciones enzimáticas adicionales, muy probablemente con muy poca eficiencia catalítica (Morett *et al.*, 2007). Así, la mutante de *E. coli* MC1061 Δ *thiE* que carece de la actividad de tiamina fosfato sintasa que genera tiamina monofosfato, fue complementada con la sobre-expresión del gen *yjbQ* proveniente de varias especies como: *E. coli*, *Thermotoga maritima*, *Sulfolobus solfataricus* y *Pyrococcus furiosus*, lo que demostró que existen enzimas con una eficiencia muy baja que tienen la capacidad de realizar reacciones enzimáticas idénticas a las enzimas clásicas de la vía de síntesis de la tiamina, pero que no tienen homología ni similitud. Por tanto, es posible que en *R. etli* CE3 la ausencia de las enzimas ThiL, ThiF y ApbE para la síntesis de la tiamina y BioB, BioF y BioD para la síntesis de la biotina esten siendo sustituidas con una menor eficiencia por otras enzimas. Es posible que en *R. etli* CE3, la síntesis de la TPP y biotina sea limitada en condiciones de bajo flujo de carbono en las vías metabólicas ya que las enzimas reclutadas para la síntesis de la tiamina y de la biotina podrían tener una afinidad baja por los sustratos. Datos de este laboratorio apoyan ésta propuesta, ya que la Dra. María. del Carmen. Vargas, demostró que la complementación de la cepa *R. etli* CE3 con el operón *bioBFDAZ* localizado en la isla simbiótica de *M. loti* R7A (Sullivan *et al.*, 2002) promueve el crecimiento aeróbico durante 3 subcultivos en SA. Lo que demuestra que una vía completa de genes *bio* clásicos, probablemente con una mayor afinidad, son capaces de utilizar el carbono de manera eficiente para la síntesis de la biotina (M. del C. Vargas, manuscrito en preparación).

Otro cofactor importante, además de la biotina y la tiamina es el piridoxal fosfato, la síntesis de este cofactor y la tiamina tienen en común la enzima deoxixilulosa

fosfato sintasa DXS la cual es TPP dependiente (Neidhardt., 1996). El piridoxal fosfato se requiere para la incorporación del azufre de la cisteína en el anillo tiazólico de la tiamina mediante la actividad de una enzima transulfurasa. Así como para la síntesis de la biotina, ya que la sintasa del ácido 8-amino-7-oxononanoato, BioF, es dependiente de piridoxal fosfato, así como para la síntesis de los centros 4Fe-4S y 2Fe-2S de la proteína BioB (Alexeev *et al.*, 1998; Reyda *et al.*, 2008; Fontecave *et al.*, 2008). Por lo que, la limitación de la tiamina de la cepa *R. etli* CE3 en SA en el segundo subcultivo, probablemente también limite la síntesis de piridoxal fosfato, lo que supone una disminución general del metabolismo del carbono, dada la diversidad de reacciones en las que participa este cofactor.

1.3 CONCLUSIONES CAPITULO I. Thiamine limitation determines the transition from aerobic to fermentative-like metabolism in *Rhizobium etli* CE3.

1.- *R. etli* CE3 no contiene los genes *thiBPQ*, *thiL*, *thiF* y *apbE*. Por lo tanto la síntesis de la TPP en ésta cepa fue mediante el reclutamiento de proteínas que no tienen identidad con las correspondientes proteínas reconocidas.

2.- Las cepas de *R. etli* Viking I y *Rhizobium* spp. CIAT613 son auxótrofos de tiamina naturales debido a la pérdida del operón *thiCOSGE*.

3.- La cepa mutante de *R. etli* M4 *thiC1169::mini-Tn5lacZ1* en SA no sintetiza TPP, tiene disminuida la actividad de PDH en el ensayo sin TPP, y en respuesta a la limitación de TPP la mutante M4 incrementa la síntesis del complejo PDH (ensayo de actividad con TPP), además, tiene disminuida la acumulación de PHB.

4.- Las fusiones *thiC::lacZ* y *thE::lacZ* del operón *thiCOSGE* muestran que estos genes están sobre-expresados en SA comparado con SAB, y que en SAT se encuentran reprimidos, lo mismo sucede con la fusión *thiMEeD::lacZ* del operón *thiMEeD*, lo que sugiere que la limitación de la síntesis de la TPP se debe a la limitación de sustratos de carbono, lo que se ve adicionalmente afectado debido a que se requieren proteínas reclutadas para completar la síntesis de la TPP.

5.- El contenido de TPP de la cepa *R. etli* CE3 en SA fue de 36% comparado con SAB. Por tanto la cepa *R. etli* CE3 ante la limitación de TPP, durante la transición del metabolismo aeróbico a fermentativo, incrementa la actividad de la PDH y de los genes que codifican proteínas para la síntesis de la tiamina.

6.- La suplementación de biotina a cultivos de la cepa *R. etli* CE3 pre-crecidos 24 horas en SA, estimuló la síntesis de la TPP lo que correlacionó con el incremento de la actividad de la PDH.

7.- Las cepas mutantes y los aislados naturales auxótrofos de tiamina no tienen afectada la capacidad simbiótica, no se encontró la actividad de la PDH en los bacteroides a los 25 días. Sin embargo se requiere TPP para la síntesis de aminoácidos aromáticos ya que para la síntesis de la eritrosa-4P se requiere de TPP, por lo cual es probable que la planta le esté dando TPP a la bacteria.

7.- La limitación de tiamina en la cepa *R. etli* CE3 determina la transición del metabolismo aeróbico a fermentativo, lo que afecta las actividades enzimáticas dependientes de TPP como la oxoglutarato deshidrogenasa, que a su vez constriñe el flujo de carbono en el ciclo de Krebs, aumentando el flujo de acetyl-CoA para la vía fermentativa de la acumulación de PHB. Lo que además de provocar una oxidación incompleta del carbono, limita el flujo vía gluconeogénesis afectando con ello la vía de las pentosas fosfato y en consecuencia la síntesis de las purinas, lo que limita el carbono para la síntesis del HET-P y el HMP-PP de la TPP. Ante la limitación de TPP los operones *thiCOSGE* y *thiMEeD* están sobre-expresados y probablemente la vía de síntesis de TPP es completada con algunas enzimas que no tienen identidad con las enzimas reconocidas y que tendrían baja afinidad por sus sustratos.

8.- La cepa *R. etli* CE3 comparada con la cepa *M. loti* MAFF303099 no presenta los genes *bioB*, *bioF* y *bioD* de la vía de síntesis de la biotina. Por lo tanto, además de la limitación de la TPP también existe limitación de la síntesis de la biotina durante la transición del metabolismo aeróbico a fermentativo.

9.- La enzima deoxixilulosa fosfato sintasa de la vía de síntesis de TPP y piridoxal fosfato es dependiente de TPP, es decir que se requiere TPP para la síntesis de TPP así como para la síntesis del piridoxal fosfato. Por lo tanto la limitación de TPP de la cepa *R. etli* CE3 conlleva la limitación de piridoxal fosfato.

1 CAPITULO II. ANALISIS TRANSCRIPTOMICO DEL METABOLISMO AEROBICO Y FERMENTATIVO DE *R. etli* CE3.

Introducción.

Es importante considerar para el análisis de los datos de transcriptoma, que la cepa *R. etli* CE3 en SA a las 10 horas del segundo subcultivo está dejando de crecer y está en un metabolismo fermentativo, mientras que en SAB o SAT la cepa *R. etli* CE3 está creciendo óptimamente manteniendo un metabolismo aeróbico.

Los datos del transcriptoma fueron sometidos al análisis estadístico de varianza analítica, ANOVA. Este análisis permitió ver diferencias de expresión de los genes entre las distintas condiciones, los cuales correlacionaron con niveles de actividades enzimáticas experimentales, tales como; PDH, ODH y fusiones transcripcionales a los genes *thiC*, *thiE*, *thiM* y *bioM* (Taboada *et al.*, 2008; Karina-Guillén *et al.*, 2005a).

El ANOVA detectó diferencias de expresión, que de acuerdo a su media y error estándar, tienen probabilidades muy bajas de ser producto del azar, por lo que se consideran diferencias reales. Las diferencias fueron significativas en la comparación SA-SAB si su probabilidad de ser resultado del azar es con una $P < 0.0016$ lo que produjo 532 genes que cumplieran con estas características, mientras que para la comparación SA-SAT con una $P < 0.00067$ produjo 227 genes (ver tablas 3-6), el valor P fue seleccionado después de aplicar la prueba de descubrimiento de la cantidad de falsos positivos (FDR) a los datos del ANOVA.

En nuestro laboratorio, se sabe que la cepa *R. etli* CE3 cultivada en SA, ante la limitación de un metabolito, sobre-expresa los genes correspondientes, lo cual hace complejo el análisis comparativo de los transcriptomas de SA-SAB y SA-SAT, por lo que es fundamental en la interpretación de estos datos tener en cuenta la condición metabólica. Muy probablemente en SAB o SAT, la transcripción elevada de los genes correlacione con el nivel de síntesis del metabolito, mientras que en SA una sobre-expresión genética sugiere, a reserva de comprobarlo, una limitación de carbono debido a la oxidación incompleta de los intermediarios de carbono, a la agregación celular, y a que la bacteria está dejando de crecer durante el metabolismo fermentativo, por lo que es probable que el carbono esté limitado en las distintas vías metabólicas. Es adicionalmente importante correlacionar todos los datos de la fisiología de *R. etli* CE3 con los datos del transcriptoma, y en el futuro cuantificar los metabolitos para discernir este problema de interpretación.

1.1 Material y metodos

1.1.1 Metodología para el transcriptoma. Purificación de mRNA.

1.- Se cultiva a *R. etli* CE3 en SA suplementado con vitaminas y sin suplementos, se realizan los subcultivos y se colectan las células mediante centrifugación en botellas de 250 ml. las cuales se incuban previamente con metanol a 37 oC por un mínimo de 4 horas y lavadas con agua desionizada estéril. La centrifugación es con rotor y botellas frías, a 22100 x g durante 4 minutos para que el tiempo total de centrifugación no exceda de 7 minutos. Se decanta el medio e inmediatamente se congelan en nitrógeno líquido, se almacenan a – 70 oC hasta la extracción del mRNA.

2.- La pastilla celular se resuspende en un buffer caliente a 85 °C 1:1 con fenol el cual fue extraído con agua di-etil pirocarbonato (DEPC) esterilizada. Se colocan las muestras en tubos eppendorf rotulados (los tubos se esterilizan y se mantienen en una estufa a 70 °C durante varios días antes de ser usados), se agitan vigorosamente y se mantienen los tubos a 40 °C hasta su centrifugación.

3.- Las muestras se centrifugan a 16128 x g, 27 oC durante 15 min. en una centrifuga para tubos eppendorf, se separa solamente el sobrenadante en tubos rotulados. Los sobrenadantes se extraen nuevamente con 400 ul de fenol caliente a 85 oC y 250 ul de cloroformo, se agitan vigorosamente, se puede aplicar vortex a velocidad intermedia.

4.-Se centrifugan las muestras como en No. 3 y se separa el sobrenadante, se repite la extracción como en No. 3, se repite la extracción de 4 a 6 veces, hasta que ya no se forme la capa intermedia de impurezas en la interfase fenol-cloroformo buffer de extracción, finalmente se mezcla el sobrenadante con cloroformo, se centrifuga y se colecta el sobrenadante nuevamente.

5.- Se colecta el sobrenadante en tubos nuevos rotulados y se precipita con un tercio del volumen total con una suspensión de cloruro de litio 8.0 M en agua DEPC previamente esterilizada, las muestras se agitan por inversión y se guardan en hielo durante 16 horas.

6.- Los tubos se centrifugan como en No. 2 a 5 °C y se lavan las pastillas con 1 ml de una solución 2M en 80 % de etanol frío, se centrifugan como en No. 3.

7.- los tubos se decantan se escurren sobre una servitoalla, las pastillas ya secas se resuspenden en 8 ul de agua DEPC esterilizada o agua del kit de marcaje.

8.- Se cuantifica el mRNA, 1 µl resuspendido en un ml de agua tratada con DEPC, en el espectro DE-U 7500 a 260 y 280 nm, la absorbancia que da a 260 nm se multiplica por 40, el resultado es la concentración de mRNA total en µg/µl.

1.1.2 La calidad del mRNA total.

1.- Se prepara un gel de agarosa normal al 1.3%, para un volumen final de 25 ml, se mezclan 0.323 g. de agarosa en 21.5 ml de agua miliQ autoclaveada 2.5 ml de buffer

MOPS 10 X, ésta mezcla se funde y se enfría un poco antes de agregarle 1.5 ml de formaldehído.

2.- Se toma 1 μ l de la muestra y se calienta a 68 °C durante 5 min en un termomixer, se mezcla con 4 μ l de buffer de muestra, se aplica un pulso de centrifuga y se corre el gel a 80 voltios durante 30 min en buffer 1X MOPS. Se toma una foto del gel y se checa que no haya degradación del mRNA.

1.1.3 El marcaje del mRNA.

1.- Se marca 10 μ g de mRNA total en un volumen menor de 10 μ l, se afora a 10 μ l cuando es necesario con agua mRNA del "kit" (CyScribe first-Strand cDNA Labelling kit, Amersham Biosciences).

2.- Se mezcla la suspensión del mRNA con 1 μ l de monoámeros de primeros al azar y se incuba en un termociclador con un programa de 5 min a 70 °C seguido de 10 min a 25 °C.

3.- Se agrega 1 μ l de nucleótidos, 2 μ l de Ditríteitol 4 μ l de buffer, se mezclan muy bien con una micropipeta y puntas moradas, se agrega 1 μ l del fluoróforo Cy5 y otro tubo con 1 μ l de fluoróforo Cy3 y se mezcla con micropipeta.

4.- Se agrega 0.85 μ l de la enzima transcriptasa reversa y se mezcla muy bien. Se somete a un programa en el termociclador de 1.5 horas a 42 °C y luego a uno de 5 °C por tiempo indefinido, las muestras se guardan a -20 °C protegidas de la luz porque los fluoróforos se oxidan.

1.1.4 Purificación del cDNA marcados.

1.- Las muestras, protegidas de la luz se descongelan en hielo, se agregan 480 μ l de buffer de captura a cada tubo y se mezcla muy bien con micropipeta. Se realiza un barrido o escaner en luz visible de 350 a 480 nm después de calibrar el espectrofotómetro con buffer de captura.

2.- Las muestras se pasan a unas microcolumnas a las cuales se les adapta un tubo eppendorf para coleccionar lo que se eluye, se aplica un pulso de centrifuga para eluir la muestra de 1 min a 11200 x g a 5 °C, lo que sale de la columna se vuelve a escanear para saber cuánto de la marca del fluoróforo se retuvo en la columna, esto es para cada uno de los fluoróforos.

3.- Se requiere un mínimo de 0.01 de densidad óptica de incorporación del fluoróforo para la hibridización.

4.- Se lavan las microcolumnas con 380 μ l de buffer de lavado, previamente mezclado con etanol como lo indica el fabricante, los lavados deben ser 3, se eluye en cada ocasión por centrifugación como en el No 2. Siempre se debe proteger de la exposición a la luz los fluoróforos.

5.- Las microcolumnas se centrifugan a 11200 x g por 1 min para secarlas, se calientan 75 μ l de buffer de elución a 65 °C para cada muestra, se agregan en el centro de la columna 40 μ l a cada columna, se reposan las muestras 2 minutos.

6.- Se cambia el tubo colector usado por un tubo eppendorf nuevo, previamente rotulado y se eluye la columna con un pulso de centrifuga como en el no. 2.

7.- Se repite la elución de la microcolumna ahora con 30 μ l de buffer de elución como en No 5, y se centrifuga 1 min a 11 22 x g a 5 °C.

8.- Los 70 μ l que contiene el cDNA purificados son secados en el equipo a una temperatura media y cubiertos de la luz. Se resuspenden en 3.5 μ l de agua desionizada estéril y se congelan cubiertos de la luz hasta su uso.

1.1.5 Fijación del microarreglo.

1.- Se usa un termoblock perfectamente lavado y enjuagado con agua desionizada, se llenan los pozos con agua desionizada estéril sin que se derrame y se calienta a 60 °C, el microarreglo se expone al vapor 3 veces durante 10 segundos cada vez.

2.- El microarreglo se fija con 2 ciclos de luz UV (1200 joules).

3.- El microarreglo se sumerge inmediatamente 2 minutos en agua desionizada a punto de hervir en un vaso de vidrio marca pirex perfectamente lavado.

4.- Los microarreglos se sumergen inmediatamente en etanol absoluto durante 1 minuto y se seca por centrifugación durante 10 minutos a 435 x g a temperatura ambiente dentro de un tubo falcon nuevo, este tratamiento es para que el microarreglo se fije en la laminilla.

1.1.6 Pre-hibridización del microarreglo.

1.- La laminilla una vez fijada se sumerge en solución de pre-hibridización durante una hora a 45 °C. El microarreglo se coloca en un tubo falcon nuevo con agua miliQ estéril y se seca por centrifugación 10 minutos, 435 x g, a temperatura ambiente.

2.- el microarreglo se guarda dentro de una caja que no tenga polvo durante 1 hora antes de usarse para que se termine de secar y fijar.

1.1.7 Hibridización del microarreglo.

1.- El buffer de hibridización se calentó 5 min a 40 °C para disolver el SDS antes de usarse.

2.- Los cDNA purificados resuspendidos en 3.5 µl de agua se mezclan con micropipeta con 14 µl de buffer de hibridización. Se desnaturaliza el cDNA por 5 minutos a 94 °C en un termoblock y después 30 segundos a 40 °C, las muestras se mezclan con micropipeta en un solo tubo y se les aplica un pulso de centrifuga para eliminar las burbujas que puede ocasionar el buffer de hibridización ya que contiene SDS.

3.- Se aplica la muestra justo en el centro del microarreglo y se coloca con mucho cuidado el cubreobjeto de plástico sin dejarlo caer violentamente.

4.- Se lava la cámara de hibridización y se le coloca 35 µl de agua miliQ estéril en cada pozo y se coloca la hibridización dentro de la cámara y se cierra con mucho cuidado evitando mover el cubreobjeto.

5.- La cámara se coloca en una caja que contiene papel impregnado con agua para generar una cámara húmeda, se cierra la caja y se incuba en una estufa a 45 °C durante 16 horas.

1.1.8 Lavado de la hibridización.

1.- El microarreglo se sumerge en la solución I (que contiene solución SSC 1X con SDS 0.05%) dentro de un tubo falcon, el cubreobjeto se debe deslizar muy lentamente de la laminilla del microarreglo mediante una leve inclinación, se saca el microarreglo para liberarlo del cubreobjeto y el cubreobjeto se deja detrás de la cara impresa de la laminilla para no dañar el microarreglo por fricción. Se pone la tapa al tubo falcon y agita vigorosamente durante 2 minutos.

2.- El microarreglo se pasa a la solución II (SSC 0.06X) de lavado con unas pinzas y se agita vigorosamente durante 2 minutos.

3.- Se repite el procedimiento de lavado de No 2 con la solución II, se tapa el tubo falcon y se agita durante 2 minutos. Se pasa el microarreglo a un tubo falcon nuevo y se seca por centrifugación a 435 x g durante 10 minutos.

1.1.9 Análisis del microarreglo.

1.- El microarreglo se lee en el escáner Scan Array Lite de la compañía Perkin Elmer, se usa el programa Scan Array Express, se encienden los lasers del escáner Scan Array lite y se lee el microarreglo en un balance perfecto de intensidades, el Cy5 es rojo y el Cy3 es verde, el equilibrio de las intensidades es amarillo en el centro de la paleta (nótese que el fluoróforo Cy5 es azul y el Cy3 es rosa, pero cambian de colores cuando son escaneados en el Scan Array Express). Se crean dos imágenes, Cy5 y Cy3.

2.- Los archivos de las imágenes para los dos fluoróforos, se abren con el programa Array-Pro Analyzer. Cada una de las señales de hibridización de estas imágenes se colocan dentro de círculo que hace una malla o grid, lo que limita las áreas de la mancha de hibridización y su entorno para cada una de las manchas en el microarreglo que el programa Array-Pro Analyzer evalúa para obtener finalmente los valores de intensidad de la mancha de hibridización y de su entorno.

3.- Se obtiene una tabla de valores de intensidad de las señales e intensidad del entorno de la señal que se exporta a una tabla de Excel, al valor de la señal de hibridización se le resta el valor del entorno para tener la intensidad real.

4.- Un experimento de la transcripción global, mediante un microarreglo, se repite al menos 3 veces, y se busca que un gen sobre-expresado este presente en las 3 réplicas para que pueda ser considerado como un gen significativamente expresado.

5.- A los datos se les aplica un diseño estadístico experimental el cual es definido a la par con el diseño experimental.

1.1.10 Soluciones.

Toda el agua que se usa en los microarreglos es calidad miliQ.

1.- SDS 10%, 5 g en 50 ml de agua DEPC esterilizada y filtrado por millipore 0.22 μm

2.- LiCl 8 M, P.M. 42.394, se pesan 16.956 g en 50 ml, se autoclavea

3.- LiCl 100 mM. P.M. LiCl 42.394, se pesan 8.478 g de LiCl para 25 ml.

4.- EDTA 250 mM pH 8.0 (con NaOH), P.M. 372.24, se pesan 9.321 g para 100 ml.

5.- Tris-HCl 500 mM. pH 7.0, P.M.121.14, se pesan 6.57 g para 100 ml.

Buffer de lisis para extracción de mRNA.

1.- SDS 1%, tomar 2.5 ml de SDS 10 %

2.- LiCl 100 mM, 8.478 g

3.- EDTA 10 mM, tomar 1.0 ml de EDTA 250 mM.

4.- Tris-HCl 100 mM, tomar 5 ml de 500 mM de Tris-HCl.

5.- Se afora a 25 ml con agua tratada con DEPC.

6.- Agua DEPC, para un litro de agua miliQ, se disuelve 1 ml de diethyl pyrocarbonato SIGMA, No. Cat. D-5758, se agita y se incuba a 37 °C durante 1-4 horas, se autoclavea.

7.- Formaldehído 37 wt. % Solution in water, A.C.S. SIGMA.

8.- RNA/later. Es una solución para estabilizar ARN, compañía Ambion No. Cat. 7020.

9.- Solución SSC 10 X. Se disuelve 175 g de NaCl y 88.2 g de citrato de sodio en 800 ml de agua, ajustar el pH a 7.0 con NaOH, se afora a 1.0 litro y se autoclavea.

Buffer MOPS 10X.

1.- Acetato de sodio P.M. 136.085, para 1.0 litro 80 mM, 10.886 g en agua destilada.

2.- MOPS 200 mM. 41.6 g en 1.0 litro.

3.- EDTA 10 mM. Para 1.0 litro, tomar 40 ml de EDTA 250 mM pH 7.0

4.- Se autoclavea este buffer.

Buffer de Pre-hibridización.

1.- SSC 5X, para 45 ml. 12.25 ml de SSC 20

2.- SDS 0.1%, 0.45 ml de SDS 10%

3.- BSA libre de grasas 1%, 0.45 g de BSA

Buffer de hibridización.

1.- solución SSC 4.2 X, para 400 µl de buffer retoman 0.084 ml.

2.- Formamida al 42 % (N,N-dimetilformamida) se toman 0.168 µl del frasco.

3.- SDS 0.17 %, se toman 0.00068 ml.

4.- Esperma de salmón 63 µg/µl. Se toman de un stock de 10 mg/ml 0.000252 ml. Si se diluye 50 veces el stock, se toman 126 µl.

5.- se afora a 400 µl.

Buffer de carga.

1.- Formamida desionizada 2.2 ml

2.- Formaldehído al 37% 0.8 ml

3.- Buffer MAE 10 X 0.5 ml

4.- Glicerol al 80 % 0.4 ml

5.- Azul de bromofenol 0.1 ml

6.- Bromuro de etidio Research Organics solución 10 mg/ml, No. De cat. 3016E. 100 µl

7.- Aforar a 4 ml

Buffer PBS 10X

KCl de 2.6827 mM

KH₂PO₄ 1.4696 mM

NaCl 136.8 mM

Na₂HPO₄.12H₂O 8.2649 mM

pH 7.4

Aforar a 1 litro

1.2 Resultados y discusión de los transcriptomas SA-SAB y SA-SAT.

1.2.1 Transcriptoma SA-SAB.

1.2.1.1 Genes que se sobre-expresaron más en SA que en SAB (Tabla 3).

Conversión y producción de energía (C). En la cepa *R. etli* CE3 se observó elevada la transcripción en SA en comparación con SAB de los genes para la síntesis de los complejos proteicos de la PDH y de la ODH, estos datos concuerdan con el hecho de que la actividad de PDH y ODH en SA se encontró elevada cuando se agrega la tiamina al ensayo enzimático durante el metabolismo fermentativo (Taboada *et al.*, 2008), probablemente en respuesta a la limitación de TPP, la bacteria sintetiza más complejos enzimáticos dependientes de TPP.

La citrato sintasa *cisZ* del ciclo de Krebs está elevada en su transcripción, probablemente porque la bacteria sensa limitación de sustratos ya que está excretando intermediarios del ciclo de Krebs al medio, y la *dld* lactato deshidrogenasa para la síntesis de lactato, el cual es un producto de fermentación. Así mismo, *fixGf* del operón *fixGHIS-stoRf* (Granados-Baeza *et al.*, 2007), y *fixPd* del operón *fixNOQPd* para la síntesis y maduración del citocromo *cbb3* de alta afinidad por el oxígeno, probablemente debido a la baja concentración de oxígeno producida por la agregación celular (datos no presentados).

Control de ciclo celular, división celular y partición del cromosoma (D). En la cepa *R. etli* CE3 en SA a diferencia de SAB se sobre-expresó el gen para la división celular y partición del cromosoma *ftsA*, probablemente debido a que cuando se tomó la muestra, la bacteria aún está creciendo, si bien, a una a una velocidad menor que en SAB. Así como el gen *bglSf* que codifica para una β -glucosidasa, para la obtención de α -D-glucosa y β -D-glucosa en distintas reacciones enzimáticas en el metabolismo de la sacarosa y almidón.

Metabolismo y transporte de aminoácidos (E). Es relevante para este proyecto conocer cómo se está llevando a cabo la transulfuración en la cepa *R. etli* CE3, ya que para la síntesis de la tiamina y la biotina se requiere azufre, en SA con relación a SAB se encontró sobre-expresado el gen *nifSch* que codifica para la transulfurasa. Además otros genes como; el gen *proC*, pirrolina-5-carboxilato reductasa para la síntesis de prolina a expensas de glutámico, es interesante que se requiere de la enzima GOGAT para la síntesis de glutámico a partir de 2-oxoglutarato, el cual es intermediario del ciclo de Krebs, y la bacteria está excretando glutámico, probablemente porque ya no lo está usando de manera eficiente para su crecimiento, la dihidropicolinato sintasa *dapAfl* para la síntesis de lisina (Fig. 4) y la aril esterasa *ypch00630* organizada en operón con los genes de la PDH.

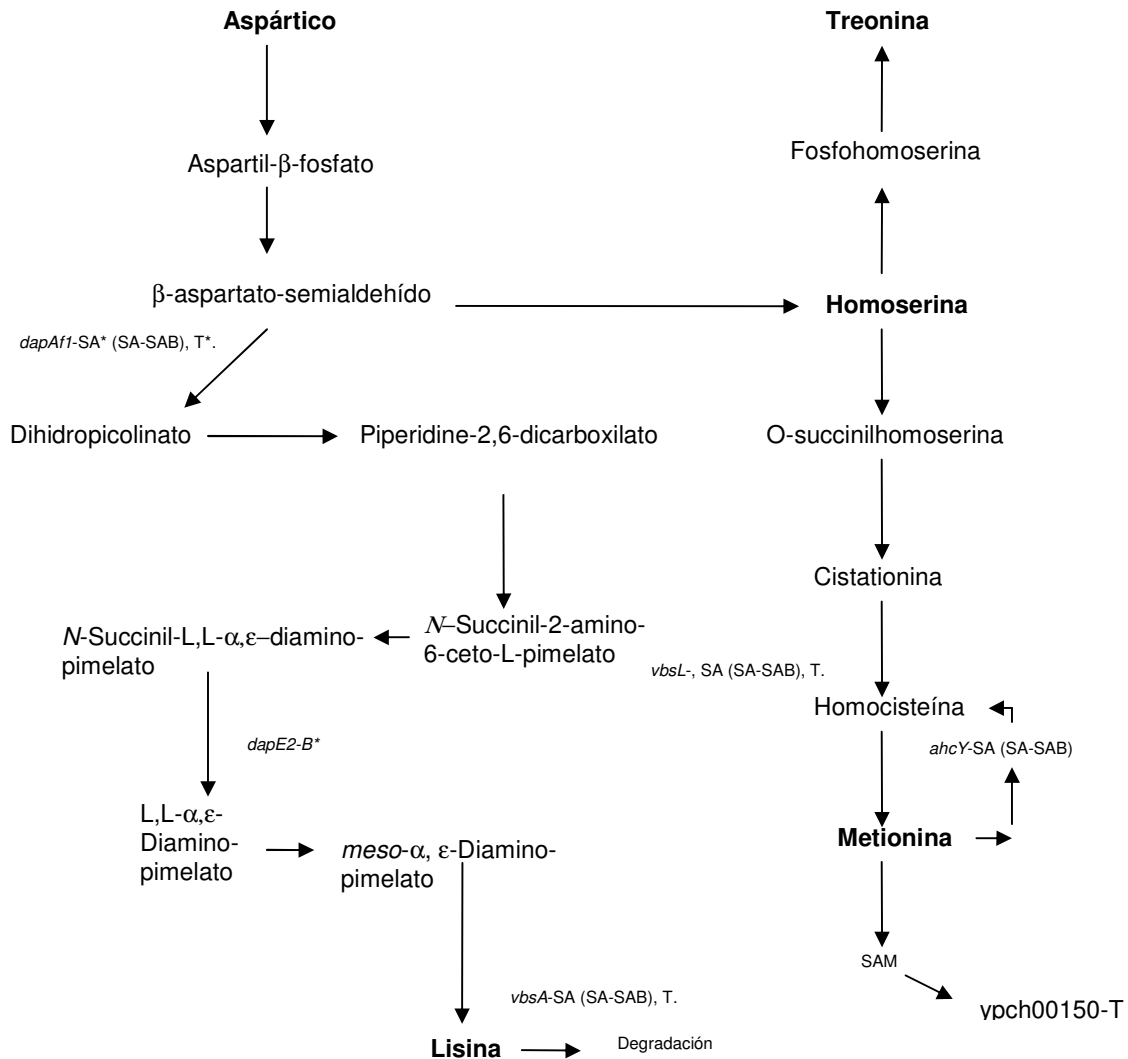


Figura 1 Síntesis de aminoácidos de la familia del aspártico.

Genes que se sobre-expresaron en los transcriptomas de SA-SAB y SA-SAT. -SA* que se sobre-expresa en SA, -T* que se sobre-expresa en SAT, -B* que se sobre-expresa en SAB.

La cepa *R. etli* CE3 en SA a diferencia de SAB sobre-expresó el operón *aaPJQ* para el transporte de aminoácidos y *ypc00018 RHE_PC00031* para poliaminas. Así como el gen *vbsL* (Fig. 4) que codifica para la cistationina δ -sintasa, cuyo sustrato es la o-succinil homoserina, al que le incorpora el azufre proveniente de la cisteína, reacción dependiente de piridoxal fosfato (pfam1053), que produce cistationina en la vía de síntesis de la L-metionina, también es importante destacar que la o-succinil homoserina se inter-convierte a homoserina y que la suplementación de ésta al SA o al medio mínimo piruvato amonio

(PA) promueve el crecimiento de la cepa *R. etli* CE3 (datos no presentados), lo que sugiere que probablemente la vía de síntesis de aminoácidos de la familia del aspártico está limitada de carbono.

Síntesis de carbohidratos transporte y metabolismo (G). En la cepa *R. etli* CE3 en SA a diferencia de SAB se observó elevada la transcripción del gen *zwf1* que codifica para la glucosa 6-P 1-deshidrogenasa de la vía de las pentosas (Fig. 5), el gen hipotético

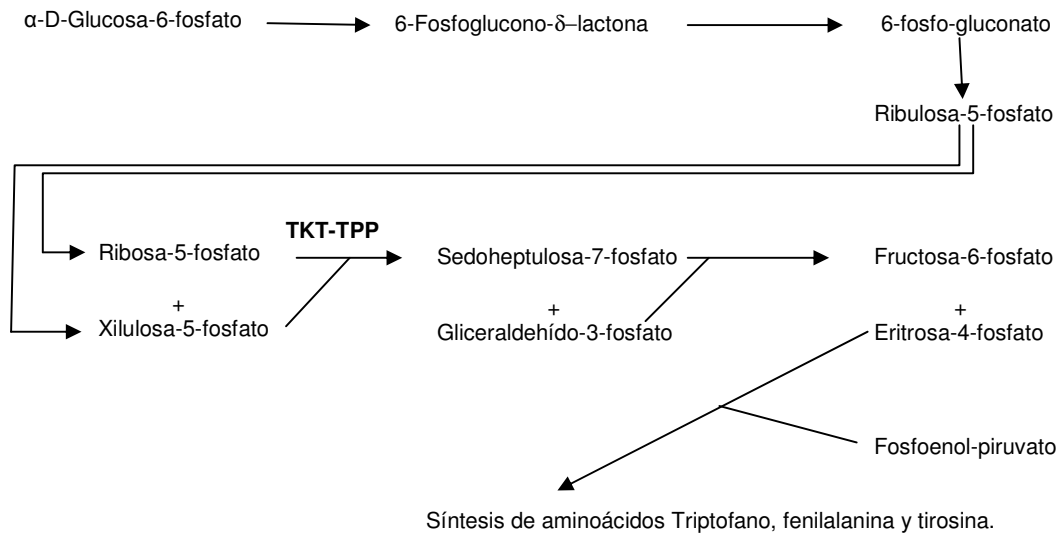


Figura 2 La vía de las pentosas fosfato.

(En ésta vía se generan los precursores para la síntesis de purinas, pirimidinas, histidina, tiamina, piridoxal fosfato, aminoácidos aromáticos, NADPH y azúcares para la síntesis de polisacárido).

ype00208 RHE_PE00400, que codifica para una enzima 5-ceto-4-deoxiuronato isomerasa que cataliza la inter conversión de 4-deoxi-L-treo-5-hexosulosa uronato a 3-deoxi-D-glicero-2,5-hexodiulosonate en la vía de inter-conversión de D-glucuronato y D-galacturonato, es destacable que ésta vía depende de glucosa y genera D-gliceraldehído-3-fosfato (producto de la gluconeogénesis) (Fig. 6), *uxuAb*, para una manonato dehidratasa que cataliza la formación de 2-dehidro-3-deoxi-D-gluconato a partir de manonato y el gen *manB* que codifica para una B-manosidasa para la degradación de N-glicanos.

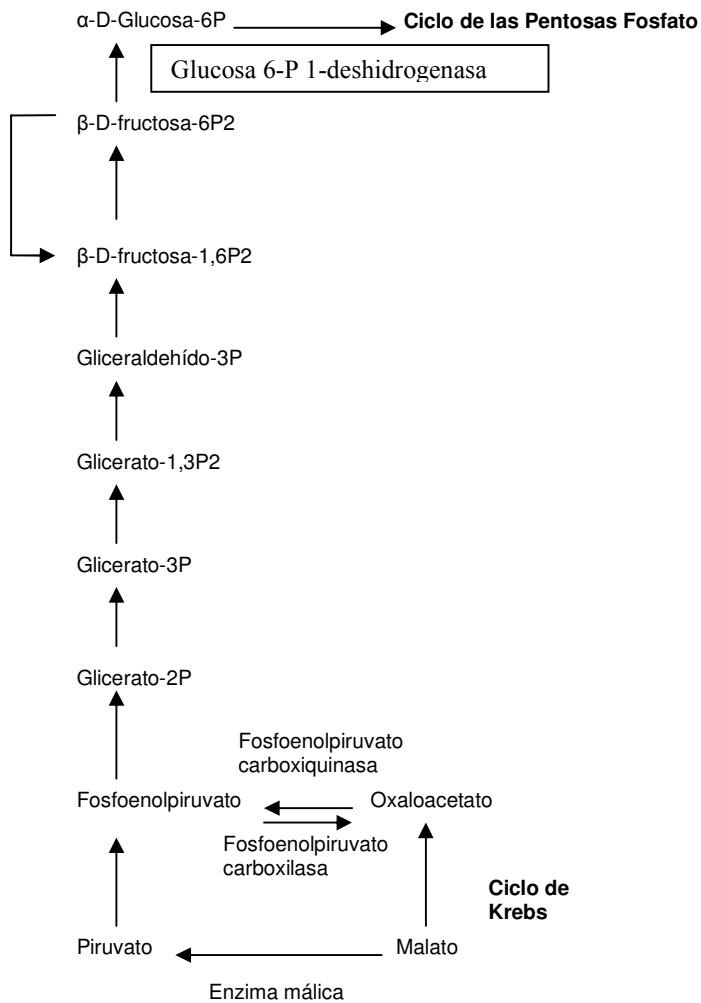


Figura 3 La gluconeogénesis en la cepa *R. etli* CE3.

Lo que sugiere la existencia de una limitación de carbono en la vía de las pentosas fosfato en SA con respecto a SAB, ya que la sobre-expresión de genes en la cepa *R. etli* CE3 es una respuesta a la limitación de sustratos, un ejemplo de ello es el incremento de la actividad β -galactosidasa dependiente de promotores *thi* en SA con respecto de SAB, así como el incremento de la actividad de piruvato deshidrogenasa con TPP en la mezcla de ensayo comparado con el ensayo sin TPP (Taboada *et al.*, 2008), lo cual correlacionó con el incremento de la transcripción de los genes en SA (ver arriba, Producción y conversión de energía (C)). El gen *ypch00782* RHE_CH02359 para un probable transportador de azúcar, se encuentra sobre-expresado en SA comparado con SAB, el medio de cultivo no contiene azúcar, probablemente este gen está relacionado con el reciclaje de carbohidratos para la síntesis de polisacárido.

Síntesis de coenzimas transporte y metabolismo (H). En la cepa *R. etli* CE3 se encontraron sobre-expresados los genes para la síntesis de tiamina *thiC*, *thiG* y *thiEb* en SA comparado con SAB, lo cual correlaciona con datos de las fusiones transcripcionales de los genes *thiC* y *thiE* (Taboada *et al.*, 2008). También incrementó la transcripción en SA comparado con SAB del gen *lipA* para la inserción de 2 átomos de azufre a una ACP unida a un octanoilo del componente E2 de la PDH y ODH, lo que correlaciona con el hecho que en SA están elevadas estas actividades cuando se agrega TPP a la mezcla de ensayo. Igualmente, los genes *ispA* para la síntesis de isoprenoides y *hemNdl* para la síntesis del grupo hemo están sobre-expresados en SA comparado con SAB, así como *ahcY* adenosil homocisteinasa para producir L-homocisteína a partir de S-adenosil-L-homocisteína en la vía de síntesis de metionina, la L-homocisteína es un intermediario que puede dar homoserina, que puede ser precursor de treonina, isoleucina y metionina (Fig. 4), lo que sugiere una limitación de estos aminoácidos en SA comparado con SAB ya que la suplementación con homoserina al SA y piruvato con amonio (PA) mantiene el crecimiento de la cepa *R. etli* CE3 durante los subcultivos (datos no presentados).

Metabolismo y transporte de lípidos (I). Se encontró sobre-expresado en SA el gen *accBch* para la acetil-CoA carboxilasa acarreadora de biotina, así como los genes *bioM* (categoría P) y *bioY* (categoría R) para el transporte de biotina (ver adelante) en comparación con SAB lo que correlaciona con datos que demostraron que en SA existe una limitación de biotina (Guillén-Navarro *et al.*, 2005a). En consecuencia, bajos niveles de biotina probablemente limita la síntesis de ácidos grasos, y en aparente respuesta, la cepa *R. etli* CE3 incrementa la transcripción de una ligasa dependiente de AMP para ácidos grasos ype00074 RHE_PE00160. Igualmente se observó en ésta categoría funcional un incremento en SA de la expresión de los genes *lytB* (categoría IM) para la tolerancia a penicilina y el gen yhch01160 RHE_CH04043 (categoría IQ) para una proteína hipotética conservada.

Traducción, estructura ribosomal y biogénesis (J). En SA comparado con SAB se incrementó la transcripción del gen *vbsA* que codifica para la N6-hidroxilisina O-acetiltransferasa que participa en la vía de degradación de lisina y para la síntesis de metionina, los datos sugieren que en SA los aminoácidos de la familia del aspártico; metionina, treonina y lisina se encuentran limitados (Fig. 4), en *R. etli* CE3 este gen se encuentra organizado formando parte del operón *vbsADL*, *vbsD* y *vbsL* codifican para una proteína de exportación y la cistationina gama sintasa, respectivamente.

En tanto que ypch01434.1 RHE_CH04045 codifica para una ligasa de serina al ARNt-ser, es interesante que el gen *vbsL* y RHE_CH04045 pudieran estar relacionados con el metabolismo del azufre ya que se requiere de serina para la síntesis de cisteína y *vbsL* participa en la síntesis de la metionina que es un aminoácido azufrado. Es probable que haya limitación de estos aminoácidos en SA comparado con SAB y en respuesta la bacteria eleva la transcripción de estos genes, sin embargo se requiere de datos experimentales para apoyar ésta sugerencia.

Además del gen *rplC* que codifica para una proteína ribosomal 50S L3, que se une al extremo 3' del ARNr 23S para agrupar el ensamble de la subunidad 50S, esencial para la

actividad de peptidil transferasa, no es claro que esté elevada la transcripción de este gen de la maquinaria biosintética en SA cuando la bacteria está disminuyendo su velocidad de crecimiento.

Factores de transcripción (K). La cepa *R. etli* CE3 en SA con relación a SAB sobre-expresó los factores sigma extracelulares *sigK* y *rpoI*. *rpoI* regula la síntesis de la vicibactina y *sigK* en *Clostridium perfringens* regula la esporulación y la producción de enterotoxina. Dos reguladores transcripcionales de la familia TetR, 3 genes identificados como probables reguladores transcripcionales, el gen *pspA* que codifica para un regulador putativo que suprime la transcripción dependiente de σ_{54} , los genes RHE_CH03914 y RHE_CH03346, que codifican para las proteínas putativas acetiltransferasas (probablemente relacionadas con la acetilación de histonas), RHE_CH02578 que codifica para una proteína hipotética conservada y el gen *parB* que codifica para una proteína de partición del cromosoma. La sobre-expresión de estos reguladores transcripcionales en SA sugiere que la transición del metabolismo aeróbico a fermentativo de la cepa *R. etli* CE3 es regulada probablemente por estos genes.

Replicación reparación y recombinación (L). La cepa *R. etli* CE3 en SA con respecto a SAB elevó la transcripción de dos endonucleasas una exonucleasa, una exodeoxiribonucleasa V, una transposasa, así como la subunidad β del factor de integración del hospedero (IHF), los cuales están relacionados funcionalmente de acuerdo con el programa STRING (datos no mostrados) (<http://string.embl.de/>; von Mering *et al.*, 2007), en general estos genes están relacionados con la reparación del ADN, se sabe en este laboratorio que las bacterias en el estado fermentativo comparados con las de metabolismo aeróbico son más resistentes a los estreses (Encarnación *et al.*, datos no publicados), probablemente la sobre transcripción de estos genes esté relacionado con una respuesta general de estrés. Así como dos secuencias de inserción yia00018 RHE_PA00079 y yid00003 RHE_PD00004.

Biogénesis de pared celular, membrana y envoltura celular (M). La cepa *R. etli* CE3 en SA con respecto de SAB incrementó la transcripción del gen *galE2* para la conversión de la UDP-galactosa a UDP-glucosa que está relacionada con el ciclo de las pentosas, el gen *lysM* para el rompimiento de pared, 2 glicosiltransferasas para la síntesis de lipopolisacárido, y el gen ypch01228 RHE_CH03456 para una probable proteína aglutinina 1 resistente al calor, muy probablemente la síntesis de polisacárido en SA sea diferente que en SAB debido a la alta agregación celular.

Motilidad celular (N). La cepa *R. etli* CE3 en SA con relación a SAB incrementó la transcripción de 18 genes relacionados con la formación del flagelo, sabemos que la cepa *R. etli* CE3 en el metabolismo fermentativo se agrega fuertemente, y se supone que la tendencia es a perder el flagelo, probablemente a las 10 horas del segundo subcultivo es un estado de transición hacia la adaptación completa del metabolismo fermentativo por ende a disminuir la síntesis del flagelo, se sabe que existe una mayor agregación celular en SA que en SAB a las 10 horas del segundo subcultivo (datos no mostrados), así como 6 genes de quimiotaxis, que probablemente estén relacionados con la agregación celular.

Modificación después de la traducción recambio de proteínas y chaperonas (O). La cepa *R. etli* CE3 en SA con respecto a SAB incrementó la transcripción de *fixNd* y *fixQd-f*, del operón *fixGHIS-stoR* y *fixId* (categoría P) y *fixSd* (categoría P) del operón *fixGHIS-stoRd* para la síntesis y maduración del citocromo *cbb3*, respectivamente. Es relevante además la sobre-expresión del gen *ccmI* para la biogénesis del citocromo *c*, el cual es componente del complejo *cbb3*, y la chaperona *groELch2*, hay una interrelación de la agregación celular que provoca una disminución de la difusión del oxígeno, con la sobre-expresión de los genes *fixGHIS-sotR*, *fixNOQP* y genes para la síntesis el citocromo *c*. Así mismo, la cepa *R. etli* CE3 elevó la transcripción del operón *sufBCD*, que está junto al gen *nifSch*, los genes *suf* participan en el transporte de azufre y la transulfuración, en *E. coli* *sufS* dona el azufre a la proteína *sufE*, la cual interactúa con *sufB* en presencia de *sufC*, *R. etli* CE3 no presenta en su genoma la desulfurasa *sufS*, aparentemente *sufS* está siendo suplida por *nifSch*. En la RhizoBase, *sufS* únicamente está presente en especies de *leguminosarum*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium sp.* y *Rhodopseudomonas*, pero no en *R. etli* CE3, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium japonicum*. La cepa *R. etli* CE3 en SA comparado con SAB sobre-expresó el gen RHE_CH01174 para una proteína que se induce por osmosis.

Metabolismo de transporte de iones inorgánicos (P). La cepa de *R. etli* CE3 en SA con relación a SAB elevó la transcripción de los genes *fixIf*, *fixId* y *fixSd* cuyas proteínas participan en la incorporación del átomo de cobre en el citocromo *cbb3* (Preisig *et al.*, 1996). La cepa *R. etli* CE3 sobre-expresó genes relacionados con el transporte de hierro, tales como; *fhuD* y *fhuA*, *sfuA* así como los genes *hmuP*, *hmuV*, *hmuT* y *hmuU* para el transporte de grupos hemo, igualmente el gen *bfr* para una bacterioferritina, y la reductasa de hierro *fhuF* (categoría R), lo que correlaciona con que el citocromo *cbb3* es una hemo-cobre-proteína, mientras que para el crecimiento no es claro que la cepa *R. etli* CE3 necesite cantidades elevadas de hierro a las 10 horas del segundo subcultivo, ya que está dejando de crecer. El gen *mntH* y *znuC* para el transporte de manganeso y zinc. Así como el transportador de biotina *bioM*.

Transporte, catabolismo y biosíntesis de metabolitos secundarios (Q). La cepa *R. etli* CE3 en SA comparada con SAB sobre-transcribió el gen RHE_PD00024 para una probable chalcona sintasa, RHE_CH01496 para una probable metalo-oxidoreductasa y RHE_CH00723 para una probable metalopeptidasa. La chalcona sintasa sintetiza la naringenina-chalcona que es un metabolito secundario en plantas relacionados con compuestos flavonoides, ésta proteína está relacionada con las poliquétido sintasas de las plantas, probablemente están relacionados con el proceso fermentativo.

Predicción de la función general (R). Es sobresaliente que la cepa *R. etli* CE3 en SA comparado con SAB sobre-expresó el gen *bioY* que junto con *bioM* y *bioN* (ver arriba categoría P) forman el operón *bioMNY* que en presencia de biotina se reprime su expresión, por lo que su transcripción sugiere una limitación de biotina en SA comparada con SAB, la cepa *R. etli* CE3 es un bradytrofo de biotina, es decir que además de la limitación en la síntesis de la tiamina, también se limita la síntesis de biotina en SA (Guillén-Navarro *et al.*, 2005a). Además 6 genes que codifican para proteínas hipotéticas,

la reductasa de hierro *fhuF*, y el gen *adhA2* que codifica para la alcohol deshidrogenasa, que produce etanol de manera reversible a partir de acetaldehído que a su vez proviene de la acetil-CoA, probablemente ésta enzima contribuya al catabolismo de la acetil-CoA en condiciones de fermentación, debido probablemente a que no se está condensando de manera eficiente en el ciclo de Krebs, es posible que la alcohol deshidrogenasa sea una pieza importante en la adaptación al metabolismo fermentativo.

Función desconocida (S). La cepa *R. etli* CE3 en SA comparada con SAB elevó los niveles de ARN mensajero de 10 genes para proteínas hipotéticas conservadas, así como los genes *nnrU* y *nirV* para el metabolismo del nitrato, si bien el medio SA no contiene nitrato.

Transducción de señales (T). La cepa *R. etli* CE3 cultivada en SA comparada con SAB sobre-expresó 4 genes relacionados con mecanismos de transducción de señales, 4 genes putativos de estrés USP (Universal Stress Protein), 4 reguladores transcripcionales, cabe destacar el gen *tacA* que es un regulador transcripcional dependiente de sigma 54, 3 reguladores de sistema de dos componentes y *ypch00786* que codifica para una proteína sensora de la familia GGDEF, una metilesterasa *cheY2* y una fosfohidrolasa putativa RHE_CH03091, estos genes probablemente estén relacionados con la adaptación al metabolismo fermentativo.

Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular (U). La cepa *R. etli* CE3 en SA comparada con SAB sobre-expresó 11 genes, tales como *nolT* que codifica para una proteína de nodulación, 5 proteínas de transporte de secreción tipo IV, se sabe que durante la fermentación la bacteria está excretando metabolitos y datos de este laboratorio sugieren que también proteínas (trabajo en curso, Meneses *et al.*, 2009).

Además, dos genes que codifican para proteínas de ensamble del pili, y el gen *trbC* para una proteína de transferencia por conjugación.

Genes que no han sido agrupados en un COG. La cepa *R. etli* CE3 en SA comparada con SAB sobre-transcribió 63 genes.

1.2.1.2 Genes que se expresaron más en SAB que en SA (Tabla 4).

Producción y conversión de energía (C). La cepa *R. etli* CE3 en SAB comparado con SA elevó la transcripción de *coxN* que codifica para la citocromo oxidasa C, las ferredoxinas *fpr* y *fdxA*. El gen *bchE* que codifica para la síntesis de porfirinas, la enzima nitrilotriacetato monooxigenasa *ntaA* dependiente de O₂ y FMNH₂ para la oxidación del nitrilotriacetato a iminodiacetato y glioxilato, y el gen *fdsB* para la subunidad β de la formato deshidrogenasa, las enzima formato deshidrogenasa catalizan la oxidación reversible de formato a CO₂ y la consecuente liberación de un protón y dos electrones. Es notable que la respiración en SA es mediante el complejo *cbb3* y en SAB es con otros citocromos, lo que está relacionado con que en SAB las bacteria tienen una escasa agregación comparado con SA, probablemente la eficiencia de la transferencia electrónica sea distinta en estas condiciones metabólicas.

Así como el gen *ackA* que se transcribe en condiciones de limitación de fosfato en *S. meliloti*.

Metabolismo y transporte de aminoácidos (E). En SAB en contraste con SA se observó una elevación de la transcripción del gen *carA*, para la síntesis de carbamoil-P el cual es precursor de las pirimidinas. Así como de los genes *hisI* y *dapE2*, importantes para la síntesis de histidina y lisina, respectivamente (Fig. 4), además de *purF* de la síntesis de purinas (categoría F), que junto con *hisI* tienen como precursor común el fosforibosil pirofosfato (PRPP), lo cual sugiere que en SAB el flujo de carbono en la vía de síntesis de las purinas es mayor que en SA y que la disminución del flujo de carbono en SA probablemente afecta la síntesis de la parte pirimidina de la tiamina. La elevación de la transcripción del gen *cysK2* cisteína sintasa en SAB con relación a SA, para la síntesis de cisteína y el gen *ggt2* para la síntesis del glutatión, sugieren un metabolismo del azufre mucho más activo en SAB que en SA, lo que podría estar entre otros factores, limitando la síntesis de las moléculas azufradas tiamina y la biotina en SA. Igualmente, en SAB se encontró elevado el gen *phhA* que codifica para la proteína fenilalanina-4-hidroxilasa para la síntesis de aromáticos, la vía de síntesis de aromáticos es dependiente de tiamina, la presencia de la biotina en SA eleva la síntesis de la TPP (Taboada *et al.*, 2008) lo que denota un metabolismo dependiente de tiamina más activo en SAB que en SA. Así mismo, el gen *glnK* del sistema ntr para el metabolismo del nitrógeno, *argD2* para la síntesis de arginina, además de la permeasa hipotética de espermidina/putrescina *ypch01303* RHE_CH03662. Así como 5 genes que codifican para permeasas de aminoácidos; *ypf00073* RHE_PF00162, *ypb00079* RHE_PB00127, *ypc00088* RHE_PC00162, *ypch00062* RHE_CH00175, *ypch01402* RHE_CH03964, probablemente relacionados con excreción de aminoácidos en la fase pre-estacionaria y reabsorción en la fase estacionaria en SAB (Encarnación *et al.*, 1995).

En SAB con relación a SA se elevó la transcripción del gen *aldA* que codifica para la proteína alanina deshidrogenasa que convierte piruvato en alanina, ésta reacción depende de la vía gluconeogénica lo que sugiere que ésta vía está elevada en SAB. También está elevada la transcripción en SAB del gen hipotético *ypch01289* ID RHE_CH03629 para una probable ornitina descarboxilasa que convierte ornitina en putrescina. Así como el gen *dcp* peptidil-dipeptidasa para el metabolismo de aminoácidos el gen *ypb00098* RHE_PB00152 para una glioxalasa y una permeasa de aminoácidos de cadena ramificada RHE_PE00278.

Metabolismo de nucleótidos (F). La cepa *R. etli* CE3 en SAB en contraste con SA se observó elevada la transcripción de *purF* para la síntesis de las purinas, el gen *dht* dihidropirimidasa para la vía reductiva de la degradación de pirimidinas y el gen *iunH2* para una inosina-uridina nucleósido hidrolasa para la hidrólisis de purinas, lo cual sugiere que durante el crecimiento aeróbico en SAB el metabolismo de las purinas y pirimidinas es mayor que en SA.

Metabolismo y transporte de carbohidratos (G). En la cepa *R. etli* CE3 en SAB se elevó la transcripción de 3 transportadores hipotéticos para azúcar, un gen putativo para la glucosa deshidrogenasa RHE_CH03002, una fosfoglicerato mutasa hipotética ypch00950 RHE_CH02740 y una gluconolactonasa hipotética ypch01333 RHE_CH03704, todos estos genes están relacionados con el metabolismo del carbono gluconeogénico, sugiriendo que este metabolismo es más activo en SAB que en SA.

Metabolismo y transporte de coenzimas (H). La cepa *R. etli* CE3 en SAB elevó la transcripción del gen *nadA*, para la síntesis de nicotinato y nicotinamida, así como RHE_CH01549 ypch00533 para una probable 3-demetilubiquinona-9 3-metiltransferasa, ésta enzima probablemente funciona transfiriendo el grupo metil de la S-adenosil metionina a distintos sustratos durante el metabolismo aeróbico.

Metabolismo de lípidos (I). La cepa *R. etli* CE3 en SAB con respecto a SA elevó la transcripción del gen *acpS*, una sintasa holo-(acil-acarreadora) para la acilación de lípidos y ácidos grasos y el gen ypch00349 RHE_CH01047 que codifica para una proteína 3-oxoacil-(acil-acarreadora) reductasa, relacionados en la síntesis de membrana, es probable que la biotina este aumentando las carboxilaciones para la síntesis de ácidos grasos. De igual manera, se elevó la transcripción del gen *ispE* para la síntesis de esteroide vía no-mevalonato el cual es precursor de la coenzima Q, cabe destacar que en ésta vía se genera la deoxixilulosa fosfato, que es precursor de la síntesis de la TPP y piridoxal fosfato. Así mismo, se sobre-expresaron 2 oxidoreductasas y el gen putativo para la fosfatasa RHE_CH04094. Es notable mencionar que se elevó la transcripción de la D-β-hidroxitirato deshidrogenasa, *bdhA*, para la síntesis de PHB, además del gen putativo para la 3-hidroxisobutirato deshidrogenasa RHE_PE00281, estos datos concuerdan con el hecho de que en la cepa *R. etli* CE3 en SAB sintetiza PHB pero lo degrada.

Traducción, estructura ribosomal y biogénesis (J). La cepa *R. etli* CE3 en SAB con relación a SA elevó la transcripción del gen *rbfA* y *ksgA* para el procesamiento de ARNr, el *hemK* es una metilasa dependiente de S-adenosil metionina y ypch01425 RHE_CH04109 para una metilasa citosina C-5 de ARNr y ARNt, el gen *tyrS* para la proteína que carga con tirosina el ARNt-tir y la proteína hipotética ypch00446 RHE_CH01528. Así como el gen *trmU*, renombrado en *E. coli* como *mnmA* que codifica para una enzima tRNA 5 metilaminoetil-2-tiouridilato metiltransferasa, ésta proteína se une a tRNA-lis y genera un tionucleósido en el residuo lisina convirtiéndolo en una modificación 2-tiouridina (s(2)U) en la posición del asa no. 34, ésta enzima requiere de Mg-ATP, L-cisteína y una transulfurasa-piridoxal fosfato dependiente (Kambampati et al., 2003), por lo que este gen está relacionado con el metabolismo del azufre en SAB de la cepa CE3. La presencia de estos genes en SAB muestra una actividad biosintética mucho mayor que en SA, condición en la cual se presenta solo 3 genes sobre-expresados pertenecientes a ésta misma categoría funcional.

Transcripción (K). La cepa *R. etli* CE3 en SAB comparado con SA sobre-expresó el factor sigma *sigA* sigma 70, que forma parte del metabolismo central de la bacteria, el gen *greA*, que es importante para la transcripción y la elongación eficiente después de pasar

los sitios de arresto de la terminación. Igualmente 4 reguladores transcripcionales de la familia AraC RHE_PE00361, RHE_PD00173, RHE_CH02469, RHE_CH03153, además del gen *gbrR* que es que es un regulador transcripcional de la familia LysR, posiblemente un activador del gen *chvE* (que codifica para un transportador tipo ABC para xilosa), *cspA1* que codifica para una proteína que se une a ADN que se induce bajo condiciones de estrés por frío, dos reguladores putativos RHE_CH00966, RHE_PD00173 (de la familia AraC) y un probable regulador transcripcional RHE_PF00163 (de la familia GntR), lo que sugiere que el metabolismo aeróbico de la cepa *R. etli* CE3 presenta aspectos regulatorios particulares de ésta condición metabólica.

Factores de transcripción (L). La cepa *R. etli* CE3 en SAB con relación a SA elevó la transcripción de la transposasa yid00048 RHE_PD00322 y de una ADN topoisomerasa I (ype00104 RHE_PE00209).

Biosíntesis de pared y membrana (M). La cepa de *R. etli* CE3 en SAB comparado con SA sobre-expresó 21 genes, en contraste en SA solo fueron 5 genes diferencialmente expresados, lo que propone que en la cepa *R. etli* CE3 la síntesis de pared y membranas es muy activo y que en SA probablemente haya una regulación negativa, es decir que se disminuye el nivel de la transcripción de estos genes.

Motilidad celular (NU). La Cepa *R. etli* CE3 cultivada en SAB comparado con SA sobre-expresó el gen *hrcQ* para un sistema de secreción tipo III.

Modificación después de la traducción, recambio de proteínas y chaperonas (O). En la cepa *R. etli* CE3 cultivada en SAB comparado con SA, se sobre-expresaron los genes de la asimilación del amonio, tales como; *glnD*, la uridililtransferasa de la proteína PII, así mismo *glnK* que codifica para la proteína PII (ver arriba) y *ntrC* (ver abajo), que forman parte del sistema de regulación del nitrógeno (sistema ntr), lo que sugiere que la asimilación del amonio es mayor en SAB que en SA (Schlüter *et al.*, 2000).

El metabolismo aeróbico de la cepa *R. etli* CE3 conlleva la generación de especies reactivas de O₂, la cepa *R. etli* CE3 en SAB elevó la transcripción de genes para la resistencia al estrés oxidativo, tales como; *trxA2*, tioredoxin reductasa y 2 genes para la metionina sulfóxido reductasa *msrA* y *msrB* que remueven la metionina oxidada debido al estrés oxidativo, además de proteínas relacionadas con el estrés por calor; *dnaK*, *htpX2*, *hslV*, *grpE*, *hslU*, ypch00245 RHE_CH01244, chaperonas de estrés por calor como *ibpA* y *hsp* el gen para la chaperona que se induce por estrés osmótico *osmC*, además de 4 genes para proteasas, y el gen *ftsH* para la división celular, es notable que en SAB el crecimiento es aeróbico y se generan especies reactivas de oxígeno mientras que en SA la bacteria ésta en un metabolismo fermentativo y está dejando de usar de manera eficiente el oxígeno, con ello, probablemente disminuya la generación de especies reactivas de oxígeno.

Transporte y metabolismo de iones inorgánicos (P). La cepa *R. etli* CE3 en SAB comparado con SA, sobre-expresó 2 transportadores para hierro, *afuA1* y *afuB1*, 3 genes hipotéticos relacionados con el transporte de sulfato (ype00128 RHE_PE00259, ypc00092

RHE_PC00167 y ype00126 RHE_PE00257) y un transportador de potasio *kupch1*. Así como una proteína antiporter Na^+/H^+ *ypch01237* RHE_CH03498 y un transportador para taurina *tauA*, es notable que el metabolismo aeróbico tiene una alta demanda de azufre comparado con el metabolismo fermentativo.

Transporte, catabolismo y biosíntesis de metabolitos secundarios (Q). La cepa *R. etli* CE3 en SAB con relación a SA sobre-expresó el gen que codifica para un transportador tipo ABC relacionado con la biosíntesis de la lisofosfolipasa *ypch01398* RHE_CH03938.

Predicción de la función general (R). En la cepa *R. etli* CE3 en SAB se sobre-expresaron 25 genes con mayores niveles que en SA, en general putativos o hipotéticos, algunos genes con función reconocida son; el gen *exoR2* para un regulador negativo de la producción de exopolisacárido, *gloB* para una hidroxiacilglutination, *lonD* para una la proteasa LA 2, *ypch00813* RHE_CH02435 para una putativa inosina-5-monofosfato deshidrogenasa y *prsD* para un transportador de proteasa/lipasa.

Función desconocida (S). La cepa de *R. etli* CE3 en SAB sobre-expresó 42 genes comparado con SA.

Transducción de señales (T). En la cepa *R. etli* CE3 en SAB comparado con SA se sobre-expresaron 2 reguladores de dos componentes, la histidina quinasa *ypch01055* RHE_CH03009, y el regulador de la respuesta al nitrógeno *ntrC*, una serina quinasa *ypch00971* RHE_CH02817. El gen *cyaG2* para la adenilato ciclasa, cuyo papel no se ha descrito en *Rhizobium etli*. Así como el gen *relA* para la síntesis de la alarmona ppGpp, importante en la respuesta estricta, descrito en *R. etli* CE3 (Calderón-Flores *et al.*, 2005). Es notable que en SA se encontró una mayor complejidad de genes (15 genes) en ésta categoría funcional que en SAB (6 genes), probablemente porque la bacteria en SA está cambiando al metabolismo fermentativo, la bacteria se agrega, probablemente sintetice polisacárido para agregarse, pierde la motilidad, deja de crecer, regula su metabolismo a niveles basales, excreta metabolitos al medio, es mas resistente a los estreses, probablemente sean cambios que requieren ser sensados en SA.

Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular (U). En la cepa *R. etli* CE3 en SAB comparado con SA se sobre-expresaron 3 transportadores y una exportadora, *pilQ* para una proteína de ensamble del pili y *ftsY* para una proteína de división celular.

Mecanismos de defensa (V). En la cepa *R. etli* CE3 en SAB con relación a SA se agruparon 3 genes hipotéticos relacionados con resistencia a antibióticos, entre ellos el gen *hndJ* que codifica para una permeasa múltiple de drogas y el gen *ypch01115* RHE_CH03199 para una permeasa transportadora de sacáridos.

Genes sin asignación de COG. En la cepa *R. etli* CE3 en SAB comparado con SA elevó la transcripción de 81 genes aún sin asignación de COG, tales como; la polisacaridasa *plyA*, la formato deshidrogenasa *fdsD* que puede ser una fuente de energía, la

ligasa de ADN dependiente de ATP RHE_PE00252, la permeasa de monocarboxílicos *mctP*, un probable péptido señal *tola*, una glucuroniltransferasa *pssD*, la polimeraza de exopolisacárido *pssP*, el transportador de dicarboxílicos *dctA*, un gen putativo para la proteína citocromo C RHE_CH02511, la proteína para la síntesis de lipopolisacárido *nlpE2*, una permeasa tipo ABC para fosfato *pstC*, una probable anhidrasa carbónica RHE_PD00192 y la acetiltransferasa RHE_CH02118. Estos genes probablemente promuevan una eficiencia metabólica mayor en SAB que en SA.

1.2.1.3 Resumen de la discusión del transcriptoma SA-SAB.

La cepa *R. etli* CE3 en SA comparada con SAB sobre-expresó genes del operón *thiCOSGE* para la síntesis de la tiamina, así como genes del operón *bioMNY* para el transporte de biotina, igualmente la sobre-transcripción de genes para la síntesis del complejo de la PDH y ODH lo que correlaciona con el incremento de la actividad enzimática de la PDH cuando se agrega TPP a la mezcla de ensayo, comparado con el ensayo sin TPP, lo que sugiere que la cepa *R. etli* CE3 se encuentra limitada de estas vitaminas y en respuesta sobre-expresa los genes y sintetiza los complejos enzimáticos. Además se observó sobre-expresión de los operones *fixNOQPd* y *fixGHIS-stoRd* para la síntesis y maduración del citocromo *cbb3* de alta afinidad por el oxígeno, es probable que esto sea en respuesta a la disminución de la difusión del oxígeno debido a la alta agregación celular que se observa al ser subcultivado en SA (metabolismo fermentativo), además se elevó la transcripción del gen *dld* para la síntesis de lactato que es un producto de fermentación. Así como de la citrato sintasa (*cisZ*), probablemente porque la cepa *R. etli* CE3 sensa la limitación de carbono durante el metabolismo fermentativo ya que ésta enzima compite por el acetyl-CoA para el ciclo de Krebs contra la vía de síntesis del PHB que es un vía de fermentación. De manera sobresaliente la cepa *R. etli* CE3 elevó la transcripción de dos factores sigma extracelulares, *sigK* y *rpoI* que probablemente estén relacionados con una resistencia incrementada a diferentes tipos de estreses.

Es posible que en la cepa *R. etli* CE3 en condiciones de fermentación, el flujo de carbono se esté limitando en distintas vías metabólicas, un ejemplo es la vía de síntesis de aminoácidos de la familia del aspártico, ya que en SA con respecto a SAB el gen *vbsL* y *ahcY* se encontraron elevados, los cuales están relacionados con la utilización de la homoserina para la síntesis de metionina (Fig. 4), posiblemente por una limitación de metionina, así como *dapAfl* para la síntesis de lisina y el gen *vbsA* para su degradación, sin embargo, la suplementación de metionina al SA no estimuló el crecimiento de la cepa *R. etli* CE3 durante los subcultivos (datos no presentados), es probable que se deba a que este metabolito no resuelve otras limitaciones como; aminoácidos aromáticos o la síntesis de las vitaminas tiamina y biotina.

La cepa *R. etli* CE3 elevó la transcripción del primer gen de la vía de las pentosas *zwf1*, y genes relacionados con la síntesis transporte y metabolismo de carbohidratos como; RHE_PE00400, *uxuAb*, *manB*, *bglSf*, un transportador de azúcares RHE_CH02359 y

galE2, lo que sugiere que la vía de las pentosas fosfato está limitada en SA, probablemente porque el flujo de carbono vía gluconeogénesis está disminuido, ya que la primera actividad enzimática de la gluconeogénesis correspondiente al gen *pckA* está baja comparada con SAB (Encarnación *et al.*, 1995; Fig. 6), sin embargo la transcripción de este gen no fue estadísticamente diferente en el transcriptoma SA-SAB lo que sugiere un posible mecanismo de regulación postraduccional en SA

Además de la gluconeogénesis para la síntesis de las vitaminas como la tiamina y el piridoxal fosfato, también es importante la transulfuración, ya que la tiamina y la biotina son moléculas que contienen azufre, la transulfuración en la cepa *R. etli* CE3 en SA comparado con SAB probablemente se lleva a cabo con la participación de *nifSch* y el operón *sufBDF* ya que el gen *sufS* que completaría el sistema *sufBCD-sufS* no está anotado en este genoma, no se sabe cual puede ser la implicación de la probable ausencia del gen *sufS*, es posible que la transulfuración en SA no sea eficiente ya que se requiere piridoxal fosfato, aunado a que para la síntesis de piridoxal fosfato se requiere TPP y en SA probablemente este cofactor está limitado ya que en la cepa *R. etli* CE3 está limitada de TPP (Taboada *et al.*, 2008).

En contraparte, la cepa *R. etli* CE3 en SAB con relación a SA, para la respiración, sobre-expresó el gen *coxN* que codifica para una citocromo oxidasa c, los genes *fpr* y *fdsA* para dos ferredoxinas y el gen *fdsB* para una formato deshidrogenasa. Así como genes cuyos productos están involucrados en el metabolismo de nucleótidos, como; *carA* para la síntesis de precursores de pirimidinas, *iunH2* para la degradación de purinas, *dht* para la degradación de pirimidinas y el gen *nadA* para la síntesis de nicotinato y nicotinamida. Además del gen *purF* para la síntesis de fosforibosilamino en la vía de síntesis de las purinas y *hisI* para la síntesis de histidina a partir de PRPP, lo que sugiere que el metabolismo de nucleótidos es mayor en SAB que en SA. Así mismo, en SAB sobre-expresó el gen *dapE2* para la síntesis de lisina (Fig. 4), *phhA* para la síntesis de aromáticos, *argD2* para la síntesis de arginina, la ornitina descarboxilasa hipotética *ypch01309* RHE_CH03662 que convierte ornitina a putrescina, así como el gen *dctA* para el transporte de dicarboxílicos. Además el gen *aldA* que codifica para una alanina deshidrogenasa que convierte piruvato a alanina, la cual depende de la gluconeogénesis, así como 6 genes hipotéticos que codifican para permeasas de aminoácidos *ypch01303* RHE_CH03662, *ypf00073* RHE_PF00162, *ypb00079* RHE_PB00127, *ypc00088* RHE_PC00162, *ypch00062* RHE_CH00175, *ypch01402* RHE_CH03964, probablemente relacionados con excreción y absorción de aminoácidos en SAB. Adicionalmente se elevó la transcripción de 3 genes putativos RHE_CH03002, RHE_CH02740 y RHE_CH03704 para el transporte y metabolismo de carbohidratos en SAB comparado con SA, lo que sugiere que la biosíntesis de carbohidratos es mayor en SAB. El metabolismo del azufre también está elevado en SAB ya que se sobre-expresaron los genes *cizK2*, *ggt2* y *tmrU* con respecto a SA, además de tres transportadores de sulfato. Así mismo, los genes *glnK*, *glnD* y *ntrC* para el metabolismo del nitrógeno. Igualmente la síntesis de lípidos, ya que sobre-expresó el gen *acpS* y *ypch00349* RHE_CH01047.

Es relevante la sobre-expresión del gen *ispE* para la síntesis de isoprenoides, porque en ésta vía se genera la deoxixilulosa-P por la enzima DXS-TPP dependiente, que es un precursor de la síntesis del tiazol de la tiamina y del piridoxal fosfato. Igualmente dos transportadores de hierro, el gen *cyaG2* para la síntesis del AMPc y *relA* que codifica para la alarmona, probablemente ésta enzima está elevada porque la contienen los ribosomas y solo es activa cuando en la síntesis de la proteína se inserta un ARNt que no contiene su aminoácido, en SAB la cepa *R. etli* CE3 está creciendo exponencialmente y no hay evidencias de limitación de aminoácidos para la síntesis de las proteínas. Igualmente, en SAB se observó la transcripción incrementada de un mayor número de genes para la biosíntesis de pared y membrana (categoría M) y el gen *ftsH* para la división celular, lo cual correlaciona con que en SAB a diferencia de SA la cepa *R. etli* CE3 está creciendo óptimamente.

Es notable, además, que en el metabolismo aeróbico de SAB con relación al metabolismo fermentativo de SA, se elevó la transcripción del factor sigma *sigA*, $\sigma 70$, que regula funciones del metabolismo central, el gen *greA* importante en la transcripción y elongación después de los sitios de arresto codificados en los templados, así como, *rbfA* y *ksgA* importantes para el procesamiento del ARNr. En contraste con el metabolismo fermentativo de SA, en el metabolismo aeróbico de la cepa *R. etli* CE3 en SAB, se elevó la transcripción de genes relacionados con la resistencia a drogas, estrés oxidativo, chaperonas, estrés por calor, estrés osmótico y proteasas.

1.2.1.4 CONCLUSIONES CAPITULO II. Transcriptoma SA-SAB.

1.- La cepa *R. etli* CE3 en SA comparado con SAB cuando está dejando de crecer sobre-expresó los genes de la síntesis de la tiamina y para el transporte de biotina, así como los genes para los complejos de la PDH y ODH, lo que correlaciona con que la cepa *R. etli* CE3 está limitada de sus vitaminas durante la transición hacia el metabolismo fermentativo.

2.- La cepa *R. etli* CE3 en SA en contraste con SAB incrementó la transcripción de los operones *fixNOQPd* y *fixGHIS-stoRd* para la síntesis y maduración de la oxidasa simbiótica *cbb3*. Probablemente se debe a la microaerobiosis debido a la agregación celular, mientras que en el transcriptoma SA-SAT, fue en SAT donde se sobre-expresaron estos genes, lo cual probablemente se debe a que hay un poco de agregación celular en SAT, se sabe que los operones *fixNOQPd-f* están regulados por microaerobiosis mediante reguladores tipo *fnr* (Granados-Baeza *et al.*, 2007).

3.- La cepa *R. etli* CE3 en SA con relación a SAB sobre-expresó el gen *cisZ* para la citrato sintasa. Durante el metabolismo fermentativo, la bacteria excreta intermediarios del ciclo de Krebs, es probable que en consecuencia sensa limitación de carbono, debido en parte porque la actividad de la ODH está baja por una limitación de tiamina o inhibición por acumulación de poder reductor limitando el flujo de carbono en el ciclo. El incremento

de la proteína citrato sintasa, es probable que facilite la competencia por el acetil CoA entre el ciclo de Krebs y la vía de síntesis del PHB.

4.- La cepa *R. etli* CE3 en SA con respecto a SAB elevó la transcripción de genes de la familia del aspártico, tales como; *vbsA*, *ubsL*, *ahcY* y *dapAf*, probablemente haya limitación de estos aminoácidos en SA, ya que su síntesis depende del aspártico y éste se sintetiza por transaminación piridoxal fosfato dependiente del oxaloacetato, que es un intermediario del ciclo de Krebs. Esta vía podría estar limitada de carbono durante el metabolismo fermentativo ya que la bacteria está excretando al medio intermediarios del ciclo de Krebs y a que la biotina y tiamina son limitantes, también se sobre-transcribieron genes de ésta vía en SAB o SAT (ver adelante).

5.- La cepa *R. etli* CE3 en SA en contraste con SAB elevó la transcripción del gen *zwf1* de la vía de las pentosas fosfato, y los genes *uxuAb*, *manB*, *ypch00782* RHE_CH02359, *bglSf* y *galE2*, relacionados con transporte, metabolismo y síntesis de carbohidratos, lo que apoya la propuesta de que tiene disminuido el flujo del carbono en la vía de las pentosas fosfato, debido a que la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa de la vía de gluconeogénesis está disminuida (Encarnación *et al.*, 1995),

6.- La cepa *R. etli* CE3 en SA en comparación con SAB sobre-expresó los genes *sufBCD* y *nifSch* para las reacciones de transulfuración, las cuales requieren del cofactor piridoxal fosfato y éste probablemente sea también limitante porque requiere TPP para su síntesis.

7.- La cepa *R. etli* CE3 en SA comparado con SAB tiene sobre-expresados 5 reguladores transcripcionales y 2 factores sigma extracelulares; *sigK* y *rpoI*. Probablemente estos reguladores, estén relacionados funcionalmente con genes del metabolismo fermentativo, para la agregación, dejar de crecer, la formación de biofilm, excretar o importar metabolitos al medio, resistencia a estreses y antibióticos así como la respiración entre otras.

8.- La cepa *R. etli* CE3 en SAB en contraste con SA elevó la transcripción de los genes *coxN*, *fpr*, *fdsA* y *fdsB* para la síntesis del citocromo c y ferredoxinas, lo que indica la estrategia de la respiración en condiciones aeróbicas con una escasa agregación celular, a diferencia de SA y SAT donde las bacterias se agregaron y se sobre-expresó el citocromo *cbb3*, si bien en SAT la agregación es menor que en SA.

9.- La cepa *R. etli* CE3 en SAB con respecto a SA elevó la transcripción de los genes *carA*, *iunH2*, *dht*, *nadA* y *purF* para el metabolismo de nucleótidos e *hisI* y *dapE2*, *phhA*, *argD2* y una ornitina descarboxilasa para la síntesis de aminoácidos. La sobre transcripción del primer gen de la síntesis de las purinas, *purF* sugiere que el flujo de carbono en ésta vía es mayor en SAB que en SA.

10.- La cepa *R. etli* CE3 en SAB en contraste con SA elevó la transcripción del gen *dapE2*, para la síntesis de la lisina la cual pertenece a la familia del aspártico, se

encontraron genes sobre-expresados para la síntesis de aminoácidos de ésta familia en los dos transcriptomas (SA-SAB y SA-SAT) excepto en SA de SA-SAT (Fig. 4), es notable que en SA se sobre-transcribieron cuatro genes mientras que en SAB solo uno, es probable que en MM ésta vía este limitada de carbono, la cual depende del carbono gluconeogénico, la suplementación de biotina consume carbono gluconeogénico (piruvato) mediante la actividad de la PC, lo que probablemente aumente el flujo de carbono en esta vía, mientras que en MM la biotina es limitante.

11.- La cepa *R. etli* CE3 en SAB con respecto a SA elevó la transcripción del gen *acpS*, para la acilación de lípidos y ácidos grasos y el gen *ypch00349* RHE_CH01047 que codifica para una proteína 3-oxoacil-(acil-acarreadora) reductasa, es probable que la biotina este aumentando las carboxilaciones para la síntesis de ácidos grasos, precursores para la síntesis de membrana.

12.- La cepa *R. etli* CE3 en SAB en contraste con SA elevó la transcripción del gen *dctA* para el transporte de dicarboxílicos, lo que sugiere que el metabolismo está incrementado en SAB comparado con SA, ya que la fuente de carbono utilizada, ácido succínico, es un ácido dicarboxílico, probablemente la oxidación incompleta del carbono en el ciclo de Krebs, regule de manera negativa la transcripción de este transportador en SA.

13.- La cepa *R. etli* CE3 en SAB en contraste con SA incrementó la transcripción de los genes *cizK2*, *ggt2*, y *trmU* para el metabolismo del azufre, así como tres transportadores de sulfato, el crecimiento óptimo de la bacteria demanda un incremento de moléculas que contienen azufre, el cual es donado a las moléculas por la cisteína.

14.- La cepa *R. etli* CE3 en SAB con respecto a SA sobre-expresó los genes del sistema *ntr* de la asimilación del nitrógeno *glnK*, *glnD* y *ntrC*. Lo que sugiere una actividad elevada de la glutamino sintetasa I, para la síntesis de la glutamina, la cual es donadora del nitrógeno a las moléculas que lo contienen.

15.- La cepa *R. etli* CE3 en SAB en contraste con SA elevó la transcripción del gen *ispE*, de la vía no-mevalonato para la síntesis de isoprenoides precursores de la ubiquinona, ésta vía genera deoxixilulosa-P para la síntesis del piridoxal fosfato y el tiazol de la tiamina, lo que apoya la propuesta de que en SAB está incrementada la síntesis de las vitaminas.

16.- La cepa *R. etli* CE3 en SAB en relación con SA elevó la transcripción del gen *cyaG2*, para la síntesis de AMPc, que aún no es claro cual es su función en el metabolismo, se sabe en este laboratorio que la adición de 1 mM de AMPc estimula el crecimiento aeróbico de la cepa *R. etli* CE3.

17.- La cepa *R. etli* CE3 en SAB con respecto a SA incrementó la transcripción del gen *relA* para la síntesis de la alarmona ppGpp, la cual en *E. coli* se incrementa en condiciones de limitación de aminoácidos, es muy probable que la actividad de ésta enzima acoplada a los ribosomas sea muy baja o inactiva en SAB.

18.- La cepa *R. etli* CE3 en SAB con relación a SA aumentó la transcripción del gen *ftsH* para la división celular, lo que confirma que la duplicación bacteriana es mayor en SAB.

19.- La cepa *R. etli* CE3 en SAB sobre-expresó 21 de genes para la síntesis de pared y membrana en contraste solo 5 en SA. Debido a que la bacteria está creciendo óptimamente con respecto a SA.

20.- La cepa *R. etli* CE3 en SAB en contraste con SA sobre-expresó los genes *rbfA* y *ksgA* para el procesamiento del ARNr. Se sabe en *E. coli* que el crecimiento óptimo de la bacteria está acompañado del incremento de la síntesis de los ribosomas para la síntesis de las proteínas.

21.- La cepa *R. etli* CE3 en SAB en contraste con SA sobre-expresó el factor sigma 70 *sigA*, además de 7 reguladores transcripcionales. Sigma 70 está relacionado con la regulación de metabolismo central de la bacteria, su sobre-expresión, así como la predicción de las relaciones funcionales de los reguladores transcripcionales en SAB mediante el programa STRING (von Mering et al., 2007) concuerda con un crecimiento eficiente de la bacteria.

Transcriptoma SA-SAB, genes que elevaron su transcripción en SA.

COMPARACION SA-SAB, GENES SOBRE TRANSCRITOS EN SA

Valor P	Promedio	Desviación estándar	Identificador	Gen	Función	COG	Cat.
3.76E-07	-2.807964464	0.248293201	RHE_PD00298	<i>azuPd</i>	pseudoazurin blue-copper protein	COG3794	[C]
3.17E-06	-1.652899289	0.335416646	RHE_CH01938	<i>lpdAchl</i>	dihydrolipoamide dehydrogenase protein	COG1249	[C]
9.12E-06	-1.508403911	0.341683349	RHE_PF00503	<i>fixGf</i>	ferredoxin oxidase protein	COG0348	[C]
2.55E-05	-1.111615338	0.228657925	RHE_CH01933	<i>pdhAl</i>	pyruvate dehydrogenase alpha subunit protein	COG1071	[C]
3.42E-05	-1.504804359	0.27745872	RHE_CH01935	<i>pdhB</i>	dihydrolipoamide acetyltransferase protein	COG0508	[C]
5.40E-05	-0.477867061	0.13149548	RHE_CH02804	<i>dld</i>	D-lactate dehydrogenase (cytochrome) protein	COG0277	[C]
7.19E-05	-1.346617429	0.449458356	RHE_PD00293	<i>fixPd</i>	cytochrome C oxidase, fixP chain (cbb3-type subunit III) protein	COG2010	[C]
0.00072446	-1.522680995	0.443567155	RHE_PD00295	<i>fixOd</i>	cytochrome C oxidase, fixO chain protein	COG2993	[C]
0.000782759	-0.61776398	0.291117429	RHE_CH02182	<i>cisZ</i>	citrate synthase protein	COG0372	[C]
0.001540726	-0.801613427	0.437542807	RHE_CH03887	<i>sucB</i>	dihydrolipoamide succinyltransferase subunit of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex protein	COG0508	[C]
5.80E-07	-1.273142756	0.200140276	RHE_PF00473	<i>bglSf</i>	beta-glucosidase protein	COG1192	[D]
1.79E-05	-0.605367921	0.121519104	RHE_CH02841	<i>fisA</i>	cell division protein	COG0849	[D]
3.90E-08	-1.449143825	0.121461413	RHE_CH01936	<i>ypch00628</i>	probable arylesterase protein	COG2755	[E]
1.20E-07	-2.15492112	0.280675749	RHE_CH02254	<i>nifSch</i>	pyridoxal-phosphate-dependent aminotransferase protein (nitrogenase cofactor synthesis protein)	COG1104	[E]
1.02E-06	-0.771478017	0.081492151	RHE_PC00031	<i>ype00018</i>	probable polyamine ABC transporter, ATP-binding protein	COG3842	[E]
4.47E-06	-3.8819752	0.855871153	RHE_PF00461	<i>vbsL</i>	cystathionine gamma-synthase protein	COG0626	[E]
1.82E-05	-1.174606055	0.329033298	RHE_CH01897	<i>aapQ</i>	general L-amino acid ABC transporter, permease protein	COG4597	[E]
3.52E-05	-0.964461995	0.274027199	RHE_CH01298	<i>pepN</i>	aminopeptidase N protein	COG0308	[E]
5.29E-05	-1.150571897	0.35391131	RHE_CH01895	<i>aapP</i>	general L-amino acid ABC transporter, ATP-binding protein	COG1126	[E]
6.15E-05	-1.326854421	0.259735255	RHE_CH00736	<i>dppAchl</i>	dipeptide ABC transporter, substrate-binding protein	COG0747	[E]
8.26E-05	-1.568820886	0.468428686	RHE_CH01898	<i>aapJ</i>	general L-amino acid ABC transporter, substrate-binding protein	COG0834	[ET]
9.00E-05	-1.252867488	0.37926322	RHE_CH02249	<i>ypch00729</i>	putative selenocysteine lyase protein	COG0520	[E]
0.000138882	-1.551626073	0.125942136	RHE_CH03015	<i>proC</i>	pyrroline-5-carboxylate reductase protein	COG0345	[E]
0.000335164	-0.579766146	0.238341328	RHE_PF00094	<i>dapAfl</i>	dihydrodipicolinate synthase protein	COG0329	[EM]
0.00043577	-0.60408542	0.19324597	RHE_CH02905	<i>ypch01012</i>	probable hydantoin racemase protein	COG4126	[E]
0.000519624	-0.559382368	0.237593605	RHE_CH03321	<i>braC2</i>	amino acid ABC transporter, substrate-binding protein	COG0683	[E]
2.64E-05	-0.720054725	0.071795628	RHE_CH02457	<i>manB2</i>	beta-mannosidase protein	COG3250	[G]
2.74E-05	-0.614777971	0.145635735	RHE_PC00172	<i>ypc00098</i>	probable sugar ABC transporter, ATP-binding protein	COG1129	[G]

5.14E-05	-1.560146903	0.453828404	RHE_PE00400	<i>ype00208</i>	probable 4-deoxy-L-threo-5-hexosulose-uronate ketol-isomerase protein	COG3717	[G]
0.000680384	-0.60555403	0.238072494	RHE_CH00704	<i>zwfI</i>	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase protein	COG0364	[G]
0.000727131	-0.680002139	0.21760467	RHE_PB00006	<i>uxuAb</i>	mannonate dehydratase protein	COG1312	[G]
0.001303563	-0.325377298	0.181433279	RHE_CH02359	<i>ypch00776</i>	probable sugar ABC transporter, ATP-binding protein	COG1129	[G]
3.54E-07	-1.887722906	0.297833818	RHE_PD00300	<i>hemNdl</i>	coproporphyrinogen III oxidase protein	COG0635	[H]
3.14E-06	-0.698815763	0.099655622	RHE_CH01941	<i>lipA</i>	lipoic acid synthetase protein	COG0320	[H]
1.85E-05	-1.065739394	0.209428476	RHE_PB00080	<i>thiG</i>	thiazole biosynthesis protein	COG2022	[H]
2.75E-05	-1.467115808	0.219509441	RHE_PB00082	<i>thiC</i>	thiamine biosynthesis protein	COG0422	[H]
0.000115871	-0.788656673	0.070983131	RHE_PB00079	<i>thiEb</i>	thiamine-phosphate pyrophosphorylase protein	COG0352	[H]
0.000833964	-0.762768233	0.35867955	RHE_CH04011	<i>ispA</i>	geranyltranstransferase protein	COG0142	[H]
0.001341462	-0.944252928	0.424724186	RHE_CH00031	<i>ahcY</i>	adenosylhomocysteinase protein	COG0499	[H]
7.67E-05	-1.389511772	0.417695274	RHE_CH04043	<i>yhch01160</i>	hypothetical conserved protein	COG0236	[IQ]
0.00018458	-0.477217779	0.164916965	RHE_CH01870	<i>accBch</i>	acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxyl carrier protein	COG0511	[I]
0.000335655	-1.021418997	0.306410932	RHE_PE00160	<i>ype00074</i>	probable AMP-dependent synthetase and ligase protein	COG0318	[IQ]
0.000509417	-0.55475966	0.24452926	RHE_CH00961	<i>lytB</i>	penicillin tolerance protein	COG0761	[IM]
1.20E-05	-3.848458734	1.020216282	RHE_PF00459	<i>vbsA</i>	N6-hydroxylysine O-acetyltransferase protein	COG1670	[J]
9.84E-05	-0.61468576	0.211415669	RHE_CH01675	<i>rplC</i>	50S ribosomal protein L3	COG0087	[J]
0.000408143	-1.234741693	0.464886598	RHE_CH04045	<i>ypch01429</i>	putative serine--tRNA ligase protein	COG0172	[J]
4.67E-06	-0.628754367	0.131060386	RHE_CH02900	<i>ypch01010</i>	probable transcriptional regulator protein	COG2188	[K]
1.38E-05	-0.526310199	0.020480883	RHE_CH03914	<i>ypch01387</i>	putative acetyltransferase protein	COG0454	[KR]
4.15E-05	-1.190308679	0.302874874	RHE_CH01020	<i>ypch00337</i>	putative negative regulator protein PspA (suppresses sigma54-dependent transcription)	COG1842	[KT]
0.000133102	-3.136567587	0.963160626	RHE_PF00462	<i>rpoI</i>	RNA polymerase sigma factor protein	COG1595	[K]
0.000165452	-0.940161989	0.335301727	RHE_CH01019	<i>ypch00336</i>	probable transcriptional regulator protein, TetR family	COG1309	[K]
0.000393396	-0.408411384	0.107722982	RHE_CH00429	<i>sigK</i>	RNA polymerase sigma factor protein, ECF family	COG1595	[K]
0.000532599	-0.469620203	0.20347495	RHE_CH02395	<i>ypch00791</i>	probable transcriptional regulator protein	COG2390	[K]
0.000689645	-0.589296241	0.154822868	RHE_CH02578	<i>yhch00766</i>	hypothetical conserved protein	COG1733	[K]
0.00070919	-0.558896502	0.266085423	RHE_CH02142	<i>ypch00703</i>	probable transcriptional regulator protein	COG1802	[K]
0.00073777	-0.378691081	0.187159881	RHE_CH03346	<i>ypch01166</i>	putative acetyltransferase protein	COG0454	[KR]
0.001209751	-0.685526706	0.175216534	RHE_CH04119	<i>parB</i>	chromosome partitioning protein B	COG1475	[K]
0.001259686	-1.007377875	0.432487836	RHE_CH00799	<i>ypch00268</i>	probable transcriptional regulator protein, TetR family	COG1309	[K]

4.75E-05	-0.686784514	0.091781875	RHE_CH00399	<i>ihfB</i>	integration host factor beta-subunit protein	COG0776	[L]
4.82E-05	-0.865950169	0.264095333	RHE_CH03671	<i>nth</i>	endonuclease III protein	COG0177	[L]
0.00021576	-0.644372914	0.244335976	RHE_CH01590	<i>hrm</i>	bacterial nucleoid DNA-binding protein	COG0776	[L]
0.000366974	-0.65626411	0.20176162	RHE_PA00079	<i>yia00018</i>	putative insertion sequence transposase protein	COG4584	[L]
0.000461718	-0.586511246	0.261517708	RHE_PD00004	<i>yid00003</i>	putative insertion sequence transposase protein	COG2801	[L]
0.0006415	-0.764182	0.225641051	RHE_CH02771	<i>recD</i>	exodeoxyribonuclease V alpha subunit protein	COG0507	[L]
0.000674516	-1.189454616	0.260301454	RHE_CH02252	<i>ypch00730</i>	putative endonuclease protein	COG2827	[L]
9.77E-07	-2.629808665	0.379148993	RHE_CH03265	<i>ypch01133</i>	putative membrane protein, transduces energy to outer membrane receptors	COG0810	[M]
1.85E-06	-0.674576453	0.129853829	RHE_CH01559	<i>ypch00539</i>	probable glycosyltransferase protein	COG2148	[M]
3.19E-06	-2.008978578	0.271438266	RHE_CH00692	<i>cpsF</i>	N-acetyl mannosamine transferase protein	COG1922	[M]
4.97E-06	-1.323652411	0.290557799	RHE_CH00569	<i>galE2</i>	UDP-glucose 4-epimerase protein	COG1087	[M]
0.000203883	-0.832487527	0.185580815	RHE_CH02244	<i>lysM</i>	cell-wall lytic enzyme	COG3757	[M]
0.000230092	-0.637803323	0.251342258	RHE_CH01560	<i>ypch00540</i>	probable glycosyltransferase protein	COG0438	[M]
0.001375798	-0.834028012	0.400638957	RHE_CH03456	<i>ypch01222</i>	probable heat resistant agglutinin 1 protein	COG3637	[M]
2.15E-08	-2.034054823	0.199538491	RHE_CH00671	<i>flaCch3</i>	flagellin C protein	COG1344	[N]
3.77E-08	-2.804020629	0.20545368	RHE_CH00679	<i>flgEch</i>	flagellar hook protein	COG1749	[N]
1.33E-06	-2.035623304	0.261689038	RHE_CH00683	<i>flbT</i>	flagellin synthesis regulator (repressor) protein	COG5443	[N]
2.52E-06	-2.394743439	0.387047049	RHE_CH00659	<i>flgC</i>	flagellar basal-body rod protein	COG1558	[N]
3.64E-06	-2.437404114	0.405718003	RHE_CH00660	<i>fliE</i>	flagellar hook-basal body protein	COG1677	[NU]
6.78E-06	-1.579550459	0.333143975	RHE_CH00672	<i>flaCch4</i>	flagellin C protein	COG1344	[N]
8.08E-06	-3.367361189	0.816042264	RHE_CH00669	<i>flaCch1</i>	flagellin C protein	COG1344	[N]
1.21E-05	-1.897055584	0.380627357	RHE_CH00658	<i>flgB</i>	flagellar basal-body rod protein	COG1815	[N]
2.31E-05	-2.241252122	0.621202919	RHE_CH00684	<i>flgD</i>	flagellar basal-body rod protein	COG1843	[N]
4.02E-05	-1.509797733	0.480241902	RHE_CH00655	<i>flgF</i>	flagellar basal-body rod protein	COG4786	[N]
7.38E-05	-1.284368891	0.432478918	RHE_CH00912	<i>mcpU</i>	methyl-accepting chemotaxis protein	COG0840	[NT]
8.25E-05	-2.287089343	0.56351905	RHE_CH00681	<i>flgLch</i>	flagellar hook-associated protein	COG1344	[N]
8.64E-05	-1.086789375	0.32630085	RHE_CH00663	<i>flgI</i>	flagellar basal-body P-ring protein	COG1706	[N]
0.000110444	-0.457123375	0.164397233	RHE_CH02245	<i>ypch00728</i>	probable flagellar basal body rod protein	COG1749	[N]
0.00013825	-0.934254759	0.313276429	RHE_CH00411	<i>mcpV1</i>	methyl-accepting chemotaxis protein	COG0840	[NT]
0.000180369	-1.849087646	0.661308275	RHE_CH00670	<i>flaCch2</i>	flagellin C protein	COG1344	[N]
0.000466997	-0.88616029	0.413443241	RHE_CH00974	<i>mcpX2</i>	methyl-accepting chemotaxis protein	COG0840	[NT]

0.000481356	-1.211145407	0.563672404	RHE_CH00639	<i>cheA</i>	chemotaxis two-component sensor histidine kinase protein	COG0643	[NT]
0.000525371	-0.967959681	0.378156136	RHE_CH00206	<i>cpaD</i>	pilus assembly protein	COG5461	[N]
0.000638123	-1.181900244	0.447999878	RHE_CH03516	<i>cheRch2</i>	chemotaxis methyltransferase protein	COG1352	[NT]
0.000795257	-0.808502976	0.363863174	RHE_CH00646	<i>fliF</i>	flagellar M-ring protein	COG1766	[NU]
0.000846777	-1.353075034	0.623062102	RHE_CH00651	<i>fliG</i>	flagellar motor switch protein	COG1536	[N]
0.000935393	-0.340587363	0.153818586	RHE_CH02547	<i>mcpV3</i>	methyl-accepting chemotaxis protein	COG0840	[NT]
0.001580233	-0.90334862	0.502574672	RHE_CH00653	<i>fliM</i>	flagellar C-ring protein	COG1868	[N]
9.93E-06	-1.540348806	0.389128714	RHE_PF00505	<i>fixQf</i>	cytochrome C oxidase, fixQ chain protein	COG4736	[O]
1.80E-05	-1.245574951	0.265982683	RHE_CH02253	<i>suJB</i>	ABC transporter involved in Fe-S cluster assembly, permease protein	COG0719	[O]
0.000101585	-1.134754305	0.318021101	RHE_CH01174	<i>ypch00386</i>	probable organic hydroperoxide resistance (osmotically inducible) protein	COG1764	[O]
0.000170083	-1.577918445	0.352424295	RHE_PD00296	<i>fixNd</i>	cytochrome C oxidase, fixN chain protein	COG3278	[O]
0.000191669	-1.627879296	0.467382834	RHE_PD00294	<i>fixQd</i>	cytochrome C oxidase, fixQ chain protein	COG4736	[O]
0.000193056	-1.244136076	0.357401003	RHE_CH02251	<i>suJC</i>	ABC transporter involved in Fe-S cluster assembly, ATP-binding protein	COG0396	[O]
0.00031208	-1.34554486	0.468900002	RHE_CH02250	<i>suJD</i>	ABC transporter involved in Fe-S cluster assembly, permease protein	COG0719	[O]
0.000353454	-0.35396662	0.147872344	RHE_CH01239	<i>groELch2</i>	60 kDa chaperonin, heat shock protein	COG0459	[O]
0.000482872	-1.56706313	0.252026722	RHE_CH00668	<i>ypch00237</i>	putative glycosyltransferase TPR domain protein	COG3914	[O]
0.001109755	-1.181623498	0.418309947	RHE_PF00498	<i>ccml</i>	cytochrome c-type biogenesis protein	COG4235	[O]
5.02E-09	-1.597405616	0.093205685	RHE_PF00501	<i>fixIf</i>	cation transport ATPase protein	COG2217	[P]
2.56E-08	-2.844291653	0.173644027	RHE_CH00878	<i>mntH</i>	manganese transporter protein	COG1914	[P]
3.79E-07	-3.395440922	0.475033697	RHE_PF00464	<i>fhuD</i>	ferrichrome-iron ABC transporter, substrate-binding protein	COG0614	[P]
1.61E-06	-1.259928539	0.224942099	RHE_PD00289	<i>fixSd</i>	precursor of a membrane (nitrogen fixation)protein coupled to cation pump	COG3197	[P]
1.63E-05	-2.919785534	0.807261562	RHE_PF00469	<i>fhuA</i>	ferrichrome-iron transporter, receptor protein	COG1629	[P]
3.85E-05	-1.715573464	0.117038911	RHE_PF00271	<i>ypf00128</i>	probable iron ABC transporter, ATP-binding protein	COG1120	[PH]
7.97E-05	-2.029894727	0.592659597	RHE_CH03271	<i>hmuV</i>	hemin transport system, ATP-binding protein	COG4559	[P]
8.34E-05	-2.008925525	0.66202082	RHE_CH03269	<i>hmuT</i>	hemin transport system, hemin-binding protein	COG4558	[P]
0.000174854	-2.771163317	1.086835592	RHE_CH03267	<i>hmuP</i>	hemin transport system, hemin uptake protein	COG4256	[P]
0.000177105	-1.022259045	0.403802068	RHE_CH02711	<i>znuC</i>	zinc uptake ABC transporter, ATP-binding protein	COG1121	[P]
0.000233221	-2.432934481	0.305638869	RHE_PF00269	<i>ypf00126</i>	probable iron ABC transporter, substrate-binding protein	COG0614	[P]
0.000293836	-2.643080724	1.127029796	RHE_CH02683	<i>ypch00917</i>	probable ferrichrome ABC transporter, substrate-binding protein	COG0614	[P]
0.000310088	-1.408446673	0.407973405	RHE_PD00290	<i>fixId</i>	cation transport ATPase protein	COG2217	[P]
0.000390061	-0.493535178	0.210511875	RHE_CH00930	<i>bioM</i>	biotin transporter, ATP-binding protein	COG1122	[P]
0.000417226	-0.912440544	0.174120459	RHE_CH04081	<i>bfr</i>	bacterioferritin protein	COG2193	[P]

0.000464283	-1.860444188	0.864599539	RHE_CH03270	<i>hmuU</i>	hemin transport system, permease protein	COG0609	[P]
0.000524691	-2.216237101	0.452434416	RHE_CH00304	<i>yhch00073</i> <i>ypc00057</i> pseudogene	hypothetical conserved protein	COG3487	[P]
0.000704523	-2.074732409	0.784644794	RHE_PC00111		putative DnaK suppressor protein	COG2217	[P]
0.001324481	-1.586086631	0.693293514	RHE_CH04056	<i>sfuA</i>	iron(III) ABC transporter, substrate-binding protein	COG1840	[P]
0.000109766	-1.240094089	0.45382877	RHE_PD00024	<i>ypd00006</i>	probable chalcone synthase protein	COG3424	[Q]
0.000563426	-0.99254691	0.329175413	RHE_CH01496	<i>ypch00517</i>	probable metallo-oxidoreductase protein	COG2132	[Q]
0.000764723	-0.394701227	0.1449534	RHE_CH00723	<i>ypch00244</i>	probable metallopeptidase protein	COG2931	[Q]
4.55E-07	-3.158443459	0.490114348	RHE_PC00106	<i>adhA2</i>	alcohol dehydrogenase protein	COG1064	[R]
2.14E-06	-2.842954336	0.395705732	RHE_PD00022	<i>yh00013</i>	hypothetical protein	COG2823	[R]
2.50E-06	-1.869904926	0.352341607	RHE_PF00468	<i>fnuF</i>	ferric iron reductase protein	COG4114	[R]
1.55E-05	-1.693642445	0.23331878	RHE_CH01937	<i>ypch00629</i>	putative acetyltransferase protein	COG0456	[R]
1.60E-05	-2.63137139	0.728166049	RHE_CH03262	<i>yhch00980</i>	hypothetical conserved protein	COG2329	[R]
6.96E-05	-0.966792499	0.31884624	RHE_CH03435	<i>ypch01213</i>	probable oxidoreductase protein	COG2041	[R]
0.000161245	-1.467773935	0.557485517	RHE_CH00321	<i>yhch00078</i>	hypothetical conserved protein	COG3450	[R]
0.000267288	-0.492645289	0.185720183	RHE_CH00928	<i>bioY</i>	biotin transporter protein	COG1268	[R]
0.000362174	-0.505655014	0.180489539	RHE_CH00302	<i>yhch00071</i>	hypothetical conserved protein	COG3489	[R]
0.000535903	-1.03061551	0.393646929	RHE_CH03332	<i>ypch01163</i>	putative acetyltransferase protein	COG2388	[R]
0.000816969	-1.294069449	0.593152521	RHE_PC00107	<i>yh00025</i>	hypothetical conserved protein	COG0517	[R]
0.001133583	-1.936080911	1.425542677	RHE_PF00490	<i>yh00142</i>	hypothetical conserved protein	COG0517	[R]
3.31E-06	-2.02458117	0.306320467	RHE_PD00299	<i>yh00101</i>	hypothetical protein	COG4549	[S]
6.88E-06	-0.754894232	0.102548064	RHE_CH00515	<i>yhch00120</i>	hypothetical conserved protein	COG5352	[S]
3.09E-05	-0.795803437	0.189071975	RHE_CH01167	<i>yhch00339</i>	hypothetical conserved protein	COG1376	[S]
5.78E-05	-0.877735151	0.161535402	RHE_CH01940	<i>yhch00561</i>	hypothetical conserved membrane protein	COG2261	[S]
5.94E-05	-2.325471194	0.557498266	RHE_PF00526	<i>nirV</i>	nitrate reductase protein	COG1262	[S]
9.28E-05	-2.070459507	0.571846636	RHE_CH02209	<i>yhch00646</i>	hypothetical conserved protein	COG3672	[S]
0.00013795	-2.405104531	0.859866459	RHE_PF00511	<i>yh00147</i>	hypothetical conserved protein	COG4549	[S]
0.000198025	-1.354578379	0.39948173	RHE_CH00664	<i>yhch00162</i>	hypothetical conserved protein	COG3334	[S]
0.000696505	-1.606314968	0.737748233	RHE_PF00528	<i>nnrU</i>	denitrification regulator protein	COG4094	[S]
0.000775149	-0.567801764	0.132538901	RHE_CH00813	<i>yhch00193</i>	hypothetical conserved protein	COG1376	[S]
0.000908095	-0.735073738	0.284402114	RHE_CH00396	<i>yhch00089</i>	hypothetical conserved protein	COG3427	[S]
0.000940575	-0.620555498	0.20663389	RHE_CH03309	<i>ypch01154</i>	probable urease-associated protein	COG3813	[S]

0.001106643	-0.752891269	0.401315474	RHE_CH03237	yhch00975	hypothetical conserved protein	COG3672	[S]
7.94E-07	-1.546908996	0.238711959	RHE_PD00288	ypd00049	probable transcriptional regulator protein, Fnr/CRP family	COG0664	[T]
2.19E-05	-3.078151114	0.779230341	RHE_PD00016	ypd00003	putative universal stress UspA protein	COG0589	[T]
3.47E-05	-1.736810625	0.488644166	RHE_PB00096	ypb00056	putative universal stress protein	COG0589	[T]
4.04E-05	-1.423922734	0.307264471	RHE_CH02527	<i>rrpX</i>	two-component response regulator protein	COG0784	[T]
6.48E-05	-1.015245593	0.33023836	RHE_PD00216	<i>fnrNd</i>	oxygen-dependent transcriptional regulator protein, Fnr/CRP family	COG0664	[T]
0.000120642	-1.106572937	0.378578835	RHE_CH00638	<i>cheY1</i>	chemotaxis two-component response regulator protein	COG0784	[T]
0.000159189	-1.872805803	0.446294858	RHE_PC00109	ypc00055	putative universal stress UspA protein	COG0589	[T]
0.000320613	-1.865616459	0.816909238	RHE_PF00527	<i>nmrR</i>	denitrification transcriptional regulator protein, CRP family	COG0664	[T]
0.000378421	-1.152119015	0.436619131	RHE_CH00643	<i>cheY2</i>	protein-glutamate methylesterase protein	COG0784	[T]
0.000446528	-2.309459114	0.564577481	RHE_PC00110	ypc00056	putative DnaK suppressor protein	COG1734	[T]
0.000532231	-1.393638809	0.525893772	RHE_CH03548	<i>tacA</i>	sigma-54-dependent transcriptional regulator (activator) protein	COG2204	[T]
0.000642896	-0.812498189	0.32467081	RHE_CH01633	<i>celR2</i>	two-component response regulator protein	COG3706	[T]
0.000689128	-0.591448754	0.180352905	RHE_CH03091	ypch01077	putative phosphohydrolase protein	COG2206	[T]
0.001142935	-0.733786853	0.379056794	RHE_CH02386	ypch00786	putative sensory box/GGDEF family protein	COG2199	[T]
0.001176985	-1.838060356	0.666535127	RHE_PC00113	ypc00058	putative universal stress UspA protein	COG0589	[T]
3.22E-05	-1.198414745	0.342046913	RHE_PA00050	<i>virB9a</i>	transport secretion system IV, VirB9 protein	COG3504	[U]
5.54E-05	-2.069905523	0.516834413	RHE_PD00054	<i>nolT</i>	nodulation protein	COG4669	[U]
8.89E-05	-1.098152939	0.374975897	RHE_PA00049	<i>virB8a</i>	transport secretion system IV, VirB8 protein	COG3736	[U]
0.000252185	-1.678232378	0.64022738	RHE_CH00212	ypch00074	putative pilus assembly protein (contains TPR repeats)	COG5010	[U]
0.000257841	-0.692225769	0.271650269	RHE_PA00177	<i>trbC</i>	conjugal transfer protein C	COG3838	[U]
0.000300544	-0.821435347	0.278809656	RHE_CH00205	<i>cpaC</i>	pilus assembly secretion protein	COG4964	[U]
0.000474565	-1.319408677	0.581876076	RHE_PA00044	<i>virB3a</i>	transport secretion system IV, VirB3 protein	COG3702	[U]
0.000852975	-1.786135156	0.687720926	RHE_CH03592	yhch01067	hypothetical conserved protein	COG4961	[U]
0.001081717	-1.479706615	0.747508782	RHE_CH00202	<i>pilA</i>	component of type IV pilus, pilin subunit protein	COG3847	[U]
0.001112157	-1.11277724	0.534062229	RHE_CH00208	<i>cpaF</i>	pilus assembly secretion ATP-binding protein	COG4962	[U]
0.001207868	-1.177558157	0.510007637	RHE_PA00045	<i>virB4a</i>	transport secretion system IV, VirB4 protein	COG3451	[U]
1.54E-06	-1.49347924	0.278665147	RHE_CH02605	<i>plyA1</i>	polysaccharidase protein		
5.01E-06	-1.210327364	0.089778774	RHE_CH03330	yhch00993	hypothetical conserved protein		
5.22E-06	-1.802613173	0.297983136	RHE_CH01142	yhch00332	hypothetical conserved protein		
7.31E-06	-1.146460083	0.258400336	RHE_PD00354	<i>repCd</i>	plasmid replication protein RepCd		

9.23E-06	-1.701419778	0.217943605	RHE_CH03520	ypch01244	putative methyl-accepting chemotaxis protein
1.08E-05	-2.757536189	0.718977794	RHE_CH00143	yhch00033	hypothetical protein
1.09E-05	-1.935048159	0.504722984	RHE_CH00896	yhch00219	hypothetical conserved protein
1.21E-05	-4.487552833	0.69536548	RHE_PF00463	<i>vbsC</i>	vicibactin acetylase protein
1.46E-05	-1.716811299	0.410932034	RHE_PE00237	yhe00085	hypothetical protein
1.55E-05	-1.112231618	0.265951471	RHE_CH03519	ypch01243	putative methyl-accepting chemotaxis protein
1.75E-05	-1.875390991	0.424038146	RHE_CH03261	ypch01132	putative bleomycin resistance protein
2.02E-05	-3.948126907	1.068496494	RHE_PF00457	<i>vbsS</i>	vicibactin biosynthesis non-ribosomal peptide synthase protein
2.15E-05	-3.837354811	1.089934126	RHE_CH03263	yhch00981	hypothetical conserved protein
2.52E-05	-1.251337136	0.369828098	RHE_CH00812	<i>lpxQ</i>	lipid A oxidase (involved in formation of 2-aminogluconate) protein
2.64E-05	-1.324008902	0.348627851	RHE_CH01349	<i>ropAch1</i>	porin outer membrane protein
3.02E-05	-1.268308795	0.272633526	RHE_PD00030	ypd00009	probable carbon-monoxide dehydrogenase protein
3.21E-05	-1.262274422	0.251763915	RHE_CH03101	yhch00933	hypothetical conserved protein
4.55E-05	-1.779747333	0.44006361	RHE_CH03524	yhch01043	hypothetical conserved protein
4.87E-05	-1.814954134	0.324562071	RHE_CH01934	<i>pdhA2</i>	pyruvate dehydrogenase beta subunit protein
6.01E-05	-2.072015463	0.606360252	RHE_PF00529	yhff0154	hypothetical protein
6.81E-05	-0.853261091	0.195265205	RHE_CH01876	yhch00545	hypothetical conserved protein
7.62E-05	-1.15199921	0.113444483	RHE_CH01767	yhch00506	hypothetical conserved protein
8.20E-05	-2.294098726	0.814834476	RHE_CH01333	yhch00398	hypothetical conserved protein
8.72E-05	-1.239013975	0.348955807	RHE_CH02437	<i>ropAch2</i>	porin outer membrane protein
0.000131654	-0.433514633	0.133483763	RHE_CH00720	ypch00243	putative two-component sensor histidine kinase protein
0.000168026	-1.246684569	0.493631921	RHE_CH01541	yhch00451	hypothetical protein
0.000188337	-1.783635996	0.476865945	RHE_CH04082	yhch01169	hypothetical conserved protein
0.000189455	-0.913968447	0.272963576	RHE_PA00017	yha00013	hypothetical conserved protein
0.000192282	-0.42873424	0.141160577	RHE_CH03333	yhch00995	hypothetical conserved protein
0.000212753	-1.131047127	0.29111281	RHE_CH03272	yhch00984	hypothetical conserved protein
0.00021867	-3.136213808	1.109984188	RHE_CH03264	yhch00982	hypothetical conserved protein
0.000226872	-1.263362575	0.431895062	RHE_CH00887	yhch00216	hypothetical conserved protein
0.000240497	-0.763533305	0.229770648	RHE_CH02492	<i>clc</i>	chloride channel protein
0.000243691	-0.923994819	0.362046116	RHE_CH03886	yhch01124	hypothetical conserved protein
0.000253191	-3.364280824	1.327556955	RHE_CH03266	yhch00983	hypothetical conserved protein
0.000285619	-0.619012763	0.158305466	RHE_CH03206	yhch00971	hypothetical conserved protein
0.000303837	-1.360422412	0.562677857	RHE_PA00046	<i>virB5a</i>	transport secretion system IV, VirB5 protein
0.000439897	-1.071858216	0.440111226	RHE_CH00690	yhch00167	hypothetical conserved protein

0.000514955	-1.396245934	0.629126992	RHE_CH01517	ypch00523	putative nucleotide sugar transaminase protein		
0.000528497	-2.515421778	1.117186399	RHE_CH02238	yhch00659	hypothetical protein		
0.0005651	-0.761191487	0.290317658	RHE_PE00213	yhe00074	hypothetical conserved protein		
0.000589505	-0.750445415	0.125349586	RHE_CH01628	yhch00477	hypothetical conserved protein		
0.000625509	-0.644441917	0.270652295	RHE_CH02049	yhch00609	hypothetical conserved protein		
0.000682154	-0.796067215	0.30425519	RHE_PC00108	yhc00026	hypothetical conserved protein		
0.000732696	-0.830702757	0.310491398	RHE_CH01159	ypch00379	putative sensory box/GGDEF family protein		
0.00077081	-1.943685972	0.979184521	RHE_CH00689	yhch00166	hypothetical conserved protein		
0.000827482	-1.02832843	0.166775412	RHE_CH01301	yhch00386	hypothetical conserved protein		
0.000841317	-0.760564171	0.378687109	RHE_CH00459	ypch00169	putative sensory box/GGDEF family protein		
0.000856748	-0.947782065	0.477841127	RHE_CH00897	yhch00220	hypothetical conserved protein		
0.000877591	-1.505243145	0.713502904	RHE_PF00522	yh00151	hypothetical conserved protein		
0.001064648	-0.794517812	0.30344905	RHE_CH01851	yhch00538	hypothetical conserved protein		
0.001134076	-1.152948688	0.292778937	RHE_CH03518	ypch01242	putative methyl-accepting chemotaxis protein		
0.001143769	-0.540721386	0.178739052	RHE_PA00146	yha00050	hypothetical conserved protein		
0.001150301	-0.63412058	0.164367568	RHE_CH02340	yhch00692	hypothetical conserved protein		
0.00115184	-0.548544546	0.300528671	RHE_PC00206	yhc00052	hypothetical conserved protein		
0.001153892	-0.278548396	0.149409734	RHE_CH01105	yhch00313	hypothetical protein	1155300..1156154	RHE_CH01105
0.001253107	-0.524439322	0.210810783	RHE_CH02333	yhch00689	hypothetical conserved protein		
0.00137399	-0.737968046	0.293153064	RHE_CH02722	ypch00936	putative endonuclease/exonuclease/phosphatase family protein		
0.001390644	-0.8907063	0.309524641	RHE_CH03303	ypch01150	probable urease-associated protein		
0.001410566	-1.548330454	0.857653932	RHE_PF00513	yh00148	hypothetical protein		
0.001535701	-0.775431939	0.110791592	RHE_CH00104	yhch00024	hypothetical conserved protein		
0.001556142	-0.523724772	0.26804689	RHE_CH00811	yhch00192	hypothetical conserved protein		
0.001560865	-1.241117433	0.688113366	RHE_CH01051	yhch00276	hypothetical conserved protein		

Transcriptoma SA-SAB, genes que elevaron su transcripción en SAB

COMPARACION SA-SAB, GENES SOBRE TRANSCRITOS EN SAB

Valor P	Promedio	Desviación estándar	Identificador	Gen	Función	COG	Cat.	Func.
3.61E-05	0.868689619	0.268934488	RHE_PB00119	<i>ntaA</i>	nitrilotriacetate monooxygenase protein, component A	COG2141		[C]
5.09E-05	1.011302302	0.2882102	RHE_CH03441	<i>ackA</i>	acetate kinase protein	COG0282		[C]
8.82E-05	0.894131423	0.287691848	RHE_CH02078	<i>fpr</i>	ferredoxin-NADP ⁺ reductase protein	COG1018		[C]
0.000259165	0.665393561	0.185355881	RHE_CH04024	<i>fdxA</i>	ferredoxin III protein	COG1146		[C]
0.000355581	1.369055609	0.537603882	RHE_CH00422	<i>bchE</i>	Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester oxidative cyclase subunit protein	COG1032		[C]

0.000604761	0.504203696	0.149741494	RHE_CH03858	<i>fdsB</i>	formate dehydrogenase, beta subunit protein	COG1894	[C]
0.000705982	0.893584372	0.324505111	RHE_CH03117	<i>ypch01086</i>	probable oxidoreductase protein	COG2141	[C]
0.000781102	0.505216557	0.07843965	RHE_CH02616	<i>coxN</i>	cytochrome-c oxidase subunit I protein	COG0843	[C]
1.94E-07	1.826514393	0.255280893	RHE_PF00162	<i>ypf00073</i>	probable amino acid ABC transporter, substrate-binding protein	COG0834	[ET]
7.67E-06	1.413958437	0.328639928	RHE_CH03629	<i>ypch01283</i>	probable ornithine decarboxylase protein	COG0019	[E]
8.25E-06	0.473446244	0.092819698	RHE_PB00152	<i>ypb00098</i>	putative glyoxalase protein	COG0346	[E]
1.54E-05	2.203041091	0.544805013	RHE_CH01979	<i>argD2</i>	diaminobutyrate--pyruvate aminotransferase protein	COG4992	[E]
1.57E-05	0.553590386	0.141112554	RHE_CH00417	<i>dapE2</i>	succinyl-diaminopimelate desuccinylase protein	COG0624	[E]
3.74E-05	0.590685707	0.13721466	RHE_PB00127	<i>ypb00079</i>	probable oligopeptide ABC transporter, permease protein	COG0601	[EP]
5.57E-05	0.766169911	0.141120127	RHE_CH03916	<i>dcp</i>	peptidyl-dipeptidase Dcp protein	COG0339	[E]
0.000125852	1.052143929	0.3774945	RHE_CH02202	<i>his1</i>	phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase protein	COG0139	[E]
0.000128327	0.525197432	0.192303413	RHE_PC00162	<i>ypc00088</i>	probable amino acid ABC transporter, permease protein	COG4160	[E]
0.000130974	1.471998589	0.48122818	RHE_CH01742	<i>phhA</i>	phenylalanine-4-hydroxylase protein	COG3186	[E]
0.00021542	1.04549934	0.233536078	RHE_CH00175	<i>ypch00062</i>	probable peptide ABC transporter, substrate-binding protein	COG4166	[E]
0.000235568	1.87580212	0.444351269	RHE_CH01770	<i>aldA</i>	alanine dehydrogenase protein	COG0686	[E]
0.000307881	0.584644049	0.226119451	RHE_CH03536	<i>ggt2</i>	gamma-glutamyltranspeptidase protein	COG0405	[E]
0.000335593	2.209707829	0.878861671	RHE_CH03974	<i>glnK</i>	nitrogen regulatory protein P-II	COG0347	[E]
0.000390351	1.012338912	0.4300145	RHE_CH03674	<i>yhch01083</i>	hypothetical conserved protein	COG2981	[E]
0.000452849	1.046727313	0.483210355	RHE_CH03964	<i>ypch01402</i>	putative amino acid ABC transporter, permease protein	COG0765	[E]
0.00048505	0.455012712	0.113754929	RHE_CH01775	<i>cysK2</i>	cysteine synthase protein	COG0031	[E]
0.000644367	0.510162405	0.071451774	RHE_PE00278	<i>ype00135</i>	probable branched-chain amino acid ABC transporter, permease protein	COG0559	[E]
0.00118765	0.325655411	0.17267327	RHE_CH02957	<i>carA</i>	carbamoyl-phosphate synthase small chain (glutamine-hydrolysing) protein	COG0505	[EF]
0.001205027	0.354120067	0.19172109	RHE_CH03662	<i>ypch01303</i>	probable spermidine/putrescine ABC transporter, permease protein	COG1176	[E]
0.001349955	0.399158868	0.092045495	RHE_CH01226	<i>ptrB</i>	protease II protein	COG1770	[E]
7.24E-05	0.635137579	0.207492353	RHE_CH03292	<i>dht</i>	dihydropyrimidinase protein	COG0044	[F]
0.0005474	1.099130016	0.476038913	RHE_CH02485	<i>iunH2</i>	inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase protein	COG1957	[F]
0.000882262	0.57483407	0.240502012	RHE_CH01428	<i>purF</i>	glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase protein	COG0034	[F]
0.000899661	1.501461516	0.69464514	RHE_CH00127	<i>yhch00030</i>	hypothetical conserved protein	COG0537	[FGR]
9.07E-05	0.993652417	0.320074071	RHE_CH03002	<i>ypch01044</i>	putative glucose dehydrogenase B protein	COG2133	[G]
0.000104726	1.285928054	0.436322787	RHE_PE00289	<i>ype00143</i>	probable sugar ABC transporter, substrate-binding protein	COG1879	[G]
0.000451762	0.803710945	0.309970508	RHE_CH03704	<i>ypch01327</i>	putative gluconolactonase protein	COG3386	[G]

0.000528759	0.54973779	0.2566416	RHE_CH03854	ypch01370 pseudogene	chemotaxis signal transduction protein	COG0477	[GEPR]
0.000809691	0.787063144	0.284304704	RHE_CH03644	ypch01290	probable sugar ABC transporter, substrate-binding protein	COG1879	[G]
0.001062393	0.92577633	0.333080007	RHE_CH02740	ypch00944	putative phosphoglycerate mutase protein	COG0406	[G]
0.001073026	1.152698722	0.525188731	RHE_PB00021	ypb00008	probable sugar ABC transporter, ATP-binding protein	COG3839	[G]
2.04E-07	2.700363188	0.345312489	RHE_CH01549	ypch00533	probable 3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase protein	COG2227	[H]
3.75E-05	1.633440861	0.216757088	RHE_PE00441	<i>nadA</i>	quinolinate synthetase A protein	COG0379	[H]
8.07E-06	1.497930775	0.254547902	RHE_CH01777	ypch00602	probable oxidoreductase protein	COG1028	[IQR]
1.07E-05	1.851063565	0.383775639	RHE_CH01047	ypch00346	probable 3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase protein	COG1028	[IQR]
3.02E-05	0.892153278	0.244253972	RHE_CH01943	yhch00562	hypothetical conserved protein	COG2867	[I]
6.95E-05	1.172611145	0.260336983	RHE_PD00250	ypd00048	probable oxidoreductase protein	COG1028	[IQR]
0.000156305	0.584352391	0.170202114	RHE_CH01388	<i>acpS</i>	holo-[acyl-carrier-protein] synthase protein	COG0736	[I]
0.000163661	1.362112121	0.505203093	RHE_CH04094	ypch01442	putative phosphatase protein	COG0671	[I]
0.000259691	1.563870927	0.64976975	RHE_CH03123	<i>bdhA</i>	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase protein	COG1028	[IQR]
0.000797678	0.323676571	0.157488787	RHE_CH00873	<i>ispE</i>	4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase protein	COG1947	[I]
0.00110474	1.294552082	0.634499662	RHE_PE00281	ype00138	putative 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase protein	COG2084	[I]
4.75E-07	1.183428251	0.148976154	RHE_CH01528	yhch00446	hypothetical conserved protein	COG2913	[J]
0.000309504	1.005699207	0.374699725	RHE_CH04109	ypch01448	probable RNA methyltransferase - sun protein	COG0144	[J]
0.000636796	1.37142198	0.494905531	RHE_CH03755	<i>hemK</i>	protoporphyrinogen oxidase (methyltransferase) protein	COG2890	[J]
0.000641519	0.965260252	0.296645109	RHE_CH00115	<i>rbfA</i>	ribosome binding factor A, rRNA processing protein	COG0858	[J]
0.000662363	1.068583689	0.463989108	RHE_CH03452	<i>trmU</i>	tRNA 5-methylaminomethyl-2-thiouridylate- methyltransferaseprotein	COG0482	[J]
0.001541872	0.657534078	0.357914695	RHE_CH02258	<i>tyrS</i>	tyrosyl-tRNA synthetase protein	COG0162	[J]
0.001550194	0.653669038	0.318167926	RHE_CH01449	<i>ksgA</i>	dimethyladenosine transferase (16S rRNA dimethylase) protein	COG0030	[J]
2.26E-06	1.112267009	0.118266865	RHE_PD00173	ypd00038	putative transcriptional regulator protein, AraC family	COG2207	[K]
1.17E-05	1.157333214	0.292431853	RHE_CH00966	ypch00313	putative transcriptional regulator protein	COG1678	[K]
2.71E-05	1.846028869	0.30674977	RHE_CH00560	<i>cspA1</i>	cold shock protein	COG1278	[K]
0.000171695	0.986601413	0.237247895	RHE_CH02950	<i>sigA</i>	RNA polymerase sigma factor protein (sigma-70)	COG0568	[K]
0.000322974	0.574701953	0.249851394	RHE_CH01772	ypch00601	putative acetyltransferase protein	COG0454	[KR]
0.000392267	1.245543161	0.506195608	RHE_PE00361	ype00185	probable transcriptional regulator protein, AraC family	COG2207	[K]
0.00050128	0.70020565	0.331810389	RHE_CH03153	ypch01098	probable transcriptional regulator protein, AraC family	COG2207	[K]
0.000699082	0.660704377	0.277489828	RHE_CH02969	<i>greA</i>	transcription elongation factor (transcript cleavage factor) protein	COG0782	[K]

0.000831034	1.094283384	0.549006835	RHE_CH02469	<i>ypch00830</i>	probable transcriptional regulator protein, AraC family	COG2207	[K]
0.000918434	0.435109419	0.2048199	RHE_CH03166	<i>gbpR</i>	transcriptional regulator protein, LysR family (possibly activator of the expression of <i>chvE</i> protein)	COG0583	[K]
0.001138365	0.959152086	0.512446053	RHE_PC00034	<i>yhc00011</i>	hypothetical conserved protein	COG3609	[K]
0.001364158	0.767911743	0.116760683	RHE_PF00163	<i>ypf00074</i>	probable transcriptional regulator protein	COG1802	[K]
0.000642817	1.22789516	0.591548133	RHE_PD00322	<i>yid00048</i>	probable insertion sequence transposase protein	COG3293	[L]
0.001279353	0.806711498	0.435333218	RHE_PE00209	<i>ype0104</i>	probable DNA topoisomerase I protein	COG3569	[L]
1.06E-07	1.788680591	0.166813026	RHE_CH01481	<i>ropB1</i>	outer membrane protein	COG3637	[M]
1.25E-06	2.222479543	0.393833132	RHE_CH02859	<i>ypch00980</i>	probable transglycosylase protein	COG0741	[M]
1.47E-06	0.820629805	0.158998384	RHE_PE00362	<i>yhe00120</i>	hypothetical conserved protein	COG0845	[M]
3.92E-06	1.336810847	0.098783291	RHE_CH03298	<i>ypch01148</i>	putative protein secretion protein, HlyD family	COG0845	[M]
4.27E-06	1.033884497	0.151988389	RHE_CH03971	<i>ypch01406</i>	putative outer membrane lipoproteins carrier protein	COG2834	[M]
1.27E-05	0.407483568	0.108517936	RHE_CH03349	<i>mexE1</i>	multidrug-efflux system secretion protein, HlyD family	COG0845	[M]
7.68E-05	1.062382956	0.346340764	RHE_CH03328	<i>pssA2</i>	exopolysaccharide production protein	COG2148	[M]
8.37E-05	1.509227357	0.264590923	RHE_CH02344	<i>ypch00764</i>	probable D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase protein	COG1686	[M]
0.000123827	1.253134033	0.326322128	RHE_CH03195	<i>ypch01111</i>	probable UDP-glucose 4-epimerase protein	COG0451	[MG]
0.000142009	1.307621568	0.256231391	RHE_CH02464	<i>ddlA</i>	D-alanine-D-alanine ligase protein	COG1181	[M]
0.000162315	1.358045526	0.35474933	RHE_CH03468	<i>sqdB</i>	sulfolipid (UDP-sulfoquinovose) biosynthesis protein	COG0451	[MG]
0.000271847	0.766581691	0.313041847	RHE_CH04121	<i>gidB</i>	glucose inhibited division protein B	COG0357	[M]
0.00027234	0.8088949	0.101925003	RHE_CH01368	<i>ypch00470</i>	probable aminotransferase protein (involved in cell wall biogenesis)	COG0399	[M]
0.000274174	1.233256477	0.284035028	RHE_CH01646	<i>amiC</i>	n-acetylmuramoyl-L-alanine amidase protein	COG0860	[M]
0.000369507	2.489424955	1.104362655	RHE_CH00306	<i>ypch00114</i>	probable rare lipoprotein A protein	COG0797	[M]
0.000383375	0.820638666	0.362706243	RHE_CH03561	<i>exoN</i>	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase protein	COG1210	[M]
0.000450818	0.666112836	0.225461621	RHE_CH03198	<i>ypch01114</i>	probable glycosyltransferase protein	COG0463	[M]
0.000584762	0.492767634	0.186241138	RHE_CH03461	<i>omp2</i>	outer membrane lipoprotein	COG2885	[M]
0.000600745	0.513359845	0.218105192	RHE_PE00292	<i>ype00146</i>	putative sugar isomerase protein	COG4952	[M]
0.000743321	0.486669205	0.208863158	RHE_CH03247	<i>lpsL</i>	UDP-glucuronic acid epimerase protein	COG0451	[MG]
0.000761414	0.336967984	0.164262413	RHE_CH03752	<i>ypch01343</i>	putative peptidase protein, M23/M37 family	COG0739	[M]
0.000228016	0.249050907	0.079151413	RHE_PD00058	<i>hrcQ</i>	type III secretion system translocation protein	COG1886	[NU]
5.91E-07	1.354104292	0.180882148	RHE_PB00110	<i>msrAb</i>	peptide methionine sulfoxide reductase protein	COG0225	[O]
2.37E-06	1.511825811	0.233422338	RHE_CH00048	<i>hslV</i>	heat shock protease HslVU, subunit HslV protein	COG5405	[O]

3.95E-05	1.241096159	0.200160405	RHE_CH00367	<i>hsp</i>	molecular chaperone small heat shock protein	COG0071	[O]
0.000102462	1.32821503	0.343179835	RHE_CH03571	<i>ibpA</i>	molecular chaperone small heat shock protein	COG0071	[O]
0.000163651	1.139701025	0.342212417	RHE_CH00049	<i>hslU</i>	heat shock protease HslVU, subunit HslU chaperone protein (ATP-dependent protease ATP-binding subunit hslU)	COG1220	[O]
0.000252882	0.89241247	0.363888877	RHE_CH03557	<i>ypch01256</i>	putative membrane protease subunit protein	COG0330	[O]
0.000293939	1.53834142	0.617555434	RHE_CH04110	<i>htpX2</i>	protease protein, heat-shock-like	COG0501	[O]
0.000301348	0.638350886	0.178945417	RHE_CH00387	<i>glnD</i>	[protein-PII] uridylyltransferase protein	COG2844	[O]
0.000333132	0.946338558	0.392190664	RHE_CH03690	<i>osmC</i>	osmotically inducible protein	COG1764	[O]
0.000339335	0.422078522	0.091135919	RHE_PC00075	<i>ypc00042</i>	probable stomatin-like protein	COG0330	[O]
0.000353159	1.096697307	0.199866211	RHE_CH01244	<i>ypch00423</i>	probable molecular chaperone small heat shock protein, hsp20 family	COG0071	[O]
0.000492812	1.222170132	0.310107658	RHE_CH00365	<i>grpE</i>	molecular chaperone heat shock protein (hsp-70)	COG0576	[O]
0.000586423	0.970983518	0.435817209	RHE_CH00145	<i>dnaK</i>	chaperone protein (Heat shock protein 70)	COG0443	[O]
0.000835985	0.835239511	0.314990887	RHE_CH01293	<i>degPch2</i>	serine protease DO-like protein	COG0265	[O]
0.000876212	0.723301822	0.193091977	RHE_CH03458	<i>fisH</i>	cell division metalloproteinase protein	COG0465	[O]
0.000899938	0.915031473	0.237340951	RHE_CH01247	<i>msrB</i>	peptide methionine sulfoxide reductase protein	COG0229	[O]
0.001024959	0.72296979	0.342794959	RHE_CH02570	<i>ypch00866</i>	probable serine protease protein, HtrA/DegQ family	COG0265	[O]
0.001069927	0.623880933	0.244322961	RHE_CH03069	<i>clpP3</i>	endopeptidase Clp, subunit 3 protein	COG0740	[OU]
0.001224534	0.788352126	0.122564155	RHE_CH03979	<i>trxA2</i>	thioredoxin protein	COG0526	[OC]
0.001555344	1.004648217	0.441001012	RHE_CH00879	<i>sohB</i>	protease protein	COG0616	[OU]
3.82E-07	1.607354064	0.184989588	RHE_CH00861	<i>kupch1</i>	potassium transporter protein	COG3158	[P]
2.35E-05	0.983974816	0.209102927	RHE_PE00257	<i>ype00126</i>	probable sulfate uptake ABC transporter, permease protein	COG4208	[P]
4.00E-05	0.880076191	0.252364363	RHE_CH02125	<i>afuB1</i>	iron(III) ABC transporter, permease protein	COG1178	[P]
0.000205395	0.67312074	0.265961483	RHE_CH03498	<i>ypch01237</i>	probable Na ⁺ /H ⁺ antiporter protein	COG3263	[P]
0.000404785	1.304623422	0.527224629	RHE_CH02126	<i>afuA1</i>	iron(III) ABC transporter, substrate-binding protein	COG1840	[P]
0.000669715	1.261207267	0.572342066	RHE_PC00167	<i>ypc00093</i>	probable aliphatic sulphonate ABC transporter, substrate-binding protein	COG0715	[P]
0.00089863	1.447304048	0.259671997	RHE_PE00259	<i>ype00128</i>	probable sulfate uptake ABC transporter, substrate-binding protein	COG1613	[P]
0.00129791	0.614789658	0.238445416	RHE_PC00019	<i>tauA</i>	probable taurine uptake ABC transporter, substrate-binding protein	COG4521	[P]
0.000473698	1.353476012	0.347045009	RHE_CH03938	<i>ypch01398</i>	putative ABC transporter, ATP-binding protein (involved in lysophospholipase L1 biosynthesis)	COG4181	[Q]
4.30E-06	1.801659077	0.383503385	RHE_CH01814	<i>exoR2</i>	exopolysaccharide production negative regulator protein	COG0790	[R]
4.85E-06	1.833923987	0.177609821	RHE_CH03631	<i>yhch01073</i>	hypothetical conserved protein	COG3683	[R]
3.07E-05	1.047793309	0.308368249	RHE_CH03052	<i>ypch01065</i>	putative methanol dehydrogenase regulator MoxR-like protein	COG0714	[R]
4.67E-05	0.408799367	0.13276492	RHE_CH04027	<i>ypch01423</i>	putative metalloprotease protein	COG4784	[R]

5.47E-05	0.947636185	0.236565902	RHE_CH00996	ypch00330	probable hydrolase protein	COG1011	[R]
7.01E-05	1.155602734	0.232471848	RHE_CH03628	ypch01282	putative acetyltransferase protein	COG3153	[R]
8.79E-05	0.499776482	0.168455283	RHE_CH03229	<i>prsD</i>	protease/lipase ABC transporter, ATP-binding and permease protein	COG4618	[R]
9.72E-05	0.615136803	0.066639771	RHE_CH00874	yhch00210	hypothetical conserved protein	COG0457	[R]
0.000105517	1.125518497	0.184101399	RHE_CH02100	ypch00690	putative signal peptide protein	COG5342	[R]
0.000117249	0.375060485	0.117131926	RHE_CH03528	ypch01247	putative transporter, permease protein	COG0730	[R]
0.00013236	1.327628524	0.149830481	RHE_CH01250	yhch00365	hypothetical conserved protein	COG2166	[R]
0.000145753	0.800845904	0.225800987	RHE_CH03978	<i>lonD</i>	ATP-dependent protease LA 2 protein	COG2802	[R]
0.000163535	1.368281568	0.513943985	RHE_CH02276	yhch00673	hypothetical conserved protein	COG3545	[R]
0.000171249	0.920488531	0.225761	RHE_CH02072	yhch00612	hypothetical conserved protein	COG3729	[R]
0.000193943	0.648012574	0.122883802	RHE_CH03831	ypch01362	probable cobalamin synthesis protein	COG0523	[R]
0.000239543	1.40691911	0.439992465	RHE_PF00368	yhff00115	hypothetical conserved protein	COG0693	[R]
0.000263189	0.82375251	0.117481358	RHE_CH03812	<i>glbB</i>	hydroxyacylglutathione hydrolase protein	COG0491	[R]
0.000431582	0.452261579	0.155074198	RHE_CH02189	ypch00717	putative permease protein	COG0628	[R]
0.00044607	0.924020409	0.324545465	RHE_CH03878	ypch01380	putative acyltransferase protein	COG3176	[R]
0.000462638	0.791489089	0.153853764	RHE_CH02331	yhch00687	hypothetical conserved protein	COG3106	[R]
0.000578175	0.801345244	0.329313666	RHE_CH02968	yhch00893	hypothetical conserved protein	COG4277	[R]
0.000611751	1.397149089	0.607142197	RHE_CH03632	ypch01285	putative nickel ABC transporter, permease protein	COG2215	[R]
0.001267203	0.539864116	0.221632263	RHE_CH03929	ypch01395	putative ABC transporter, substrate-binding protein	COG2984	[R]
0.001321657	0.660645908	0.303290673	RHE_CH02435	ypch00813	putative inosine-5'-monophosphate dehydrogenase protein	COG0517	[R]
0.001445986	0.945868613	0.484550715	RHE_PE00002	yje00002	hypothetical conserved protein	COG0670	[R]
7.65E-09	1.431456736	0.124351982	RHE_CH00824	yhch00198	hypothetical conserved membrane protein	COG2259	[S]
2.92E-08	3.186790877	0.319506564	RHE_CH00594	yhch00147	hypothetical conserved membrane protein	COG5572	[S]
2.12E-07	0.731889981	0.09162147	RHE_CH02662	yhch00802	hypothetical conserved protein	COG5552	[S]
5.52E-07	1.898148464	0.259297933	RHE_CH03432	yhch01019	hypothetical conserved protein	COG3181	[S]
9.54E-06	0.968131966	0.20850194	RHE_CH02943	yhch00886	hypothetical conserved protein	COG2343	[S]
1.16E-05	2.025085878	0.319649963	RHE_PE00320	yje00112	hypothetical conserved protein	COG5579	[S]
2.37E-05	1.168871241	0.223941774	RHE_CH00008	ypch00002	putative translocase transmembrane protein	COG4395	[S]
2.56E-05	0.780297389	0.151181417	RHE_CH02332	yhch00688	hypothetical conserved membrane protein	COG3768	[S]
2.64E-05	0.874094933	0.229882726	RHE_CH01507	ypch00520	putative peptidoglycan binding protein (involved in cell wall degradation)	COG2989	[S]
3.56E-05	1.507096071	0.312126211	RHE_PB00141	yh000025	hypothetical conserved protein	COG4395	[S]
7.93E-05	0.802532989	0.172623492	RHE_CH03121	yhch00938	hypothetical conserved protein	COG3795	[S]
8.46E-05	0.583555291	0.178096776	RHE_CH04013	yhch01153	hypothetical conserved protein	COG5255	[S]

9.19E-05	1.063904407	0.322047569	RHE_CH02551	yhch00752	hypothetical conserved protein	COG5267	[S]
0.000105403	0.597124321	0.218984559	RHE_CH00401	yhch00091	hypothetical conserved protein	COG5375	[S]
0.000111595	0.560250028	0.193679767	RHE_PE00053	yhe00017	hypothetical conserved protein	COG3791	[S]
0.000115073	1.913756478	0.206152168	RHE_CH02832	<i>creA</i>	CreA protein	COG3045	[S]
0.000117577	1.689467782	0.169779302	RHE_CH03070	yhch00923	hypothetical conserved protein	COG3416	[S]
0.000126727	1.022554098	0.269478333	RHE_CH03933	yhch01139	hypothetical conserved protein	COG3339	[S]
0.000134726	0.658727802	0.221717461	RHE_CH03813	yhch01106	hypothetical conserved protein	COG3542	[S]
0.000144132	1.051293159	0.321596649	RHE_CH03581	yhch01062	hypothetical conserved protein	COG2899	[S]
0.000188683	0.64315868	0.188852163	RHE_CH01859	yhch00541	hypothetical conserved protein	COG3811	[S]
0.000240541	1.006514867	0.322493989	RHE_CH03337	yhch00997	hypothetical conserved protein	COG5400	[S]
0.00033324	0.820538113	0.294756318	RHE_CH02626	<i>ftsZl</i>	cell division protein	COG1808	[S]
0.000336197	0.899406819	0.341688948	RHE_CH02247	yhch00663	hypothetical conserved protein	COG0316	[S]
0.000343495	1.038270496	0.33665657	RHE_CH03484	yhch01029	hypothetical conserved protein	COG2318	[S]
0.000345752	1.266486238	0.545635866	RHE_CH02101	yhch00617	hypothetical conserved protein	COG3785	[S]
0.00034584	0.797896365	0.298754792	RHE_CH03634	yhch01074	hypothetical conserved protein	COG2979	[S]
0.0003724	0.750006079	0.334168184	RHE_CH02550	yhch00751	hypothetical conserved protein	COG4102	[S]
0.000423542	0.833685855	0.331921887	RHE_CH02591	yhch00773	hypothetical conserved protein	COG3865	[S]
0.000441069	1.062032097	0.155387677	RHE_CH03460	yhch01024	hypothetical conserved protein	COG1729	[S]
0.000537371	0.588513499	0.161730501	RHE_CH02949	yhch00889	hypothetical conserved protein	COG4274	[S]
0.000550079	0.455622284	0.198038467	RHE_PE00437	yhe00141	hypothetical conserved protein	COG1944	[S]
0.000564433	0.531148622	0.180156058	RHE_CH03109	yhch00934	hypothetical conserved protein	COG4649	[S]
0.000632596	1.082093961	0.512318583	RHE_CH03051	yhch00917	hypothetical conserved protein	COG3816	[S]
0.0006427	0.678495135	0.272692795	RHE_CH02663	yhch00803	hypothetical conserved protein	COG1917	[S]
0.000643714	1.562916832	0.658388117	RHE_CH03017	yhch00906	hypothetical conserved protein	COG2960	[S]
0.000656044	0.999323989	0.244231463	RHE_CH03804	yhch01104	hypothetical conserved protein	COG1434	[S]
0.000780618	0.763670564	0.383764167	RHE_CH03291	yhch00988	hypothetical conserved protein	COG2852	[S]
0.000827225	0.738819211	0.279124702	RHE_PC00203	yhe00051	hypothetical conserved protein	COG2326	[S]
0.000834333	0.393269606	0.179873756	RHE_CH02559	yhch00756	hypothetical conserved protein	COG4312	[S]
0.000867856	0.895955755	0.464329802	RHE_CH02275	yhch00672	hypothetical conserved membrane protein	COG5473	[S]
0.001122834	1.341882116	0.330121197	RHE_CH02778	yhch00835	hypothetical conserved protein	COG4315	[S]
5.67E-07	1.659222764	0.153045622	RHE_CH03009	ypch01048	probable two-component sensor histidine kinase protein	COG0642	[T]
4.58E-06	1.484942133	0.183220975	RHE_CH03010	ypch01049	probable two-component response regulator protein	COG0745	[TK]
6.63E-05	1.443895147	0.440741861	RHE_CH02817	ypch00971	putative serine protein kinase protein	COG2766	[T]

7.32E-05	1.266700918	0.416311279	RHE_CH03714	<i>cyaG2</i>	adenylate cyclase protein	COG2114	[T]
0.000106592	0.385235527	0.137495224	RHE_CH01385	<i>relA</i>	guanosine-3',5'-bis(diphosphate) 3'-pyrophosphohydrolyase protein	COG0317	[TK]
0.000388618	1.091604912	0.269569938	RHE_CH00583	<i>ypch00211</i>	putative arsenate reductase (phosphatase) protein	COG0394	[T]
0.000856569	0.557027697	0.210089969	RHE_CH01948	<i>ntrC</i>	nitrogen regulation (two-component response regulator) protein	COG2204	[T]
3.59E-05	1.116141195	0.294233882	RHE_CH03465	<i>tolR</i>	protein transporter protein	COG0848	[U]
4.05E-05	1.142569518	0.173933199	RHE_CH00437	<i>ypch00163</i>	putative inner membrane transmembrane protein	COG0706	[U]
7.27E-05	1.454974371	0.326440352	RHE_CH03462	<i>tolB</i>	protein transporter protein	COG0823	[U]
0.000260816	1.114350353	0.148611164	RHE_CH03466	<i>tolQ</i>	protein transporter protein	COG0811	[U]
0.000508839	0.561085057	0.240973253	RHE_PE00306	<i>pilQ</i>	cpaC pilus assembly Q protein	COG4964	[U]
0.000826293	0.605384773	0.22241661	RHE_CH03770	<i>secA</i>	protein-export translocase protein	COG0653	[U]
0.001215274	0.794710954	0.195631948	RHE_CH03953	<i>ftsY</i>	cell division protein	COG0552	[U]
4.85E-07	1.381955541	0.151082771	RHE_CH03299	<i>ypch01149</i>	probable acriflavin resistance protein (transporter protein)	COG0841	[V]
3.64E-05	1.095203084	0.314824409	RHE_CH03199	<i>ypch01115</i>	putative surface saccharide ABC transporter, ATP-binding and permease protein	COG1132	[V]
4.95E-05	1.286962127	0.384569126	RHE_CH02980	<i>ypch01035</i>	probable antibiotic resistance (streptomycin kinase) protein	COG3570	[V]
0.000226892	0.846310877	0.177232588	RHE_CH02451	<i>hndJ</i>	multidrug ABC transporter, permease protein	COG0842	[V]
0.000755719	0.720511094	0.237320305	RHE_CH03042	<i>ypch01061</i>	probable ABC transporter, ATP-binding protein	COG1132	[V]
2.09E-08	1.572759635	0.128157573	RHE_PC00121	<i>yh00032</i>	hypothetical conserved protein		
5.08E-07	1.294680436	0.190634239	RHE_CH03798	<i>yh01102</i>	hypothetical conserved protein		
6.11E-07	0.971481208	0.152679974	RHE_CH03931	<i>yh01138</i>	hypothetical conserved protein		
6.70E-07	1.109657083	0.175523349	RHE_CH02191	<i>yh00636</i>	hypothetical conserved protein		
1.32E-06	2.576611557	0.396564807	RHE_CH03000	<i>yh00900</i>	hypothetical conserved protein		
2.76E-06	1.61460578	0.161686278	RHE_CH03405	<i>yh01012</i>	hypothetical conserved protein		
8.45E-06	2.00059609	0.2205467	RHE_PE00018	<i>yh00007</i>	hypothetical conserved protein		
9.23E-06	1.145655148	0.133499215	RHE_CH00180	<i>yh00037</i>	hypothetical protein		
1.18E-05	1.354567854	0.17869647	RHE_CH01524	<i>yh00445</i>	hypothetical conserved protein		
1.35E-05	1.84728479	0.491478181	RHE_CH03001	<i>yh00901</i>	hypothetical conserved protein		
1.40E-05	0.794409591	0.206266114	RHE_PD00192	<i>ypd00041</i>	probable carbonic anhydrase protein		
2.31E-05	1.405763978	0.305251334	RHE_CH03147	<i>yh00949</i>	hypothetical protein		
2.43E-05	1.093393362	0.173571523	RHE_CH02131	<i>yh00624</i>	hypothetical protein		
2.69E-05	1.184644067	0.02786997	RHE_CH00833	<i>yh00201</i>	hypothetical conserved protein		
2.83E-05	1.174404415	0.343310193	RHE_CH03041	<i>yh00913</i>	hypothetical conserved protein		

3.68E-05	2.1887733	0.277935419	RHE_CH02664	yhch00804	hypothetical conserved protein
3.71E-05	1.187054736	0.290148125	RHE_CH03128	yhch00939	hypothetical conserved protein
3.94E-05	2.226232549	0.620960255	RHE_CH00018	yhch00004	hypothetical conserved protein
4.33E-05	1.512690626	0.451733791	RHE_CH04089	yhch01173	hypothetical conserved protein
4.41E-05	1.025517742	0.315533673	RHE_CH03054	yhch00919	hypothetical conserved protein
4.64E-05	0.925578715	0.216597118	RHE_PD00237	yh000086	hypothetical protein
4.86E-05	1.321182564	0.333782498	RHE_CH01227	yhch00357	hypothetical conserved protein
4.88E-05	1.067732339	0.341554182	RHE_CH03233	<i>pssP</i>	exopolysaccharide polymerization protein
6.18E-05	0.355518601	0.10358947	RHE_CH00510	<i>pstC</i>	phosphate ABC transporter, permease protein
6.32E-05	2.613478197	0.436072494	RHE_CH00223	yhch00046	hypothetical conserved protein
7.17E-05	0.890412181	0.289980493	RHE_Pf00494	yh00145	hypothetical protein
7.30E-05	1.328438887	0.188345268	RHE_PD00077	yh000038	hypothetical protein
7.48E-05	1.319991417	0.375550133	RHE_CH00827	yhch00200	hypothetical protein
7.67E-05	0.974443133	0.244901991	RHE_CH03579	yhch01060	hypothetical protein
7.74E-05	0.714875793	0.179872889	RHE_CH01653	yhch00484	hypothetical protein
7.81E-05	0.974296505	0.344277791	RHE_PB00014	yhb00004	hypothetical conserved protein
9.78E-05	1.042369477	0.255922706	RHE_PE00164	yhe00060	hypothetical conserved protein
0.000101337	1.958933491	0.704604075	RHE_PC00155	yh000039	hypothetical conserved protein
0.000116522	0.727365194	0.122173658	RHE_CH03404	yhch01011	hypothetical conserved protein
0.000140159	2.080342451	0.11792471	RHE_PE00321	yhe00113	hypothetical protein
0.000140613	0.614589659	0.237847331	RHE_CH01959	yhch00564	hypothetical conserved protein
0.000142207	1.346902061	0.503354721	RHE_CH01981	ypch00640	probable 2-methylcitrate dehydratase protein
0.000160397	1.690935451	0.458428826	RHE_CH02021	yhch00600	hypothetical conserved protein
0.00019229	2.273561777	0.807015628	RHE_CH02606	<i>plyA2</i>	polysaccharidase protein
0.000199708	0.463085234	0.152141386	RHE_CH01972	yhch00569	hypothetical protein
0.000229272	1.372134045	0.573088685	RHE_CH03855	<i>fidS</i>	NAD-dependent formate dehydrogenase, delta subunit protein
0.00023038	0.72431989	0.189309262	RHE_CH00770	<i>nlpE2</i>	lipopolysaccharide biosynthesis protein
0.000243054	1.222429704	0.400865321	RHE_CH03007	ypch01046	probable short-chain dehydrogenase protein
0.000249102	1.440082816	0.548246444	RHE_CH02018	yhch00597	hypothetical protein
0.000258572	1.537055139	0.398032811	RHE_CH00936	yhch00229	hypothetical conserved protein
0.000259318	1.832452958	0.377182907	RHE_PE00253	yhe00093	hypothetical conserved protein
0.000274184	0.947458691	0.404566481	RHE_CH01778	yhch00509	hypothetical protein
0.000281862	0.95298176	0.387458594	RHE_CH02463	yhch00720	hypothetical conserved protein
0.000282879	1.063976715	0.363235664	RHE_PE00108	ype00047 pseudogene	hypothetical conserved protein

0.000288892	0.957370757	0.177199554	RHE_CH032225	<i>pssD</i>	glucuronosyltransferase protein
0.000297745	0.380567489	0.108604838	RHE_PB00027	<i>ypb00012</i>	putative class II aminoacyl t-RNA synthetase domain protein
0.000330401	0.881901988	0.121297584	RHE_CH00434	<i>yhch00099</i>	hypothetical conserved protein
0.000331662	0.292697722	0.113150602	RHE_CH01016	<i>yhch00258</i>	hypothetical conserved protein
0.000349762	1.387575795	0.474904072	RHE_CH03278	<i>ypch01135</i>	probable dihydroorotate oxidase protein
0.000363433	0.878282016	0.364979336	RHE_PE00151	<i>yje00051</i>	hypothetical conserved protein
0.00038611	1.084241847	0.351382819	RHE_CH03045	<i>yhch00914</i>	hypothetical conserved protein
0.000429694	1.141578365	0.156623374	RHE_CH03464	<i>tola</i>	probable signal peptide protein
0.00049464	0.813888012	0.140398306	RHE_CH00543	<i>yhch00129</i>	hypothetical conserved protein
0.000506023	0.754102983	0.318713617	RHE_PB00013	<i>yhb00003</i>	hypothetical protein
0.000520622	0.772946003	0.318751929	RHE_CH02511	<i>ypch00844</i>	putative cytochrome c-like protein
0.000549732	0.660932704	0.298693563	RHE_CH02118	<i>ypch00693</i>	putative acetyltransferase protein
0.000605621	0.683420229	0.257773757	RHE_CH03343	<i>yhch01000</i>	hypothetical conserved protein
0.000694164	1.733438115	0.799442651	RHE_CH01978	<i>yhch00572</i>	hypothetical conserved protein
0.000706199	1.059004106	0.271062751	RHE_CH02971	<i>dctA</i>	C4-dicarboxylate transporter protein
0.00071433	1.181468864	0.197211949	RHE_CH00615	<i>ypch00220</i>	probable polysaccharidase protein
0.000773297	1.040440412	0.51741171	RHE_CH01805	<i>yhch00520</i>	hypothetical conserved protein
0.000777901	1.422905304	0.723606004	RHE_CH01980	<i>ypch00639</i>	putative hydrolase protein
0.000794111	1.301901995	0.440740184	RHE_PE00252	<i>ype00123</i>	putative ATP-dependent DNA ligase protein
0.00080453	0.545138266	0.083865383	RHE_CH01806	<i>yhch00521</i>	hypothetical protein
0.000816398	1.049086616	0.134960906	RHE_CH01739	<i>yhch00497</i>	hypothetical protein
0.000904081	0.865849988	0.267254621	RHE_CH00044	<i>yhch00008</i>	hypothetical protein
0.000929978	0.383776722	0.171963611	RHE_CH01843	<i>yhch00535</i>	hypothetical protein
0.000939514	0.273537977	0.104630488	RHE_CH02923	<i>yhch00869</i>	hypothetical protein
0.000958656	1.077460151	0.267085482	RHE_CH02686	<i>yhch00810</i>	hypothetical conserved protein
0.000999044	0.839994024	0.30205677	RHE_CH01803	<i>yhch00519</i>	hypothetical conserved protein
0.001031512	0.567175256	0.21699266	RHE_CH02937	<i>yhch00881</i>	hypothetical conserved protein
0.001098185	0.863423418	0.435782166	RHE_CH00335	<i>ypch00128</i>	putative protein transport protein
0.001121687	0.666392307	0.319558404	RHE_Pf00103	<i>yhf00037</i>	hypothetical protein
0.0011563	0.729081368	0.191249636	RHE_CH03513	<i>yhch01042</i>	hypothetical conserved protein
0.001432862	1.272522128	0.4692579	RHE_PC00154	<i>mctP</i>	monocarboxylic acid permease protein
0.001461495	0.665226749	0.332820086	RHE_CH02912	<i>yhch00863</i>	hypothetical conserved protein

1.2.2 Transcriptoma de SA-SAT.

1.2.2.1 Genes que se sobre-expresaron más en SA que en SAT (Tabla 5).

Producción y conversión de energía (C). La cepa *R. etli* CE3 en SA comparado con SAT elevó la transcripción de 3 NADH-ubiquinona oxidoreductasas, *nuoD1*, *nuoE2*, el gen ypch01347 ID RHE_CH03731, una proteína hipotética citocromo c ypch00883 RHE_CH02618), una probable deshidrogenasa anaeróbica ypch00513 RHE_CH01484, así como una transhidrogenasa *pntA2* que convierte NAD a NADP, probablemente durante el metabolismo fermentativo la disminución del flujo de carbono en el ciclo de las pentosas disminuya la síntesis de NADP y alternativamente su obtención a partir de NAD sea un mecanismo compensatorio de la cepa *R. etli* CE3.

Transporte y metabolismo de aminoácidos (E). En SA comparado con SAT, la cepa *R. etli* CE3 elevó la transcripción de la proteína PII, *glnK*, cuya participación es en la regulación del nitrógeno, que en estado uridilado promueve la desadenilación de la glutamino sintetasa para incrementar la actividad enzimática, y sin uridilación en presencia de glutamina promueve la adenilación de ésta enzima para inactivarla. El gen *thiO* para la síntesis de la tiamina. Así mismo, el gen *hisF* que genera AICAR-P del cual se sintetiza purina e histidina y *hisCch3* que genera histidinol fosfato en la biosíntesis de histidina, estos dos genes están funcionalmente relacionados desde que el sustrato inicial de la vía de síntesis de purinas e histidina es el fosforibosil pirofosfato. Además, los genes *hisCch3*, *aroF* y *dada* importantes en el metabolismo de aminoácidos aromáticos. La síntesis de aminoácidos aromáticos es dependiente de tiamina de manera indirecta, ya que la síntesis de la eritrosa 4P se sintetiza en la vía de las pentosas fosfato mediante la actividad de la transcetolasa dependiente de TPP (Fig. 5). Datos de este proyecto mostraron que los niveles de TPP en la cepa *R. etli* CE3 cultivada en SA es menor con relación a SAB, lo que supone una limitación de aminoácidos aromáticos en SA con relación a SAT. Adicionalmente, fueron sobre-expresados 2 transportadores tipo ABC para aminoácidos y oligopéptidos, ypch01083 RHE_CH01727 una probable deshidrogenasa y yhch01083 RHE_CH03674 una proteína hipotética conservada.

Metabolismo de nucleótidos y transporte (F). En la cepa *R. etli* CE3 en SA comparada con SAT, se elevó la transcripción del gen *ndk*, para la proteína nucleósido difosfato quinasa que participa en la conversión reversible de ADP a ATP, de ITP a IDP en el metabolismo de las purinas, de igual manera de UTP a UDP y CTP a CDP en el metabolismo de las pirimidinas, el gen *add*, que convierte adenina en adenosina y *guaA2* que es una GMP sintasa- glutamina amidotransferasa.

Metabolismo y transporte de carbohidratos (G). La cepa *R. etli* CE3 en SA en contraste con SAT sobre-expresó 2 probables transportadores, *mocBch1* para el transporte de rizopinas los cuales son fuentes de carbono que se encuentran en la rizósfera, así como dos transportadores probables uno de azúcar tipo ABC ypc00052 RHE_PC00102 y ype00015 RHE_PE00031.

Metabolismo y transporte de coenzimas (H). La cepa *R. etli* CE3 en SA comparada con SAT, elevó la transcripción de 3 genes para la síntesis de la tiamina, *thiC*, *thiG* y *thEb*, así como *thiO* (ver arriba). Estos datos correlacionan con los niveles de fusiones transcripcionales en genes *thi* (Taboada *et al.*, 2008), se sabe que la cepa *R. etli* CE3 en SA se encuentra limitada de tiamina con respecto a SAB o SAT, aparentemente la respuesta metabólica de la bacteria consistió en elevar la transcripción de estos genes para sintetizar más tiamina.

Metabolismo y transporte de lípidos (I). *R. etli* CE3 en SA con respecto a SAT elevó la transcripción del gen para la síntesis de isoprenoides *gcpE*, una fosfatasa hipotética, el gen *acpS* importante en la síntesis de CoA así como de pantotenato, de acuerdo con este dato, Encarnación *et al* en este laboratorio demostraron que la suplementación con 40 ug de pantotenato al SA estimuló el crecimiento de la cepa *R. etli* CE3 durante los subcultivos (datos no publicados). La vía de la síntesis de pantotenato requiere de 2 moléculas de piruvato y la enzima acetaldehído transferasa (descarboxiladora) dependiente de TPP para la generación de acetolactato, el cual en dos reacciones enzimáticas posteriores produce α -ketoisovalerato, el cual es precursor común para la síntesis del pantotenato y del aminoácido valina, es decir que se requiere tiamina para la síntesis de pantotenato, el cual es precursor de la síntesis de CoA (Fig. 7)

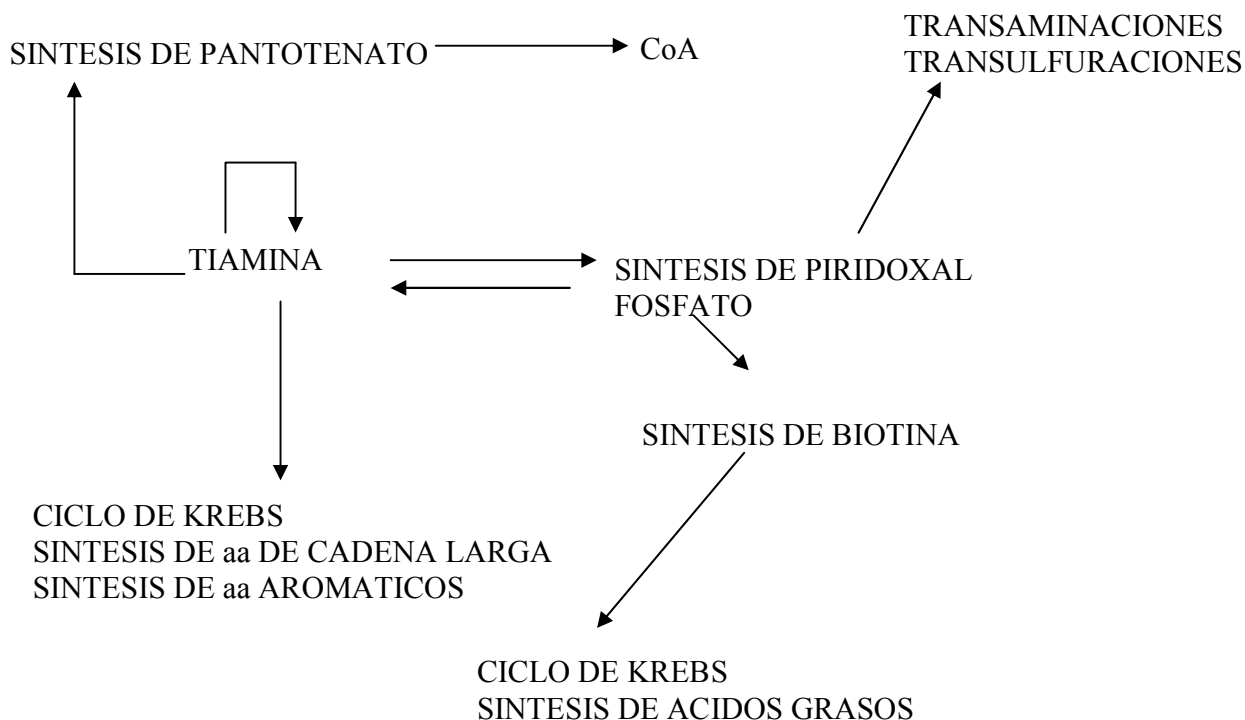


Figura 4 La tiamina está relacionada con distintas vías metabólicas.

(El papel de la tiamina es central ya que está interrelacionado con distintas vías metabólicas, tales como; El ciclo de Krebs, síntesis de aminoácidos, la síntesis de CoA, de manera indirecta con la síntesis de la biotina, así mismo, la síntesis de tiamina depende de tiamina, la cantidad de tiamina regula su propia síntesis, adicionalmente la síntesis del piridoxal fosfato depende de tiamina). (<http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00770.html>; Kanehisa *et al.*, 2008). Es importante saber si la CoA es limitante en SA, desde que se requiere TPP para su síntesis, así como para la generación de acetil-CoA mediante la actividad de la PDH.. De igual manera se incrementó la transcripción del gen ypch00346 RHE_CH01047 que codifica para una probable proteína que participa en la síntesis de ácidos grasos, y la fosfatasa ypch01442 RHE_CH04094. Además de la D-β-hidroxiacetil-CoA deshidrogenasa *bdhA* para la síntesis de PHB, que sabemos que este polímero de reserva de poder reductor y de carbono se sintetiza y se acumula en SA a diferencia de SAT o SAB donde se sintetiza pero no se acumula.

Traducción, estructura ribosomal y biogénesis (J). La cepa *R. etli* CE3 en SA comparada con SAT elevó la transcripción de *rbfA*, para un factor A de unión a ribosoma, que se asocia con la subunidad ribosomal 30S y es esencial para un procesamiento eficiente del ARNr 16S. Así como *rspO*, que codifica para la proteína ribosomal 30S, a las 10 horas del segundo subcultivo la bacteria está dejando de crecer, se encuentra en fase pre-estacionaria, no hay una razón aparente del incremento de la síntesis de ribosomas en SA, si bien, se sabe que en el metabolismo fermentativo la bacteria sintetiza proteínas específicas de este metabolismo (Encarnación *et al.*, 2003).

Transcripción (K). La cepa *R. etli* CE3 en SA comparada con SAT sobre-expresó los probables reguladores transcripcionales ype00185 RHE_PE00361 y ype00223 RHE_PE00434, así como una proteína de estrés por frío *cspA4*, es interesante que solo 2 reguladores transcripcionales fueron sobre-expresados en ésta comparación, en contraste en el transcriptoma SA-SAB, en el que en SA fueron sobre-expresados 6 reguladores transcripcionales y dos factores sigma, en contraste en SAB fueron 7 reguladores transcripcionales y un factor sigma, estos datos sugieren que existen mas diferencias en la regulación entre las condiciones SA-SAB que en las condiciones SA-SAT.

Replicación recombinación y reparación (L). La cepa *R. etli* CE3 en SA con relación a SAT, incrementó los niveles de mRNA de una secuencia de inserción, yid-00044 RHE_PD00313, una probable desoxirribonucleasa, ypch00716 RHE_CH02156 y la helicasa dependiente de ATP *mgpS*, probablemente la topología del ADN sea distinta entre estas condiciones metabólicas.

Biogénesis de pared celular, membrana y envoltura celular (M). En la cepa *R. etli* CE3 en SA con respecto a SAT se sobre-expresaron 3 glicosiltransferasas, *redB*, *pssS*, *pssG*, una probable UDP glucosa 4-epimerasa ypch01111 RHE_CH03195 y una probable poligalacturonasa ypf00145 RHE_PF00294, probablemente la agregación celular conlleve la síntesis de polisacárido, es importante que el poco carbono gluconeogénico podría estar

siendo utilizado preferencialmente para la síntesis de polizacárido con relación a la síntesis de las vitaminas en SA.

Quimiotaxis (NT). En la cepa *R. etli* CE3 en SA con respecto a SAT sobre-expresó el gen *cheBche2*, que es una proteína quimiotaxis metil esterasa específica, es posible que este relacionada con la agregación celular.

Modificación después de la traducción, recambio de proteínas y chaperonas (O). La cepa *R. etli* CE3 en SA comparada con SAT sobre-expresó el gen *ccsA*, relacionado con la biogénesis del citocromo c, ésta es una proteína transmembranal conocida como proteínas de intercambio de disulfuro, así como una probable chaperona de estrés por calor ypch00423 RHE_CH01244, se sabe que las células de SA son mas resistentes a los estreses que en SA con vitaminas.

Transporte y metabolismo de iones inorgánicos (P). La cepa *R. etli* CE3 elevó la transcripción en SA comparado con SAT los genes para el transporte de potasio *kupch1*, para la sulfito reductasa *cobG* que participa en la vía de síntesis de la vitamina B12, ésta vitamina es un cofactor de enzimas que insertan cobalto en las proteínas, como la nitrogenasa, en condiciones microaeróbicas, tales como la agregación celular de SA, así como 2 transportadores ABC para nitrato-sulfonato-bicarbonato.

Biosíntesis transporte y catabolismo de metabolitos secundarios (Q). La cepa *R. etli* CE3 sobre-expresó en SA comparado con SAT el gen putativo RHE_CH03938 que codifica para una proteína que une ATP de un transportador tipo ABC relacionada con la biosíntesis de lisofosfolipasa L1, ésta proteína tiene un dominio que pertenece a una familia de exportadores, probablemente tenga una función en el metabolismo fermentativo.

Genes con predicción de la función (R). La cepa *R. etli* CE3 en SA comparado con SAT sobre-expresó el gen *gloB* para la síntesis de D-lactato a partir de (R)-S-lactoil-glutación, la proteasa *lonD*, el gen yhch01046 RHE_CH03534 para una proteína ribosomal 50S L36, el gen ypch00709 RHE_CH02155 que es una probable hidrolasa así como ypch00255 RHE_CH00755 para una proteína híbrida glicosil-metiltransferasa.

Función desconocida (S). La cepa *R. etli* CE3 en SA comparado con SAT elevó la transcripción de 11 genes.

Transducción de señales (T). La cepa *R. etli* CE3 sobre-expresó en SA comparado con SAT, el gen *cyaG2* cuya proteína es para la síntesis del AMPc, que en *E. coli* es el coactivador de la proteína CRP, la cual en *Rhizobium* no se ha reportado, es interesante que en la comparación SA-SAB fue en SAB donde este gen se sobre-expresó, lo que sugiere que los genes no son específicos para una condición y que depende qué condiciones de cultivo se analizan en el transcriptoma, las necesidades metabólicas son las que van a determinar en la bacteria en cual condición se sobre transcribe determinado gen, es decir que la elevación de la transcripción de un gen no es exclusiva de una condición, en este trabajo, *cyaG2* es uno de varios ejemplos.

En SA comparado con SAT se sobre-transcribió *dksA* que codifica para una proteína supresora de *dnaK*, la proteína *dnaK* es una chaperona de la familia hsp70, en *A. tumefaciens* se reportó que ésta chaperona favorece el incremento de la actividad de *rpoH* (σ^{32}), que es el factor de transcripción de estrés por calor (Nakahigashi *et al.*, 2001), además, el gen putativo ypch00211 RHE_CH00583 para la arsenato reductasa, así como un gen para el transporte de drogas múltiple ypch00061 RHE_CH00171, relacionados con la resistencia a estreses en SA comparado con SAT.

Proteínas hipotéticas. La cepa *R. etli* CE3 sobre-expresó en SA comparado con SAT 22 genes, entre estos se encontró el gen *rbsCch1*, para el transporte de ribosa, es importante que sobre-expresó un transportador de ribosa, probablemente porque la vía de las pentosas fosfato no está siendo eficiente en SA comparado con SAT.

1.2.2.2 Genes que se sobre-expresaron más en SAT que en SA (Tabla 6).

Producción y conversión de energía (C). La cepa *R. etli* CE3 en SAT comparado con SA elevó la transcripción de genes para el ensamblado del citocromo *cbb3*, tales como; *fixGd* y *fixGf*, así como genes para la síntesis del citocromo *cbb3*, *fixOd*, *fixPd*, el gen para la fumarato hidratasa *fumC* del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, el gen *azuPd* para la proteína pseudoazurin que contiene cobre y una oxidoreductasa putativa ypch00496 RHE_CH01441. Es notable que la respiración en SAT sea semejante a SA de la comparación SA-SAB. Es muy probable que en SAT el nivel de *cbb3* sea muy alto comparado con SA en la comparación SA-SAT, ya que se sabe que el citocromo *cbb3* está presente en MM (datos no mostrados). Debido probablemente a que en SAT hay un poco de agregación celular, lo que provoca la disminución de la difusión del oxígeno y estimula la transcripción de estos genes que responden a condiciones microaeróbicas.

Ciclo celular, división celular y partición del cromosoma (D). La cepa *R. etli* CE3 en SAT en contraste con SA sobre-expresó el gen *bglSf* para la β -glucosidasa que convierte 1 4- β -D-glucanos a β -D-glucosa en el metabolismo de la sacarosa y almidón.

Transporte y metabolismo de aminoácidos (E). La cepa *R. etli* CE3 en SAT comparado con SA presentó niveles de mRNA más altos de *nifSch* para la incorporación de azufre en las moléculas mediante la reacción de transulfuración. Así mismo se incrementó el gen *vbsL*, que participa en la vía de biosíntesis de metionina, el gen *dapAfl* (Fig. 4), cuya proteína toma L-aspartato 4-semialdehído que proviene de la homoserina y sintetiza L-2-3-dihidropicolinato el cual es intermediario en la vía de síntesis de la L-lisina (Fig. 4). Es relevante que para la síntesis de metionina se requiere la homoserina y que datos de este trabajo mostraron que ésta a su vez estimula el crecimiento de la cepa *R. etli* CE3 en SA y en medio mínimo piruvato amonio (datos no presentados). El gen *ilvDch2* participa en la síntesis de L-valina, L-leucina y L-isoleucina, así como el gen *leuA2* para la síntesis de L-leucina, es notable que la síntesis de estos aminoácidos depende de tiamina y que correlaciona con su sobre-expresión en SAT, así como la probable leucina aminopeptidasa ypch00075 RHE_CH00213, la aminopeptidasa ypch00101 RHE_CH00280, un probable

exportador de aminoácidos ypch00963 RHE_CH02787 de la familia LysE. Igualmente se sobre-expresaron, cuatro transportadores tipo ABC, así como el gen 5-dehidro-4-deoxiglucaratosa deshidratasa ypch00672 RHE_CH02057, que probablemente conecte el ciclo de Krebs con el metabolismo del glioxilato y dicarboxílicos, así como una posible asparaginasa (ypch00373 RHE_CH01144).

Metabolismo y transporte de nucleótidos (F). La cepa *R. etli* CE3 sobre-expresó en SAT comparado con SA el gen *ppx1*, la exopolifosfatasa que interconvierte ppGpp en pppGpp, importante en la respuesta estricta, es interesante que en la comparación SA-SAB en SAB se sobre-expresó el gen *relA* y en SA-SAT es en SAT donde se sobre-expresó el gen *ppx1*, probablemente haya una regulación post traduccional de estas proteínas que las mantengan inactivas ya que ambas condiciones son con vitaminas y no hay razones evidentes de limitación de aminoácidos. Probablemente la exopolifosfatasa regule la concentración de la forma funcional tetrapéptido en la respuesta estricta, ppGpp, hacia la forma inactiva pppGpp en una condición de crecimiento óptimo en SAT.

Metabolismo y transporte de carbohidratos (G). La cepa *R. etli* CE3 sobre-expresó en SAT comparado con SA dos probables transportadores de azúcar tipo ABC y una permeasa tipo ABC ypch00560 RHE_CH01635. Una proteína precursora de la gluconolactonasa ypf00252 RHE_PF00485 que participa en el ciclo de las pentosas, así como la probable 4-deoxi-L-treo-5-hexosulosa-uronato ceto-isomerasa ype00208 RHE_PE00400, que participa en la interconversión de pentosas y glucuronato. El gen *pgk* para la fosfoglicerato quinasa que produce gliceraldehído 3-P a partir de glicerato 3-P, así como *dme* malato deshidrogenasa (descarboxiladora de oxaloacetato, NADP⁺). Esta enzima toma malato y produce piruvato, ambos genes, *pgk* y *dme* son de la vía de gluconeogénesis, por lo que es muy probable que en SAT el flujo de carbono sea mayor que en SA en esta vía (Fig. 6), de acuerdo con esto, se incrementó la transcripción del gen *rbsK* para la ribosa cinasa, que convierte D-ribosa a ribosa 5-P, el cual es precursor de fosforibosil pirofosfato, que a su vez es sustrato para la síntesis de purinas pirimidinas e histidina. Estos datos sugieren que en SAT en contraste con SA la cepa *R. etli* CE3 tiene un metabolismo muy activo en el ciclo de las pentosas fosfato, así como la síntesis de purinas y pirimidinas.

Metabolismo y transporte de coenzimas (H). La cepa *R. etli* CE3 en SAT con relación a SA elevó la transcripción del gen *hemNdl*, el cual participa en la síntesis del grupo hemo para proteínas importantes en procesos como destoxificación de radicales de O₂ como la catalasa y transporte de electrones como citocromo c. El gen *pdxAb* y ypch00435 RHE_CH01279 para la síntesis de piridoxal fosfato (ver adelante), el piridoxal fosfato es una coenzima de las reacciones de transulfuración y transaminación. Lo que sugiere que en SAT, la vía de síntesis de piridoxal fosfato está elevada con relación a SA. Estos datos concuerdan con que la suplementación con piridoxal-HCl al SA y al medio mínimo piruvato amonio estimuló el crecimiento aeróbico de la cepa *R. etli* CE3 (Figs. 15 y 16).

Metabolismo y transporte de lípidos (I). La cepa *R. etli* CE3 en SAT comparado con SA elevó la transcripción de la probable proteína bi-funcional ligasa y sintetasa dependiente de AMP ype00074 RHE_PE00160, cuya actividad se describe como sintetasa en la síntesis de acil-CoA y ligasa en el metabolismo de los lípidos, probablemente porque la suplementación de tiamina mantiene elevada la síntesis de biotina para la síntesis de ácidos grasos, se sabe que la actividad de PC-biotina dependiente se mantiene elevada en SAT comparada con SA (Encarnación *et al.*, 1995).

Traducción, estructura de ribosomas y biogénesis (J). La cepa *R. etli* CE3 en SAT comparado con SA elevó la transcripción de la acetiltransferasa *vbsA*, para la degradación de lisina que produce aerobactina, el cual es un sideróforo para atrapar hierro (Fig. 4), lo que probablemente este relacionado con la síntesis del citocromo *cbb3* que es una hemo-cobre-proteína.

Transcripción (K). La cepa *R. etli* CE3 en SAT comparado con SA sobre-expresó el probable regulador transcripcional de la familia LuxR ypch00235 RHE_CH00647, así como el gen *rpoI* para un factor sigma de extracelular, que regula el operón *vbs* que agrupa genes para la síntesis del sideróforo vicibactina y la síntesis de la metionina, lo que correlaciona con la sobre-expresión de *vbsA*.

Replicación, reparación y recombinación (L). La cepa *R. etli* CE3 incrementó la transcripción en SAT comparado con SA del gen *himA*, que codifica para un factor de integración del hospedero (IHF), que forma parte de la transcripción dependiente del factor transcripcional σ_{54} en SAT. Así como el gen *dnaA* para la proteína iniciadora de la replicación y el gen *mutY* relacionado con la reparación de ADN.

Síntesis de pared celular, membranas y biogénesis de envoltura (M). La cepa *R. etli* CE3 en SAT con relación a SA elevó la transcripción del gen hipotético ypch01133 RHE_CH03265, el cual transduce energía a receptores de membrana externos, una proteína simbiótica de superficie ype00193 RHE_PE00373 y *mtgA* para la biosíntesis de peptidoglicanos.

Motilidad celular (N). La cepa *R. etli* CE3 en SAT con relación a SA elevó la transcripción del gen *cpaD* para el ensamble del pili, mientras que para la quimiotaxis sobre-expresó los genes *cheA* y *mcpX2*, debido probablemente a la agregación celular.

Modificación post-traducciona, recambio de proteínas y chaperonas (O). La cepa *R. etli* CE3 en SAT comparado con SA incrementó la transcripción del operón *sufBCD* para las reacciones de transulfuración. Los genes *fixNd* y *fixQd-f* para proteínas de la oxidasa simbiótica *cbb3*. Los genes *cycK* y *ccmF* para la biogénesis del citocromo c. Así como el gen hipotético ypch00386 RHE_CH01174 que codifica para una proteína hidroperóxido orgánico resistente que se induce por estrés osmótico.

Los genes *sufBCD*, para la reacción de transulfuración participan como andamios en la transferencia del azufre, ésta reacción es iniciada por *sufS* en las enterobacterias y que

está ausente en el genoma de la cepa *R. etli* CE3, pero es relevante que está elevada la transcripción de *nifSch*, por lo que es probable que el gen *nifSch* complemente la vía de transulfuración *sufBCD-nifS* en SAT. En la comparación SA-SAB, los operones *fix* y *suf* fueron sobre-expresados en SA, mientras que en ésta comparación es en SAT, probablemente se debe a que hay agregación celular en SA y SAT en comparación con SAB.

Transporte y metabolismo de iones inorgánicos (P). La cepa *R. etli* CE3 en SAT comparativamente sobre-expresó 7 genes relacionados con el transporte de hierro o su metabolismo, tales como *fhuA*, *fhuD* y *sfuA*. Además de *fixHd* y *fixSd* del operón *fixGHIS-sotR* (Granados-Baeza *et al.*, 2007) para la maduración del citocromo *cbb3*, el cual es una hemo-cobre proteína. El gen *mntH* para el transporte de manganeso. La superóxido dismutasa *sodB* importante en la dismutación del superóxido que genera peróxido de hidrógeno, relacionado con la generación de especies reactivas de oxígeno propias del metabolismo aeróbico. Así como el pseudogene ypc00057 RHE_PC00111.

Transporte, catabolismo y biosíntesis de metabolitos secundarios (Q). La cepa *R. etli* CE3 en SAT en contraste con SA sobre-expresó el gen ypch00517 RHE_CH01496 para una probable metalo-oxidoreductasa.

Predicción de la función (R). La cepa *R. etli* CE3 en SAT con relación a SA, elevó la transcripción de 9 genes cuya función solamente está predicha, entre las que se encuentran la reductasa de hierro *fhuF*, cuya presencia correlaciona con el crecimiento y la síntesis del citocromo *cbb3* además de una esterasa específica de lactona ypch01249 RHE_CH03535. Un gen hipotético para la síntesis de piridoxal ypch00433 RHE_CH01279, lo que correlaciona con que se requiere de TPP para su síntesis, una metil transferasa dependiente de SAM ypch00150 RHE_CH00394 y una alcohol deshidrogenasa *adhA*, ésta enzima participa en el metabolismo de la tirosina, la glucólisis-gluconeogénesis y el metabolismo de ácidos grasos. Es importante destacar que hay un poco de agregación celular durante el crecimiento en SAT, si bien, mucho menor que en SA, lo que provoca condiciones microaeróbicas y estimula la sobre-expresión de genes de microaerobiosis tales como los *fixNOQP* para el citocromo *cbb3*.

Función desconocida (S). La cepa *R. etli* CE3 sobre-expresó 9 genes en SAT con relación a SA, entre ellos *nirV* y *nnrU* para la utilización del nitrato, si bien este medio no contiene nitratos.

Transducción de señales (T). La cepa *R. etli* CE3 en SAT con respecto a SA sobre-expresó 4 genes putativos de proteínas universales de estrés, un gen putativo para la supresión de *dnaK*, ypc00055 RHE_PC00110, mientras que en SA está presente *dksA*, para ésta función (ver arriba). Además dos reguladores transcripcionales de la familia *fnr*/CRP probable ypd00049 RHE_PD00288 y *fnrNd*, la sobre-expresión de estos reguladores transcripcionales concuerda con que también están sobre-expresados los operones que activan, tales como; *fixGHIS-stoRd* y *fixNOQP* (ver categoría C) (Granados-Baeza *et al.*, 2007). El gen *ntrX* es un receptor de dos componentes del sistema ntr para la regulación del

nitrógeno, así como los genes *trala* para la síntesis de un autoinductor y *cinI* para la homoserina lactona, lo que sugiere que ésta condición alcanza un nivel de crecimiento a saturación comparado con SA.

Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular (U). La cepa *R. etli* CE3 en SAT con respecto a SA elevó la transcripción de proteínas para secreción sistema IV *virB8a* y *virB6a*, probablemente relacionados con el secretoma de *R. etli* CE3 (Meneses *et al* trabajo en proceso, este laboratorio). El gen *nolT* que codifica para una proteína de nodulación, así como *ypch00074* RHE_CH00212 para el ensamble del pili, están relacionados con un poco de agregación celular en ésta condición. Así como *trbl* para una proteína de conjugación.

Además de 25 genes que no tienen asignado el COG, tales como; La cepa *R. etli* CE3 en SAT con respecto a SA sobre-expresó el gen *vbsS* para la sintasa del péptido no ribosomal de la vicibactina y *vbsC* para la acetilasa de la vicibactina, un probable regulador transcripcional de la familia MerR *ypf00276* RHE_PF00560, 2 transportadores de secreción sistema IV *virB7a* RHE_PA00048, *virB1d* RHE_PD00143, probablemente relacionados con el secretoma de *R. etli* CE3, *virE1* para una proteína de virulencia, *repCd* y *repCa1* para la replicación de plásmido y la endoglucanasa *egl* entre otros.

1.2.2.3 Resumen de la discusión del transcriptoma SA-SAT.

La cepa *R. etli* CE3 en SA con respecto a SAT elevó la transcripción del gen *pntA2*, que es una transhidrogenasa que convierte NAD a NADP, lo que sugiere que la vía de las pentosas fosfato puede no ser eficiente en la generación de NADP. Es notable que estén sobre-expresados en SA con relación a SAT los genes *hisF1* y *hisCch3*, para la síntesis de purinas e histidina respectivamente, así como *ndk* y *add* relacionados con la síntesis de purinas, es importante considerar que el fosforibosil pirofosfato es sustrato común para las vías en las que participan los genes *hisF1*, *hisCch3*, *ndk* y *add*, además del transportador de ribosa *rbsCch1*, lo anterior sugiere que la vía de las pentosas fosfato está limitada de carbono, lo que coincide en los datos de SA de ambos transcriptomas, SA-SAB y SA-SAT.

Así mismo, en concordancia con los datos obtenidos en *R. etli* CE3 al ser subcultivada en SA (Encarnación *et al.*, 1995), durante el metabolismo fermentativo experimenta una limitación de TPP, lo que supone conlleva a una limitación de aminoácidos aromáticos, elevando la transcripción de los genes *aroF* y *dadD*. Probablemente también sean limitantes en su síntesis pantotenato y CoA ya que se sobre-expresó el gen *acpS*, de acuerdo con esto 40 ug/ml de pantotenato estimuló el crecimiento en subcultivo (Encarnación *et al*, dato no publicado), así como el gen hipotético para la síntesis de ácidos grasos RHE_CH01047, ya que la CoA se requiere para la síntesis del acetil CoA, que es sustrato a su vez para la síntesis de ácidos grasos y PHB. La acetil CoA se produce mediante la reacción de la PDH-TPP dependiente, si bien no es claro que la acetil CoA sea limitante ya que la síntesis de PHB se incrementa en el metabolismo fermentativo, es probable que durante el metabolismo fermentativo, el flujo de Acetil CoA

esté favorecido hacia la síntesis de PHB, debido a que la actividad de la ODH-TPP dependiente que drenaría este carbono en el ciclo de Krebs está disminuida debido a la limitación de TPP y la acumulación de NADH. De acuerdo con esto, en SA con relación a SAT se sobre-expresó el gen *bdhA*, cuya proteína participa en la síntesis del polímero, PHB, que se sabe que en la cepa *R. etli* CE3 se sintetiza y se acumula durante el metabolismo fermentativo, así mismo, se observó la elevación en la transcripción del gen *gloB* para la síntesis de D-lactato a partir de (R)-S-lactatoil glutatión que es un producto de fermentación.

La cepa *R. etli* CE3 en SA en comparación con SAT elevó la transcripción del gen *rbfA* que contribuye a un procesamiento eficiente del ARNr 16S y el gen *rspO* para la síntesis de la subunidad ribosomal 30S, es probable que ésta sea en respuesta ante la limitación de sustratos para la biosíntesis, ya que la bacteria está sintetizando PHB acumulando carbono y poder reductor por ende la síntesis de TPP probablemente disminuya. La cepa *R. etli* CE3 sobre-expresó en SA comparado con SAT el gen *gcpE* para la biosíntesis de esteroides como la ubiquinona. Así como los reguladores transcripcionales RHE_PE00361, RHE_PE00434 y la proteína de estrés por frío *cspA4*, de las que no se conoce su función en ésta bacteria, pero que en *E. coli* este regulador responde a estrés y resistencia a antibióticos en general.

De manera contrastante en SAT con relación a SA la cepa *R. etli* CE3 sobre-expresó los genes *fixGHIS-stoR* de los plásmidos d y f, así como el operón *fixNOQP* del plásmido d y el regulador transcripcional *fnrNd* del plásmido d para la síntesis del citocromo de alta afinidad por oxígeno *cbb3*, además de los genes *cycK* y *ccmF* para la biogénesis del citocromo c, debido probablemente a que en SAT las bacterias presentan un poco de agregación pero menor que en SA, lo que probablemente dificulta la difusión del oxígeno, sabemos que en SA está presente el citocromo *cbb3*, sin embargo la transcripción es significativamente mayor en SAT, el papel de este citocromo no es esencial ya que sabemos que la doble mutante de *R. etli* CE3 *fixNd-f* que no sintetiza el citocromo *cbb3* es capaz de crecer en SA (dato no presentado).

Así mismo, gen *adhA2* para una alcohol deshidrogenasa en la vía de síntesis de etanol, probablemente relacionada con la microaerobiosis de SAT, que participa también en el metabolismo de la tirosina, la glucólisis-gluconeogénesis y el metabolismo de ácidos grasos. Mientras que la fumarato hidratasa *fumC* del ciclo de Krebs es más propia del metabolismo aeróbico en SAT.

Además de genes para diversas funciones tales como; *bglSf* para el metabolismo de la sacarosa y almidón. Para el metabolismo de aminoácidos de la familia del aspártico *R. etli* CE3 sobre-expresó el gen *vbsL* para la síntesis de la metionina, *dapAfl* para la síntesis de la lisina, *vbsA* para la degradación de lisina y una metil transferasa dependiente de S-adenosil metionina (SAM) RHE_CH00394 (Fig. 4), también se elevó la transcripción del gen *leuA2* para la síntesis de leucina y el gen *ilvDch2* para la síntesis de aminoácidos ramificados, probablemente debido a la presencia de tiamina en el medio ya que se requiere TPP para su síntesis. Es relevante que la cepa *R. etli* CE3 en SAT comparado con SA elevó

la transcripción de los genes de la gluconeogénesis *pgk* y *dme*, el gen *rbsK* para la síntesis de ribosa fosfato, los genes RHE_PE00400 para la interconversión de pentosas y glucuronato y la gluconolactonasa RHE_PF00485, lo que sugiere que en SAT el ciclo de las pentosas fosfato está mucho más activo que en SA. Así mismo, en SAT se elevó la transcripción de los genes *sufBCD* y *nifSch* para la transulfuración, es interesante que estos genes también se sobre-expresaron en SA del transcriptoma SA-SAB, si bien probablemente en SA comparado con SAT la transulfuración no sea eficiente debido a que se requiere de cisteína y piridoxal fosfato (se requiere además TPP para la síntesis de piridoxal fosfato y la TPP está limitada en SA). Es importante que la serina se sintetiza a partir de piruvato en una reacción piridoxal fosfato dependiente y ésta es sustrato para la síntesis de la cisteína, es probable que la síntesis de la cisteína está afectada, debido a que la gluconeogénesis podría estar disminuida en SA.

En SAT con relación a SA se elevó la transcripción de solo dos reguladores transcripcionales, uno de la familia LuxR RHE_CH00647 y *rpoI*, probablemente relacionados con señales por densidad celular y para la síntesis del sideróforo vicibactina respectivamente.

La cepa *R. etli* CE3 en SAT con relación a SA probablemente tenga aumentada la síntesis del piridoxal fosfato, ya que se elevó la transcripción de los genes *pdxAb* y *ypch00435* RHE_CH01279, de acuerdo con lo anterior es conveniente recordar que el medio tiene tiamina y se requiere TPP para la síntesis del piridoxal fosfato (Fig. 7). Así mismo, en SA es muy probable que se limite la síntesis del piridoxal-HCl, ya que 10 µg/ml de piridoxal-HCl mantiene el crecimiento aeróbico durante los subcultivos (ver adelante). La sobre-expresión de genes para la síntesis del piridoxal en SAT correlaciona con que la bacteria está creciendo eficientemente durante los subcultivos, ya que sobre-expresó los genes *trala* y *cinI* para la síntesis de señales de densidad. Además, la cepa *R. etli* CE3 elevó la transcripción en SAT del gen *hemNdl* para la síntesis del grupo hemo con relación a SA, lo que correlaciona con la sobre-expresión del citocromo *cbb3* que contiene un grupo hemo.

La cepa *R. etli* CE3 en SAT está sintetizando biotina en cantidades suficientes porque no se observó la sobre-expresión de genes que codifican para proteínas responsables de su importación, la biotina se midió mediante un radio inmuno ensayo en SAT y se observó una mayor cantidad que en SA (Encarnación *et al.*, datos no publicados), consecuente con esto, la actividad de PC está elevada en SAT (Encarnación *et al.*, 1995), por lo tanto se observa una actividad metabólica elevada en la cepa *R. etli* CE3 en SAT con relación a SA, si bien a nivel de reguladores transcripcionales no se encontró elevada la transcripción del regulador transcripcional $\sigma 70$ en SAT pero si en SAB.

En contraste con el metabolismo fermentativo de SA, en el metabolismo aeróbico de la cepa *R. etli* CE3 en SAT, se elevó la transcripción de genes relacionados con la resistencia al estrés oxidativo, chaperonas, estrés osmótico, así como genes putativos para proteínas de estrés universal, lo que muestra que para el crecimiento aeróbico la bacteria requiere de un sistema de defensa eficiente contra el estrés oxidativo.

1.2.2.4 CONCLUSIONES CAPITULO II. Transcriptoma SA-SAT.

1.- La cepa *R. etli* CE3 en SA comparado con SAT elevó la transcripción del gen *pntA2* para una transhidrogenasa que produce NADP a partir de NAD. Así como las ubiquinonas *nuoD1*, *nuoE2* y *ypch01347* RHE_CH03731, la obtención de NADPH de manera alternativa apoya la propuesta de que el ciclo de las pentosas fosfato no es eficiente en la producción de NADPH en SA, y el incremento de las deshidrogenasas que transfieren electrones a la ubiquinona, probablemente sea una respuesta a la acumulación de NADH.

2.- La cepa *R. etli* CE3 sobre-expresó en SA comparado con SAT el gen *gcpE* de la vía no-mevalonato para la síntesis de la ubiquinona donde se genera la deoxixilulosa-P, el cual es precursor para la síntesis del tiazol de la tiamina y piridoxal-P. Es probable que la síntesis de la ubiquinona está baja en SA a pesar de que está incrementada la transcripción de este gen, debido a que la disminución del crecimiento en SA demanda menos ATP por tanto hay acumulación de NADH.

3.- La cepa *R. etli* CE3 en SA en comparación con SAT incrementó la transcripción de los genes *thiC*, *thiG*, *thiEb* y *thiO* para la síntesis de la tiamina, lo que sustenta la propuesta de que la tiamina está limitada durante la transición hacia un metabolismo fermentativo (Taboada *et al.*, 2008).

4.- La cepa *R. etli* CE3 en SA con respecto a SAT elevó la transcripción de los genes *hisF1*, *hisCch3*, *ndk* y *add* para la síntesis de histidina y las purinas. Estas vías dependen de fosforibosilpirofosfato, lo que sugiere que el flujo de carbono en la vía de las pentosas fosfato está disminuido, lo que explicaría que la tiamina está baja en SA (Taboada *et al.*, 2008), ya que si la vía de síntesis de la ubiquinona fuera eficiente (ver arriba No. 2), se generaría suficiente precursor para la síntesis del tiazol de la tiamina, que aunado a un flujo de carbono (aunque sea un flujo moderado) en la vía de síntesis de las purinas produciría suficiente compuesto AIR para la síntesis de la pirimidina de la tiamina, con esto, un incremento en la síntesis de la tiamina. Sin embargo no es así, se ha determinado que el nivel de TPP en SA es bajo, 36% con respecto a SAB (Taboada *et al.*, 2008). Se incrementó además un transportador de ribosa, lo cual no es claro que sea por una limitación de este carbono porque también se elevó la transcripción de transportadores en SAB o SAT.

5.- La cepa *R. etli* CE3 en SA con relación a SAT sobre-expresó los genes *aroF* y *dadD* para la síntesis de aminoácidos aromáticos, lo que apoya la propuesta de que en SA hay limitación de carbono en la vía de las pentosas fosfato, ya que en ésta vía, la producción de eritrosa-4P mediante la actividad de la transcetolasa es dependiente de TPP y el nivel de ésta vitamina es bajo en SA comparado con SAB (Taboada *et al.*, 2008).

6.- La cepa *R. etli* CE3 en SA con respecto a SAT incrementó la transcripción de los genes *acpS* y RHE_CH01047 para la síntesis de ácidos grasos. Las reacciones de carboxilación para la síntesis de ácidos grasos depende de biotina, la cual es limitante en

SA (Guillén-Navarro *et al.*, 2005b), por lo que es probable que la sobre-expresión de estos genes se deba a una limitación de carbono, ya que a las 10 horas del segundo subcultivo, la bacteria aún está creciendo pero a un tiempo de duplicación mayor que en SAT.

7.- La cepa *R. etli* CE3 en SA con relación a SAT elevó la transcripción del gen *rbfA* que contribuye a un procesamiento eficiente del ARNr 16S y el gen *rspO* para la síntesis de la subunidad ribosomal 30S, se sabe que la síntesis de estas moléculas está asociado al crecimiento óptimo en *E. coli*, sin embargo ésta bacteria está disminuyendo su capacidad de crecimiento, hay una oxidación incompleta de aminoácidos y ácidos orgánicos en SA, lo que sugiere que ésta es una respuesta ante la limitación de metabolitos.

8.- La cepa *R. etli* CE3 en SA en contraste con SAT elevó la transcripción del gen *bdhA* para la acetil CoA acetil transferasa, la cual es la primera enzima de la vía de síntesis del PHB, lo que correlaciona con la síntesis y acumulación de este polímero durante el metabolismo fermentativo, es relevante que cuando la cepa no utiliza de manera eficiente el acetil CoA para el ciclo de Krebs durante el metabolismo fermentativo, abre la vía de síntesis de PHB para guardar carbono y poder reductor.

9.- La cepa *R. etli* CE3 en SAT comparado con SA sobre-expresó los operones *fixNOQPd* y *fixGHIS-stoRd-f* para la síntesis y maduración del citocromo *cbb3*. Esto probablemente se deba a que en ésta condición hay un poco de agregación celular, lo que limitaría parcialmente la difusión del oxígeno y estimula la transcripción de estos operones, datos de este proyecto mostraron que hay una relación de la tiamina con el gen *fixGd*, ya que la mutante en este gen sintetiza poca TPP (datos preliminares no mostrados).

10.- La cepa *R. etli* CE3 en SAT en relación a SA elevó la transcripción del gen *fumC* para la fumarato hidratasa del ciclo de Krebs. Lo que sugiere que la oxidación de succinato es mayor en SAT que en SA.

11.- La cepa *R. etli* CE3 en SAT comparado con SA incrementó la transcripción de los genes *vbsA*, *vbsL*, *dapAfl*, así como la metil transferasa dependiente de S-adenosil metionina RHE_CH00394 para la síntesis de los aminoácidos de la familia del aspártico. Es interesante que también en el transcriptoma de SA-SAB en SA se sobre-expresaron los genes *vbsA*, *ubsL*, *ahcY* y *dapAf* de ésta vía metabólica cuando está dejando de crecer. Esta vía depende de que fluya carbono del ciclo de Krebs a piruvato, vía gluconeogenesis, el piruvato es transaminado a aspártico, en una reacción dependiente de piridoxal fosfato que probablemente sea limitante en SA ya que se requiere TPP para su síntesis, lo que sugiere que en SAT, la sobre-expresión se debe a la biosíntesis de estos aminoácidos, mientras que en SA probablemente sea una respuesta ante la limitación de estos, lo cual se definirá cuando se realicen experimentos de flujo carbono.

12.- La cepa *R. etli* CE3 en SAT en relación a SA elevó la transcripción del gen *leuA2* para la síntesis de leucina y el gen *ilvDch2* para la síntesis de aminoácidos ramificados, la síntesis de estos aminoácidos requiere la enzima acetolactato sintasa

dependiente de TPP, por lo que es probable que la suplementación de tiamina estimule la síntesis de estos aminoácidos, en contraste en SA el nivel de la TPP es bajo.

13.- La cepa *R. etli* CE3 en SAT comparado con SA sobre-expresó los genes *pgk* y *dme* de la gluconeogénesis y el gen *rbsK* para la ribosa quinasa lo que sugiere que el ciclo de las pentosas fosfato está funcionando mas eficientemente en SAT. Probablemente la tiamina del medio estimule la transquetolasa de la vía de las pentosas fosfato, lo que estimularía el flujo de carbono gluconeogénico en SAT.

14.- La cepa *R. etli* CE3 en SAT con relación a SA elevó la transcripción de los reguladores transcripcionales, RHE_CH00647 de la familia *LuxR* y *rpoI*, los cuales probablemente estén relacionados con una respuesta a densidad celular y a estrés, ya que el crecimiento aeróbico llega a densidad celular alta y genera especies reactivas de oxígeno.

15.- La cepa *R. etli* CE3 en SAT con respecto a SA sobre-expresó los genes *sufBCD* Y *nifSch* para la transulfuración. Estos genes también fueron sobre-expresados en SA del transcriptoma SA-SAB, cabe que señalar que la síntesis de cisteína y la transulfuración dependen de piridoxal fosfato, que a su vez requiere tiamina para su síntesis, lo que sugiere que en SAT la sobre-expresión corresponde con el incremento de la transulfuración, mientras que en SA se relacione mas con una limitación de los sustratos.

16.- La cepa *R. etli* CE3 en SAT en contraste con SA incrementó la transcripción de los genes *pdxAb* y *ypch00435* RHE_CH01279 para la síntesis de piridoxal fosfato, debido probablemente a la tiamina del medio ya que su síntesis requiere TPP mientras que en SA ésta vitamina es limitante.

17.- La cepa *R. etli* CE3 en SAT comparado con SA elevó la transcripción de los genes *trala* y *cinI* para la síntesis de señales de densidad celular, lo que sugiere que el cultivo alcanza una densidad celular alta en contraste con SA.

18.- La cepa *R. etli* CE3 en SAT con relación a SA sobre-expresó el gen *hemNdl* para la síntesis del grupo hemo, así como en SA del transcriptoma SA-SAB. El citocromo *cbb3* y la catalasa, entre otras proteínas, contiene un grupo hemo, coincide la sobre-transcripción de los genes *fixNOQP* para el *cbb3* con el gen *hemNdl*. Lo que sugiere que en SAT, la respiración elevada con relación a SA, conlleva la generación de especies reactivas de oxígeno.

Genes del Transcriptoma SA-SAT, genes que elevaron su transcripción en SA.

COMPARACION SA-SAT, GENES SOBRE TRANSCRITOS EN SA

Valor P	Promedio	Desviación estándar	Identificador	Gen	Función	COG	Cat.
1.29E-06	-0.569364927	0.073489152	RHE_CH03613	<i>pntA2</i>	NAD(P)(+) transhydrogenase (AB-specific), alpha subunit protein	COG3288	[C]
2.73E-05	-0.515502702	0.142428383	RHE_PC00004	<i>ypc00002</i>	putative nitrilotriacetate monooxygenase protein component A	COG2141	[C]
7.38E-05	-1.543833545	0.500952115	RHE_CH02618	<i>ypch00883</i>	probable cytochrome-c protein	COG3474	[C]
8.48E-05	-0.792443968	0.256735224	RHE_CH01606	<i>nuoD1</i>	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain D protein	COG0649	[C]
0.000132384	-0.594713073	0.219580749	RHE_CH03740	<i>nuoE2</i>	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain E protein	COG1905	[C]
0.000335756	-0.549385998	0.228588707	RHE_CH03731	<i>ypch01341</i>	probable NADH-ubiquinone oxidoreductase protein	COG0651	[CP]
0.000628649	-0.579796058	0.170418191	RHE_CH01484	<i>ypch00513</i>	probable anaerobic dehydrogenase protein	COG0243	[C]
2.31E-05	-0.701529258	0.16535175	RHE_CH04010	<i>hisCch3</i>	histidinol-phosphate aminotransferase protein	COG0079	[E]
5.81E-05	-0.462572667	0.12239388	RHE_CH03674	<i>yhch01083</i>	hypothetical conserved protein	COG2981	[E]
7.70E-05	-0.446601059	0.124975038	RHE_CH02375	<i>aroF</i>	aldolase DAHP synthetase protein	COG3200	[E]
8.39E-05	-0.710930403	0.226149132	RHE_CH00042	<i>hisF</i>	imidazoleglycerol phosphate synthase, cyclase subunit protein	COG0107	[E]
0.000179165	-2.355799184	0.823908644	RHE_CH03974	<i>glnK</i>	nitrogen regulatory protein P-II	COG0347	[E]
0.000181128	-0.497454936	0.150951161	RHE_CH01727	<i>ypch00584</i>	probable dehydrogenase protein	COG2303	[E]
0.000232533	-1.069559522	0.432441887	RHE_PF00162	<i>ypf00073</i>	probable amino acid ABC transporter, substrate-binding protein	COG0834	[ET]
0.000454096	-0.477594549	0.173238803	RHE_PE00191	<i>ype00092</i>	probable oligopeptide ABC transporter, ATP-binding protein	COG0444	[EP]
0.000625323	-1.924317836	0.950248824	RHE_PB00081	<i>thiO</i>	thiamine biosynthesis FAD oxidoreductase protein	COG0665	[E]
0.000629354	-1.165453459	0.525680104	RHE_PF00436	<i>dadA</i>	D-amino-acid dehydrogenase, small subunit protein	COG0665	[E]
0.000113457	-0.313933417	0.074027885	RHE_CH03909	<i>guaA2</i>	GMP synthase - glutamine amidotransferase protein	COG0518	[F]
0.000197628	-0.758683319	0.125687633	RHE_CH01472	<i>ndk</i>	nucleoside-diphosphate-kinase protein	COG0105	[F]
0.00030865	-0.562614437	0.194276479	RHE_CH00197	<i>add</i>	adenosine deaminase protein	COG1816	[F]
5.09E-06	-0.838566324	0.194355509	RHE_CH02642	<i>mocBch1</i>	rhizopine ABC transporter, substrate-binding protein	COG1879	[G]
0.000344073	-0.664861284	0.266557854	RHE_PC00102	<i>ypc00052</i>	probable sugar ABC transporter, permease protein	COG1175	[G]
0.000479443	-0.691687829	0.294808884	RHE_PE00031	<i>ype00015</i>	putative ABC transporter, permease protein	COG0477	[GEPR]
2.69E-07	-2.730752571	0.331499582	RHE_PB00082	<i>thiC</i>	thiamine biosynthesis protein	COG0422	[H]
2.78E-06	-1.377176932	0.28228641	RHE_PB00079	<i>thiEb</i>	thiamine-phosphate pyrophosphorylase protein	COG0352	[H]
4.03E-06	-1.882263973	0.343816001	RHE_PB00080	<i>thiG</i>	thiazole biosynthesis protein	COG2022	[H]

2.59E-05	-0.941299659	0.21035101	RHE_CH04009	<i>gcpE</i>	1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate synthase protein (terpenoid biosynthesis protein)	COG0821	[I]
5.86E-05	-0.647830574	0.174647568	RHE_CH01388	<i>acpS</i>	holo-[acyl-carrier-protein] synthase protein	COG0736	[I]
8.58E-05	-0.582732539	0.201806818	RHE_CH01047	<i>ypch00346</i>	probable 3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase protein	COG1028	[IQR]
0.00011579	-0.645540746	0.158387408	RHE_CH04094	<i>ypch01442</i>	putative phosphatase protein	COG0671	[I]
0.000158599	-1.636410647	0.637601866	RHE_CH03123	<i>bdhA</i>	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase protein	COG1028	[IQR]
0.000115234	-0.511032748	0.258600795	RHE_CH00112	<i>rpsO</i>	30S ribosomal protein S15	COG0184	[J]
0.000415491	-1.037276018	0.325063746	RHE_CH00115	<i>rbfA</i>	ribosome binding factor A, rRNA processing protein	COG0858	[J]
0.000481711	-0.801285352	0.153742518	RHE_CH02568	<i>cspA4</i>	cold shock protein	COG1278	[K]
0.000508432	-0.812918532	0.360871628	RHE_PE00361	<i>ype00185</i>	probable transcriptional regulator protein, AraC family	COG2207	[K]
0.000570074	-0.624828129	0.298738486	RHE_PE00434	<i>ype00223</i>	putative transcriptional regulator protein, Cro/CI family	COG1396	[K]
2.64E-05	-0.367199835	0.092387028	RHE_PD00313	<i>yid00044</i>	probable insertion sequence transposase protein	COG2801	[L]
4.22E-05	-0.558635892	0.15914203	RHE_CH04022	<i>mgpS</i>	ATP-dependent DNA helicase protein	COG0513	[LKJ]
0.000631123	-0.297132698	0.078927817	RHE_CH02156	<i>ypch00710</i>	putative deoxyribonuclease protein, TatD family	COG0084	[L]
6.34E-06	-0.752783858	0.168861073	RHE_PF00294	<i>ypf00145</i>	probable polygalacturonase protein	COG5434	[M]
6.35E-05	-0.897436561	0.192214391	RHE_CH03195	<i>ypch01111</i>	probable UDP-glucose 4-epimerase protein	COG0451	[MG]
0.000199459	-0.877070599	0.358911995	RHE_PE00037	<i>redB</i>	glycosyltransferase protein	COG0438	[M]
0.000256296	-0.398237269	0.111316906	RHE_CH03221	<i>pssG</i>	glycosyltransferase protein	COG0463	[M]
0.00028104	-0.526900942	0.211789678	RHE_CH03213	<i>pssS</i>	glycosyltransferase protein	COG0438	[M]
0.000249123	-1.100738758	0.462507248	RHE_CH03515	<i>cheBch2</i>	chemotaxis-specific methylesterase protein	COG2201	[NT]
7.09E-07	-0.714272239	0.065886329	RHE_CH01964	<i>ccsA</i>	cytochrome-c-type biogenesis protein	COG0785	[O]
0.000276136	-1.000919197	0.423390528	RHE_CH01244	<i>ypch00423</i>	probable molecular chaperone small heat shock protein, hsp20 family	COG0071	[O]
4.46E-05	-1.202672612	0.302352498	RHE_CH03865	<i>ypch01375</i>	putative nitrate/sulfonate/bicarbonate ABC transporter, ATP-binding protein	COG1116	[P]
7.30E-05	-2.090866126	0.650931721	RHE_CH03866	<i>ypch01376</i>	putative nitrate/sulfonate/bicarbonate ABC transporter, substrate-binding protein	COG0715	[P]
0.000290611	-0.537314425	0.197041836	RHE_CH00861	<i>kupch1</i>	potassium transporter protein	COG3158	[P]
0.000574344	-0.469553159	0.182975164	RHE_PE00455	<i>cobG</i>	sulfite reductase, beta subunit (hemoprotein) protein	COG0155	[P]
0.000153059	-0.721623902	0.222258298	RHE_CH03938	<i>ypch01398</i>	putative ABC transporter, ATP-binding protein (involved in lysophospholipase L1 biosynthesis)	COG4181	[Q]

9.55E-06	-0.704053156	0.11873004	RHE_CH03978	<i>lonD</i>	ATP-dependent protease LA 2 protein	COG2802	[R]
6.09E-05	-0.989073955	0.121600488	RHE_CH03534	yhch01046	50S ribosomal protein L36	COG0457	[R]
0.000118502	-1.286239707	0.383822636	RHE_CH01250	yhch00365	hypothetical conserved protein	COG2166	[R]
0.000254546	-0.605300443	0.221140795	RHE_CH02155	ypch00709	probable metal-dependent hydrolase protein	COG1235	[R]
0.000284437	-1.197148417	0.517345331	RHE_PC00014	yhch00004	hypothetical conserved protein	COG3545	[R]
0.000451833	-0.889374434	0.360676246	RHE_CH03812	<i>gloB</i>	hydroxyacylglutathione hydrolase protein	COG0491	[R]
0.000551854	-0.963074219	0.179164462	RHE_CH02072	yhch00612	hypothetical conserved protein	COG3729	[R]
0.000587694	-0.534241716	0.15015499	RHE_CH00755	ypch00255	putative glycosyl/methyltransferase hybrid protein	COG1216	[R]
1.07E-05	-1.11783025	0.216753669	RHE_CH03017	yhch00906	hypothetical conserved protein	COG2960	[S]
5.93E-05	-0.66668391	0.192023133	RHE_CH03760	yhch01092	hypothetical conserved protein	COG5319	[S]
7.94E-05	-0.689376558	0.118577034	RHE_PE00058	<i>pcaCe</i>	gamma-carboxymuconolactone decarboxylase protein	COG0599	[S]
0.000164331	-2.017086942	0.796087207	RHE_CH00594	yhch00147	hypothetical conserved membrane protein	COG5572	[S]
0.000168738	-0.692262278	0.207382515	RHE_CH02101	yhch00617	hypothetical conserved protein	COG3785	[S]
0.000306267	-0.737054121	0.206935117	RHE_CH02247	yhch00663	hypothetical conserved protein	COG0316	[S]
0.000306862	-0.746341921	0.198960253	RHE_PE00285	yhch00099	hypothetical conserved protein	COG3254	[S]
0.000319033	-0.665520039	0.198384249	RHE_CH03998	ypch01412	putative protein require for succinylation of osmoregulated periplasmic glucans	COG4645	[S]
0.000381792	-1.782424722	0.779147059	RHE_CH03432	yhch01019	hypothetical conserved protein	COG3181	[S]
0.000509523	-0.295836021	0.131809115	RHE_CH01867	yhch00543	hypothetical conserved protein	COG4714	[S]
0.000645747	-0.912901592	0.423254023	RHE_CH03030	yhch00911	hypothetical conserved protein	COG2127	[S]
4.33E-06	-0.950869616	0.213345808	RHE_CH02329	<i>dksA</i>	DnaK suppressor protein	COG1734	[T]
8.68E-05	-0.983737918	0.255477113	RHE_CH00583	ypch00211	putative arsenate reductase (phosphatase) protein	COG0394	[T]
0.000382139	-0.862357881	0.284125994	RHE_CH03714	<i>cyaG2</i>	adenylate cyclase protein	COG2114	[T]
0.000411396	-0.581291447	0.185209622	RHE_CH00171	ypch00061	probable multidrug ABC transporter, ATP binding protein	COG1132	[V]
1.95E-06	-0.802232085	0.160356828	RHE_CH03798	yhch01102	hypothetical conserved protein		
2.52E-06	-0.90826493	0.17304022	RHE_CH02653	yhch00800	hypothetical protein		
2.13E-05	-0.675863331	0.136872027	RHE_CH01550	yhch00454	hypothetical conserved protein		
5.52E-05	-0.806715819	0.202773815	RHE_PD00077	yhch00038	hypothetical protein		
6.84E-05	-0.519115482	0.098720911	RHE_CH00614	<i>rbsCch1</i>	ribose ABC transporter, permease protein		
7.94E-05	-0.376094916	0.123021341	RHE_CH00201	yhch00045	hypothetical conserved protein		

9.12E-05	-0.59121128	0.143379728	RHE_CH00851	yhch00206	hypothetical conserved protein
9.71E-05	-1.138450107	0.351059894	RHE_CH04089	yhch01173	hypothetical conserved protein
0.000110681	-0.686685232	0.250609546	RHE_CH02170	yhch00631	hypothetical protein
0.000328264	-0.63983509	0.271805827	RHE_CH01598	yhch00471	hypothetical conserved protein
0.000357936	-0.645713467	0.177760493	RHE_CH03254	yhch00978	hypothetical conserved protein
0.000364849	-0.493031866	0.213491188	RHE_CH02317	yhch00683	hypothetical conserved protein
0.000371755	-0.850877072	0.376612504	RHE_CH03431	yhch01018	hypothetical conserved protein
0.000381507	-1.511425549	0.644450998	RHE_CH03567	yhch01058	hypothetical protein
0.000486201	-1.154050741	0.456813713	RHE_CH00479	yhch00114	hypothetical conserved protein
0.000492629	-0.354115016	0.075517437	RHE_CH02925	yhch00871	hypothetical conserved protein
0.000512304	-0.452119181	0.191736937	RHE_PE00084	ype00032	putative sarcosine dehydrogenase protein
0.000515932	-1.273071037	0.549742361	RHE_CH00420	yhch00096	hypothetical conserved protein
0.00053361	-0.768649606	0.337632306	RHE_PF00128	yh00055	hypothetical protein
0.000610105	-0.974489647	0.288768358	RHE_CH01338	yhch00402	hypothetical conserved protein
0.000611292	-0.81077404	0.224131698	RHE_PD00263	yhd00090	hypothetical protein
0.000640373	-0.713934242	0.319875249	RHE_CH03815	yhch01108	hypothetical conserved protein

Transcriptoma SA-SAT, genes que elevaron su transcripción en SAT

COMPARACION SA-SAT, GENES SOBRE TRANSCRITOS EN SAT

Valor P	Promedio	Desviación estándar	Identificador	Gen	Función	COG	Cat.
3.75E-06	2.258861803	0.450200891	RHE_PD00298	<i>azuPd</i>	pseudoazurin blue-copper protein	COG3794	[C]
1.41E-05	1.401606817	0.271234744	RHE_CH00303	yhch00072	hypothetical conserved protein	COG3488	[C]
5.43E-05	0.875860564	0.26734643	RHE_CH01441	ypch00494	putative oxidoreductase protein	COG0667	[C]
6.88E-05	1.341770123	0.319820794	RHE_PD00292	<i>fixGd</i>	ferredoxin oxidase protein	COG0348	[C]
7.24E-05	1.689941458	0.395540477	RHE_PD00295	<i>fixOd</i>	cytochrome C oxidase, fixO chain protein	COG2993	[C]
0.000100121	1.777921108	0.566970943	RHE_PF00503	<i>fixGf</i>	ferredoxin oxidase protein	COG0348	[C]
0.000171215	1.450947219	0.400291112	RHE_PD00293	<i>fixPd</i>	cytochrome C oxidase, fixP chain (cbb3-type subunit III) protein	COG2010	[C]
0.000246033	1.664495247	0.596957102	RHE_CH02383	<i>fumC</i>	fumarate hydratase class II protein	COG0114	[C]
0.000188181	1.016184011	0.331250771	RHE_PF00473	<i>bgISf</i>	beta-glucosidase protein	COG1192	[D]
1.04E-07	4.729444836	0.482377966	RHE_PF00461	<i>vbsL</i>	cystathionine gamma-synthase protein	COG0626	[E]
8.35E-07	1.399219542	0.202481759	RHE_CH04006	ypch01418	probable amino acid ABC transporter, substrate-binding protein	COG0834	[ET]
4.96E-06	1.385289435	0.158606003	RHE_CH02254	<i>nifSch</i>	pyridoxal-phosphate-dependent aminotransferase protein (nitrogenase cofactor synthesis protein)	COG1104	[E]

1.14E-05	0.849199283	0.109772663	RHE_CH00280	<i>ypch00101</i>	probable aminopeptidase protein	COG2309	[E]
1.24E-05	0.932209488	0.239926964	RHE_CH02057	<i>ypch00666</i>	probable 5-dehydro-4-deoxyglucarate dehydratase protein	COG0329	[EM]
3.31E-05	1.168871032	0.346048301	RHE_PD00178	<i>nocT</i>	nopaline ABC transporter, substrate-binding protein	COG0834	[ET]
0.000111822	1.07738288	0.237360517	RHE_PF00094	<i>dapAfl</i>	dihydrodipicolinate synthase protein	COG0329	[EM]
0.000200272	0.60436912	0.084660105	RHE_CH01144	<i>ypch00370</i>	putative L-asparaginase II protein	COG4448	[E]
0.000209387	0.804077064	0.262793773	RHE_CH02144	<i>occT</i>	octopine ABC transporter, substrate-binding protein	COG0834	[ET]
0.000262648	0.622278432	0.235005132	RHE_CH02787	<i>ypch00963</i>	probable amino acid efflux protein, LysE family	COG1280	[E]
0.00028047	0.764550612	0.299362685	RHE_CH00213	<i>ypch00075</i>	probable leucine aminopeptidase protein	COG0260	[E]
0.000306937	0.941893375	0.387905532	RHE_CH03067	<i>leuA2</i>	2-isopropylmalate synthase protein	COG0119	[E]
0.000488637	0.523371792	0.213425951	RHE_CH03963	<i>ypch01401</i>	putative amino acid ABC transporter, substrate-binding protein	COG0834	[ET]
0.000568289	0.473687811	0.219859877	RHE_CH03160	<i>ilvDch2</i>	dihydroxy-acid dehydratase protein	COG0129	[EG]
0.000533881	0.755418483	0.197054217	RHE_CH00788	<i>ppx1</i>	exopolyphosphatase protein	COG0248	[FP]
1.54E-05	0.575190195	0.149699065	RHE_CH00409	<i>rbsK</i>	ribose kinase protein	COG0524	[G]
0.000176788	0.80865611	0.296102897	RHE_CH03499	<i>pgk</i>	phosphoglycerate kinase protein	COG0126	[G]
0.00027594	1.194635615	0.308583827	RHE_CH00492	<i>ypch00181</i>	probable sugar ABC transporter, substrate-binding protein	COG1879	[G]
0.000312889	1.008391377	0.428487573	RHE_PF00485	<i>ypf00253</i>	probable gluconolactonase precursor protein	COG3386	[G]
0.000370412	1.701291595	0.655189447	RHE_CH02982	<i>ypch01037</i>	probable sugar ABC transporter, substrate-binding protein	COG1653	[G]
0.000547663	0.707362071	0.282437443	RHE_CH01635	<i>ypch00560</i>	probable ABC transporter, permease protein	COG0477	[GEPR]
0.000642132	0.93596073	0.373840581	RHE_PE00400	<i>ype00208</i>	probable 4-deoxy-L-threo-5-hexosulose-uronate ketol-isomerase protein	COG3717	[G]
0.000124315	1.911139038	0.297249183	RHE_PD00300	<i>hemNdl</i>	coproporphyrinogen III oxidase protein	COG0635	[H]
0.000146642	0.479113773	0.115151977	RHE_PB00028	<i>pdxAb</i>	4-hydroxythreonine-4-phosphate dehydrogenase protein	COG1995	[H]
4.02E-05	0.989656755	0.303440239	RHE_PE00160	<i>ype00074</i>	probable AMP-dependent synthetase and ligase protein	COG0318	[IQ]
4.68E-06	3.790033749	0.825188748	RHE_PF00459	<i>vbsA</i>	N6-hydroxylysine O-acetyltransferase protein	COG1670	[J]
4.86E-08	2.973584087	0.349562106	RHE_PF00462	<i>rpoI</i>	RNA polymerase sigma factor protein	COG1595	[K]
0.000660628	0.921329204	0.436380971	RHE_CH00647	<i>ypch00235</i>	probable transcriptional regulator protein, LuxR family	COG2771	[K]
3.92E-06	0.694952352	0.148295421	RHE_CH01533	<i>himA</i>	integration host factor alpha-subunit protein	COG0776	[L]
0.000273512	0.683405426	0.160511673	RHE_CH00358	<i>dnaA</i>	chromosomal replication initiator protein	COG0593	[L]

0.000482395	0.399704594	0.187127483	RHE_CH00997	<i>mutY</i>	A/G-specific adenine glycosylase protein	COG1194	[L]
0.00025128	0.954982619	0.326103815	RHE_PE00373	<i>ype00193</i>	probable symbiotically induced surface protein	COG2335	[M]
0.000274978	2.508110827	1.052184198	RHE_CH03265	<i>ypch01133</i>	putative membrane protein, transduces energy to outer membrane receptors	COG0810	[M]
0.000634063	0.766484927	0.372357425	RHE_CH04012	<i>mitgA</i>	peptidoglycan biosynthesis transglycosylase protein	COG0744	[M]
6.49E-05	1.281989855	0.300358711	RHE_CH00206	<i>cpaD</i>	pilus assembly protein	COG5461	[N]
0.000248468	0.83396564	0.31823114	RHE_CH00974	<i>mcpX2</i>	methyl-accepting chemotaxis protein	COG0840	[NT]
0.00034119	1.214220411	0.511541539	RHE_CH00639	<i>cheA</i>	chemotaxis two-component sensor histidine kinase protein	COG0643	[NT]
1.47E-06	1.603378834	0.221847057	RHE_CH02253	<i>sufB</i>	ABC transporter involved in Fe-S cluster assembly, permease protein	COG0719	[O]
2.17E-05	1.362947959	0.222608376	RHE_PD00296	<i>fixNd</i>	cytochrome C oxidase, fixN chain protein	COG3278	[O]
3.03E-05	1.307988677	0.270106951	RHE_PD00294	<i>fixQd</i>	cytochrome C oxidase, fixQ chain protein	COG4736	[O]
3.27E-05	1.373573672	0.354110838	RHE_CH01291	<i>cycK</i>	cytochrome-c-type synthesis protein	COG1138	[O]
7.35E-05	1.090419421	0.281785348	RHE_CH02251	<i>sufC</i>	ABC transporter involved in Fe-S cluster assembly, ATP-binding protein	COG0396	[O]
0.00012006	1.280795674	0.376318862	RHE_PF00505	<i>fixQf</i>	cytochrome C oxidase, fixQ chain protein	COG4736	[O]
0.000315863	0.961429809	0.398852767	RHE_CH03690	<i>osmC</i>	osmotically inducible protein	COG1764	[O]
0.000395724	1.007548295	0.44249965	RHE_CH02250	<i>sufD</i>	ABC transporter involved in Fe-S cluster assembly, permease protein	COG0719	[O]
0.000457554	1.225839489	0.521386126	RHE_CH01174	<i>ypch00386</i>	probable organic hydroperoxide resistance (osmotically inducible) protein	COG1764	[O]
0.000535403	0.702657693	0.332818697	RHE_PF00496	<i>ccmF</i>	cytochrome c-type biogenesis protein	COG1138	[O]
2.66E-09	3.989304904	0.23959337	RHE_PF00464	<i>fhuD</i>	ferrichrome-iron ABC transporter, substrate-binding protein	COG0614	[P]
1.47E-08	3.768507427	0.319420302	RHE_PF00469	<i>fhuA</i>	ferrichrome-iron transporter, receptor protein	COG1629	[P]
8.49E-08	1.765181269	0.2265841	RHE_CH01203	<i>sodB</i>	superoxide dismutase protein	COG0605	[P]
9.88E-08	2.682289859	0.164564885	RHE_CH00304	<i>yhch00073</i>	hypothetical conserved protein	COG3487	[P]
9.99E-08	3.095905804	0.3306171	RHE_CH02683	<i>ypch00917</i>	probable ferrichrome ABC transporter, substrate-binding protein	COG0614	[P]
5.24E-06	3.089194624	0.544599495	RHE_CH00878	<i>nmtH</i>	manganese transporter protein	COG1914	[P]
9.64E-06	1.727637792	0.402292825	RHE_CH03270	<i>hmuU</i>	hemin transport system, permease protein	COG0609	[P]
1.92E-05	2.057773146	0.539810079	RHE_CH03267	<i>hmuP</i>	hemin transport system, hemin uptake protein	COG4256	[P]
2.67E-05	3.460218234	0.921046544	RHE_PF00269	<i>ypf00126</i>	probable iron ABC transporter, substrate-binding protein	COG0614	[P]
7.77E-05	0.796130636	0.118927714	RHE_PD00289	<i>fixSd</i>	precursor of a membrane (nitrogen fixation)protein coupled to cation pump	COG3197	[P]
9.17E-05	1.260155911	0.358220463	RHE_CH04056	<i>sfuA</i>	iron(III) ABC transporter, substrate-binding protein	COG1840	[P]
0.000155608	1.055085643	0.235669692	RHE_PF00270	<i>ypf00127</i>	probable iron ABC transporter, permease protein	COG0609	[P]
0.000206798	1.345765696	0.229123199	RHE_PD00291	<i>fixHd</i>	cation pump membrane (nitrogen fixation)protein	COG5456	[P]

0.000459965	1.383664036	0.38718359	RHE_PC00111	ypc00057 pseudogene	putative DnaK suppressor protein	COG2217	[P]
4.27E-06	0.974336801	0.215883279	RHE_CH01496	ypch00517	probable metallo-oxidoreductase protein	COG2132	[Q]
2.90E-09	2.355735459	0.163558049	RHE_PD00022	yhd00013	hypothetical protein	COG2823	[R]
2.05E-08	1.885392307	0.196376472	RHE_PC00106	<i>adhA2</i>	alcohol dehydrogenase protein	COG1064	[R]
5.88E-06	1.619147182	0.371331921	RHE_PF00468	<i>fnuF</i>	ferric iron reductase protein	COG4114	[R]
7.87E-06	2.693164056	0.38912361	RHE_CH03262	yhch00980	hypothetical conserved protein	COG2329	[R]
2.08E-05	1.405713531	0.360850272	RHE_CH01279	ypch00433	putative pyridoxine 5'-phosphate oxidase protein	COG3576	[R]
3.39E-05	1.111470155	0.317686995	RHE_CH03535	ypch01249	probable lactone-specific esterase protein	COG0596	[R]
0.000224717	0.76197758	0.267555467	RHE_CH03966	ypch01403	probable oxidoreductase protein, aldo/keto reductase family	COG0656	[R]
0.000251217	0.811230783	0.344066293	RHE_CH00394	ypch00150	probable SAM-dependent methyltransferase protein	COG1092	[R]
0.000524699	0.616143398	0.269610299	RHE_CH00176	ypch00063	probable peptide ABC transporter, permease protein	COG4174	[R]
5.44E-06	1.357337444	0.277010658	RHE_PE00069	yhe00024	hypothetical conserved protein	COG3758	[S]
1.18E-05	1.053319536	0.242990458	RHE_CH01422	yhch00425	hypothetical conserved protein	COG3791	[S]
5.67E-05	0.959508003	0.291201662	RHE_CH03967	yhch01147	hypothetical conserved protein	COG3786	[S]
0.000116771	1.611150727	0.582472247	RHE_PF00526	<i>nirV</i>	nitrate reductase protein	COG1262	[S]
0.000196651	0.880153781	0.243279698	RHE_PF00528	<i>nnrU</i>	denitrification regulator protein	COG4094	[S]
0.000329051	0.644144229	0.15621933	RHE_CH03508	yhch01039	hypothetical conserved protein	COG3181	[S]
0.000335484	0.869169981	0.37399652	RHE_CH03841	yhch01118	hypothetical conserved protein	COG3533	[S]
0.000563575	1.150878431	0.487332953	RHE_CH02209	yhch00646	hypothetical conserved protein	COG3672	[S]
0.000623354	0.56433191	0.262679409	RHE_CH02672	yhch00807	hypothetical conserved protein	COG4312	[S]
1.05E-06	2.161805523	0.389699723	RHE_PC00110	ypc00056	putative DnaK suppressor protein	COG1734	[T]
2.30E-05	1.843899567	0.434183431	RHE_PC00109	ypc00055	putative universal stress UspA protein	COG0589	[T]
3.48E-05	0.259598244	0.050995328	RHE_CH02916	<i>cinI</i>	N-acyl-L-homoserine lactone (AHL) synthase protein	COG3916	[TQ]
4.54E-05	1.128142318	0.353523723	RHE_PD00288	ypd00049	probable transcriptional regulator protein, Fnr/CRP family	COG0664	[T]
5.21E-05	2.533855521	0.591349802	RHE_PD00016	ypd00003	putative universal stress UspA protein	COG0589	[T]
8.84E-05	1.384106046	0.424214027	RHE_PA00179	<i>trala</i>	autoinducer synthesis protein I	COG3916	[TQ]
9.92E-05	1.554974868	0.533537828	RHE_PC00113	ypc00058	putative universal stress UspA protein	COG0589	[T]
0.000145506	0.675633714	0.23293925	RHE_CH01952	<i>ntrX</i>	nitrogen regulation (two-component response regulator) protein	COG2204	[T]
0.000148587	1.744654974	0.648192079	RHE_PB00096	ypb00056	putative universal stress protein	COG0589	[T]
0.000254778	0.742520259	0.213248836	RHE_PD00216	<i>fnrNd</i>	oxygen-dependent transcriptional regulator protein, Fnr/CRP family	COG0664	[T]

8.95E-09	1.043264187	0.089638052	RHE_PA00169	<i>trbI</i>	conjugal transfer protein I	COG2948	[U]
2.10E-05	0.937453183	0.206819758	RHE_CH00212	<i>ypch00074</i>	putative pilus assembly protein (contains TPR repeats)	COG5010	[U]
4.53E-05	1.527058577	0.491853839	RHE_PA00049	<i>virB8a</i>	transport secretion system IV, VirB8 protein	COG3736	[U]
8.65E-05	2.065334548	0.719471064	RHE_PD00054	<i>nolT</i>	nodulation protein	COG4669	[U]
0.00040072	1.355737729	0.223458414	RHE_PA00047	<i>virB6a</i>	transport secretion system IV, VirB6 protein	COG3704	[U]
3.81E-07	4.003899604	0.44915183	RHE_Pf00457	<i>vbsS</i>	vicibactin biosynthesis non-ribosomal peptide synthase protein		
1.71E-06	3.391115803	0.4383427	RHE_CH03263	<i>yhcH00981</i>	hypothetical conserved protein		
2.08E-06	3.877802995	0.739064161	RHE_Pf00463	<i>vbsC</i>	vicibactin acetylase protein		
1.31E-05	2.754443494	0.514932493	RHE_CH03266	<i>yhcH00983</i>	hypothetical conserved protein		
1.37E-05	1.504485001	0.291285694	RHE_CH03264	<i>yhcH00982</i>	hypothetical conserved protein		
4.42E-05	1.011315318	0.18179129	RHE_CH00207	<i>cpaE</i>	pilus assembly protein, response regulator protein		
5.69E-05	1.008124124	0.178808972	RHE_PD00354	<i>repCd</i>	plasmid replication protein RepCd		
9.10E-05	1.247533967	0.401497424	RHE_PE00237	<i>yhe00085</i>	hypothetical protein		
9.76E-05	0.984046375	0.314544857	RHE_CH02355	<i>dme</i>	malate dehydrogenase (oxaloacetate decarboxylating) (NADP+) protein		
0.000100077	1.356046569	0.480373794	RHE_CH01051	<i>yhcH00276</i>	hypothetical conserved protein		
0.00012273	0.571264094	0.095206155	RHE_CH01562	<i>ypch00542</i>	probable polysaccharide synthesis/transport transmembrane protein		
0.000162518	1.266576873	0.48560315	RHE_Pf00560	<i>ypf00276</i>	probable transcriptional regulator protein, MerR family		
0.000175728	1.231416222	0.460396082	RHE_PA00048	<i>virB7a</i>	transport secretion system IV, VirB7 protein		
0.000192743	1.137815976	0.425244899	RHE_PE00013	<i>ype00004</i>	putative two-component response regulator protein		
0.000288877	1.026760078	0.420998351	RHE_PD00172	<i>yhd00067</i>	hypothetical protein		
0.000330974	1.603111539	0.71148265	RHE_PD00073	<i>yhd00037</i>	hypothetical protein		
0.000369655	1.340345224	0.573272838	RHE_CH03330	<i>yhcH00993</i>	hypothetical conserved protein		
0.000372145	1.474369103	0.651034937	RHE_CH03261	<i>ypch01132</i> <i>ypch00453</i> pseudogene	putative bleomycin resistance protein		
0.000376168	1.211509992	0.383651486	RHE_CH01339	<i>yhcH00689</i>	hypothetical conserved protein		
0.000536259	0.94813609	0.38840815	RHE_CH02333	<i>yhcH00689</i>	hypothetical conserved protein		
0.000538618	0.856382287	0.320232688	RHE_Pf00117	<i>yhf00048</i>	hypothetical conserved protein		
0.000549707	0.698300629	0.32365935	RHE_PA00182	<i>repCa1</i>	plasmid replication protein RepCa1		
0.000597625	0.349077229	0.107829411	RHE_PD00143	<i>virB1d</i>	transport secretion system IV, VirB1 protein		
0.000634487	1.264630763	0.579846809	RHE_CH00228	<i>egl</i>	endoglucanase precursor (cellulase) protein		
0.000647408	0.876121856	0.337730645	RHE_CH03518	<i>ypch01242</i>	putative methyl-accepting chemotaxis protein		
0.000652497	0.954279882	0.316182059	RHE_PA00060	<i>virE1</i>	virulence VirE1 protein		

1 CAPITULO III. RELACION DE LA SINTESIS DE LA TIAMINA CON EL ESTRÉS OXIDATIVO, LA DISMINUCIÓN DE LA OXIDACIÓN DEL CARBONO Y LA SUPLEMENTACION DE PIRIDOXAL-HCl.

1.1 Introducción.

Cepas mutantes en genes de la catalasa en *E. coli* mostraron inhibición del crecimiento cuando se retaron con concentraciones bajas de H₂O₂ exógeno (30 μM) (Seaver e Imlay, 2001), debido a que el H₂O₂ puede oxidar tioles, los cuales inactivan enzimas que tienen centros 4Fe-4S en su sitio activo tales como; la aconitasa, fumarasa, succinato deshidrogenasa, etc. (Storz e Imlay, 1999). Dado el papel central de la aconitasa en el metabolismo, una mutante en el gen *acnA* de la aconitasa de *B. japonicum* USDA100 que pierde el 70% de la actividad total, tiene disminuída la velocidad de crecimiento en medio mínimo (Thöny-Meyer, L. y Künzler, P., 1996).

El estrés oxidativo también afecta la síntesis de la tiamina ya que en *S. typhimurium* la proteína ThiH tiene un grupo 4F-4S que se inactiva por ROI, de acuerdo con esto una mutante en el gen *gshA* para la síntesis del glutatión, tiene afectada la síntesis de la tiamina (Gralnick *et al.*, 2000), el fenotipo *thi⁻* de la mutante *gshA* se revierte por la sobre-expresión del gen *yggX* que protege del estrés oxidativo ya que disminuye el tráfico de hierro en la bacteria (Gralnick y Downs., 2001). La cepa de *R. etli* CE3 posee el gen *thiO* en lugar de *thiH* y no existe una relación directa de este gen de la síntesis de la TPP con el estrés oxidativo. No obstante, recientemente, Martínez-Gomez y Downs., 2008, reportaron que la proteína ThiC, tiene un centro 4Fe-4S que es esencial para su actividad y es sensible al oxígeno, por lo que se investigó la relación de la síntesis de la tiamina con el estrés oxidativo en la mutante *katG⁻* de *R. etli* CE3, es importante que ésta bacteria solo cuenta con un solo gen de catalasa.

La oxidación de enzimas del metabolismo central y probablemente las enzimas involucradas en la síntesis de la TPP afecta de manera directa el metabolismo, se propone en este trabajo que la disminución del flujo de carbono, con especial énfasis en la vía gluconeogénica, disminuye la síntesis de la tiamina durante el metabolismo fermentativo, por lo que también es relevante entender además del estrés oxidativo, cual es la relación de la oxidación de carbono con la síntesis de la tiamina. En este laboratorio se construyó la mutante de *R. etli* SAM100 en el gen *phbC* cuya función es la polimerización del β-hidroxibutirato, ésta vía está presente durante el metabolismo aeróbico y fermentativo, el poli-β-hidroxibutirato (PHB) que es un polímero de reserva de carbono y poder reductor que se sintetiza y se degrada en el metabolismo aeróbico, mientras que durante el metabolismo fermentativo se sintetiza y se acumula. La mutante SAM100 tiene una velocidad de crecimiento menor que la cepa *R. etli* CE3 en SA, la mutante tiene un valor de NAD⁺/NADH en distintos medios entre 2.7 a 17 veces más bajo que la cepa *R. etli* CE3 y excreta una mayor cantidad de ácidos orgánicos al medio, por lo que tiene disminuida la capacidad de oxidación de carbono con relación a la cepa *R. etli* CE3 (Cevallos *et al.*, 1996), lo que da la oportunidad de relacionar la capacidad de oxidación de carbono con la síntesis de la tiamina.

Para la oxidación eficiente del carbono, otra relación metabólica importante, en este proyecto, es la síntesis de la tiamina con la síntesis del piridoxal fosfato. La deoxilulosa fosfato, producto de la enzima deoxilulosa fosfato sintasa dependiente de TPP, es un precursor común para la síntesis del componente tiazol HET-P de la tiamina y del piridoxal fosfato, es decir que se requiere de TPP para la síntesis de la

TPP y piridoxal fosfato, dada la ubicuidad en el metabolismo del piridoxal fosfato en las reacciones de transaminación y transulfuración, es probable que haya una limitación de este cofactor, debido a la limitación de TPP, lo que coadyuve a una disminución general del metabolismo de carbono de la cepa *R. etli* CE3 durante el metabolismo fermentativo. Por tanto, es relevante analizar en ésta cepa el efecto de la suplementación del piridoxal-HCl en SA y medio mínimo piruvato amonio.

1.2 Material y métodos

1.2.1 Subcultivos en medio mínimo succinato amonio o piruvato amonio de *R. etli* CE3.

1.- Se estrían las cepas en medio rico PY con sus respectivos antibióticos y se incuban 72 horas a 30 °C. Se inoculan medio líquido PY con calcio por 16 horas y se incuban a 30 °C, durante 16 horas.

2.- Se obtiene la pastilla celular mediante centrifugación de los cultivos durante 10 min., 15300 rcf a 5 °C. la pastilla se lava con 50 ml. de agua destilada estéril y se agita hasta resuspensión completa.

3.- Se centrifugan nuevamente la suspensión bacteriana y se resuspende la pastilla como en 2 y se repite el proceso de lavado 2 veces.

4.- La pastilla celular se resuspende en 15 ml de agua, se toman 100 ul de ésta suspensión y se diluye en agua 1 a 10, se lee a 540 nm. calibrando el espectrofotómetro con agua, se inoculan 150 ml de medio mínimo succinato amonio, o medio mínimo piruvato con amonio, a una densidad óptica de 0.05.

5.- Se toman alícuotas de 1.0 ml para determinar la proteína con el método de Lowry cada 4 horas.

Preparación de los medios de cultivo.

Medio rico Peptona de caseína y extracto de levadura (PY)

Peptona de caseína 5.0 g

Extracto de levadura 3.0 g

Aforar a 1.0 litro

Se alicuotan 100 ml en matraces de 250 ml

CaCl₂·2H₂O se prepara un stock (0.693 M) con 10.2 g en 100 ml de agua y se autoclavea

Al momento de usar el PY se complementa con 1.0 ml de CaCl₂ por cada 100 ml de medio (6.93 mM).

Succinato amonio pH 6.8

Succinato 10.0 mM.

Cloruro de amonio 10.0 mM.

K₂HPO₄ 1.26 mM. (0.22 g por litro)

MgSO₄ 0.83 mM (0.1 g por litro)

Aforo a un litro y se alicuota en matraces de 250 ml con 150 ml de medio
FeCl₃ 0.184 mM (Se esteriliza por filtración 0.025 g en 5.0 ml de agua y se toman 150 μ l para 150 ml de medio al momento de usar)
CaCl₂ · 2H₂O 1.49 mM (Se esteriliza por separado 2.2 g en 100 ml de agua y se agrega 1.5 ml por cada 150 ml de medio al momento de usar).

Piruvato amonio pH 6.8

Piruvato 10 mM pH 6.8 (Se prepara un stock de piruvato 1.0 M pH 8.0 y se agregan 1.5 ml por cada 150 ml de medio)

Cloruro de amonio 10 mM.

K₂HPO₄ 1.26 mM.

MgSO₄ 0.83 mM

FeCl₃ 0.184 mM (Se esteriliza por filtración y se toman 150 μ l para 150 ml de medio al momento de usar)

CaCl₂ · 2H₂O 1.49 mM (Se esteriliza en la autoclave por separado 2.2 g en 100 ml de agua y se agrega 1.5 ml por cada 150 ml de medio al momento de usar).

Suplementos para los medios mínimos.

Todos estos suplementos se esterilizan pasándolos por filtros de 0.22 μ m.

Tiamina.- Se disuelven en agua 10 mg de tiamina (Sigma T-4625) por cada 10 ml de agua y se suplementa al medio mínimo con 1.5 ml para cada 150 ml de cultivo.

Biotina.- Se disuelven 1.0 mg de biotina (Research Organics cat # 1052B) por cada 10 ml de agua y se suplementa con 1.5 ml para cada 150 ml de medio de cultivo.

Piridoxal HCl.- Se prepara 10 mg de piridoxal-HCL (Sigma P-9130) por cada 10 ml de agua y se complementa el medio con 1.5 ml por cada 150 ml.

1.2.2 Determinación de proteínas por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

1.- Las pastillas disueltas en ácido tricloroacético se centrifugan 15 min. a 16100 rcf a 4°C, se separa el sobrenadante y se disuelve con la ayuda del vortex en 100 μ l de 0.4 N de NaOH.

2.- Se agregan 100 μ l de agua, se agrega 1ml de la solución A 98%, solución B 1% y de la solución C 1%. Se agita y se incuba a temperatura ambiente durante 10 min.

3.- Se agrega 100 μ l. De reactivo de folin fenol Ciocalteu disuelto en agua 2 veces por 1 volumen de reactivo.

4.- Se homogeniza con la ayuda del vortex y se incuba 30 min. a temperatura ambiente.

5.- Las lecturas se hacen en el espectro a 625 nm.

6.- Se incluye un estándar de albúmina sérica de bovino a una concentración de 40 µg/ ml.

Solución A de Lowry.

NaOH 3.99 g.

Na₂CO₃ 7.35 g.

Aforo a 1 litro.

Solución B de Lowry.

KNaC₄H₄O₄ · 4H₂O 2 g.

Aforo a 100 ml de agua

Solución C de Lowry.

CuSO₄ · 5H₂O 1.4 g.

Aforo a 100 ml de agua.

Reactivo de Folin & Ciocalteu's Fenol Sigma. No. Cat. F.9252.

Diluir 1 volumen de reactivo de fenol en 2 volúmenes de agua.

1.2.3 Determinación de H₂O₂ intracelular en *R. etli* CE3.

1.- Se toman 6 muestras de un 1 ml de cultivo (uno para control otro para determinación de proteína y 4 replicas) y se centrifugan 1 min a 16100 x g a 4°C. Se aspira el sobrenadante.

2.- A la muestra control se disuelve la pastilla celular 100 µl de buffer PBS 1X, 100 µl de catalasa PBS (22 mg/ml de catalasa de hígado de bovino (Sigma C-10) en PBS 1X) y 100 µl de o-fenilendiamina (0.4 mg/ml o-fenilendiamina en PBS 1X).

3.- A la muestra problema, la pastilla se disuelve en 100 µl de buffer PBS, 100 µl de peroxidasa (0.2615 mg/ml de peroxidasa de rábano (Sigma P 8375) en PBS 1X) y 100 µl de o-fenilendiamina (0.4 mg/ml o-fenilendiamina en buffer PBS 1X).

4.- Las muestras se incuban 15 min a 30°C.

5.- Se detiene la reacción con 100 µl de ácido sulfúrico 2.5 N.

6.- Las muestras se centrifugan 3 min a 16200 rcf, a 4°C, se recupera el sobrenadante.

7.- Se lee la absorbancia del sobrenadante a 490 nm.

8.- Se prepara una curva de titulación de H₂O₂ en los rangos de 1, 3, 5, 10, 18, 34, 64, 111 mM.

9.- A la muestra para determinación de proteína, la pastilla celular se disuelve en 1 ml de Acido tricloroacético al 5%, se almacena a 5 °C hasta su posterior determinación de la concentración de proteína por el método de Lowry.

1.2.4 Determinación de H₂O₂ extracelular en *R. etli* CE3.

1.-Se toman 4 alícuotas de 450 µl. de sobrenadante de los cultivos previamente centrifugados a 16100 x g a 4°C.

2.- Al sobrenadante control se le agregan 100 µl de buffer PBS 1X, 100 µl de catalasa en PBS 1X (22 mg/ml de catalasa de hígado de bovino en PBS 1X) y 100 µl de o-fenilendiamina (0.4 mg/ml o-fenilendiamina en PBS 1X).

3.- AL sobrenadante problema se le agrega 100 µl de buffer PBS, 100 µl de peroxidasa (0.2615 mg/ml de peroxidasa de rábano en PBS 1X) y 100 µl de o-fenilendiamina (0.4 mg/ml o-fenilendiamina en buffer PBS 1X).

4.- Se siguen los pasos 4 a 9 de la técnica para determinar H₂O₂ intracelular.

1.2.5 Medición de la actividad de aconitasa en *R. etli* CE3 (Modificación de Dingman y Sonenshein, 1987)

1.- Se obtiene una pastilla celular de mediante centrifugación 10 min. a 4 °C y 15300 rcf.

2.-La pastilla se disuelve en 1 ml de buffer frío de buffer tris-base 50 mM pH 6.8 con 0.1 mM de MgCl₂ y se coloca en un tubo eppendorf, se centrifuga en una microcentrífuga refrigerada a 5 °C, durante 3 min a 16100 x g, se decanta el sobrenadante y se resuspende en 500 µl del mismo buffer.

3.-La suspensión bacteriana se sonica con 3 pulsos en frío con reposo de 5 minutos, durante 45 segundos cada vez con una amplitud de 12 micrones (Soniprep 150, SANYO, MSE, UK).

4.-Se obtiene la fracción soluble del extracto mediante centrifugación como en el paso No. 2, durante 10 min., se separa el sobrenadante en un tubo previamente etiquetado y frío.

5.-En una celda de cuarzo se colocan 875 µl de buffer, se agrega 100 µl del sustrato D-L isocitrato (Sigma I-1252) de 200 mM en buffer tris-base 50 mM pH 8 con 0.1 mM. de MgCl₂, y 12 µl del extracto bacteriano. Para el blanco se colocan 900 µl de buffer y 100 µl de sustrato.

6.-Se calibra el espectrofotómetro con el blanco a una longitud de onda de 240 nm. Las muestras se leen durante 1 min. a intervalos de 10 segundos en el espectrofotómetro DU 7500, Beckman, USA.

7.- Para calcular la actividad, se divide el incremento por minuto de la densidad óptica entre el coeficiente de extinción molar de 3.6 mM⁻¹. cm⁻¹. Se divide entre la proteína en mg., definiendo a una unidad de actividad (U) como 1 µmol de cis-aconitato/min⁻¹. mg⁻¹ de proteína.

1.3 Resultados y discusión de la relación del estrés oxidativo con la síntesis de la TPP.

1.3.1 Síntesis de la TPP en la mutante sin catalasa *katG*⁻ de *R. etli* CE3.

La mutante *katG*⁻ tiene afectada la velocidad de crecimiento en SA, siendo mayor este fenotipo en el segundo subcultivo en SA comparado con SAB, (Fig. 8). En la misma figura se puede observar que la tiamina o la biotina estimularon el crecimiento de la mutante *katG*⁻ como en la cepa *R. etli* CE3, también se puede observar que la presencia de la tiamina previno la fase de retardo del crecimiento de la mutante *katG*⁻.

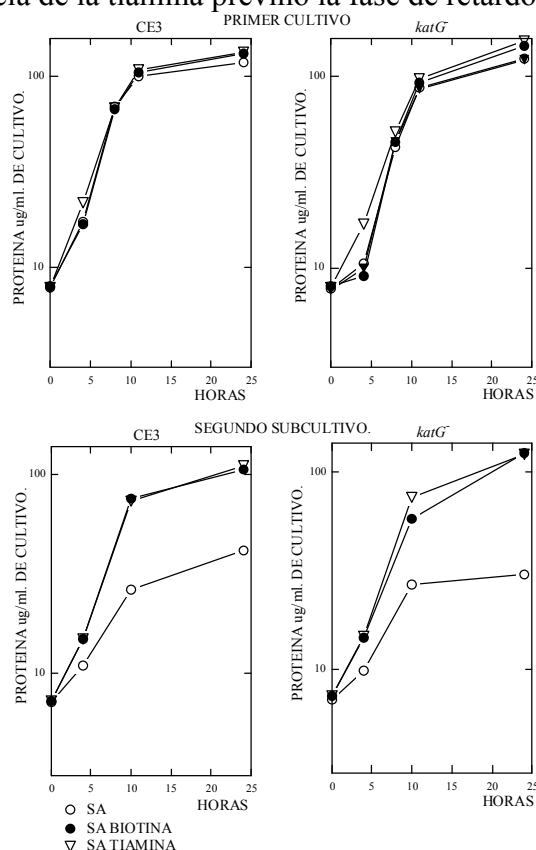


Figura 1 Crecimiento de la cepa *R. etli* CE3 y la mutante *katG*⁻ en medio mínimo succinato amonio (SA) suplementado con biotina o tiamina durante el primer y segundo subcultivo a 30 °C y 200 rpm.

La mutante *katG*⁻ contiene aproximadamente 2 veces más H₂O₂ con relación a la cepa CE3 y excreta aproximadamente 4 veces más H₂O₂ al medio que la cepa *R. etli* CE3 a las 5 horas del primer cultivo en SA (Fig. 9), es probable que la excreción de H₂O₂ al medio sea una de las estrategias para evitar o disminuir el daño oxidativo en la mutante *katG*⁻, sin embargo la presencia de glutatión exógeno no disminuyó el nivel de H₂O₂ ni mejoró el crecimiento de la mutante o de la cepa silvestre *R. etli* CE3 (datos no presentados).

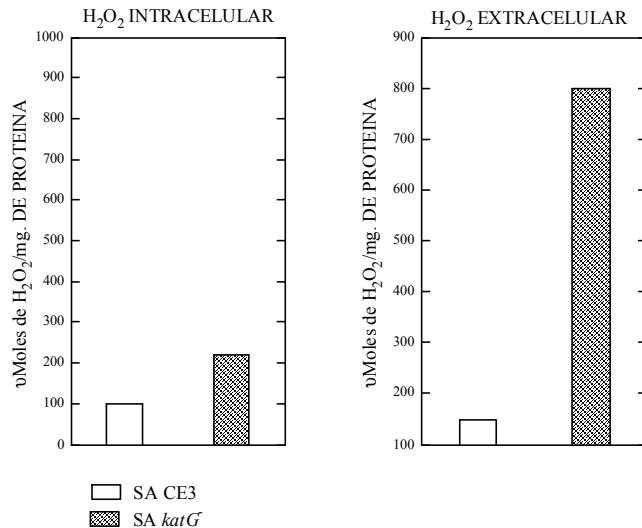


Figura 2 Comparación de los niveles de H₂O₂ intra y extracelulares de la cepa *R. etli* CE3 y la mutante *katG* en SA a las 5 horas de crecimiento a 30°C y 200 rpm.

Se sugiere además que el estrés oxidativo podría estar afectando la actividad de la PDH. Esta actividad está más baja en la cepa *katG* que en la cepa *R. etli* CE3 en SA a las 8 horas del primer cultivo en el ensayo con TPP (este ensayo enzimático se llama completo y permite determinar la cantidad total de PDH), probablemente la PDH se está oxidando en la cepa mutante *katG*. La suplementación de la tiamina al SA regula negativamente la cantidad de PDH como se observa a las 8 horas del primer cultivo en el ensayo de la actividad enzimática sin TPP (este ensayo sin TPP permite ver la actividad de PDH con la TPP que la bacteria tiene) (fig. 10). En el segundo subcultivo la cepa *katG* en SA y SA+tiamina sobre-expresó la PDH en el ensayo con TPP (ensayo completo) comparado con la cepa silvestre *R. etli* CE3. En el ensayo sin TPP en el segundo subcultivo la presencia de la tiamina en el SA ya no reguló a la baja el nivel de la PDH como en el primer subcultivo. Es importante destacar que en el segundo subcultivo, en el ensayo sin TPP en SA se observó un nivel más bajo de PDH en la *katG* comparado con la cepa silvestre CE3, lo que sugiere que el estrés oxidativo está afectando moderadamente la síntesis de la tiamina.

La actividad de PDH en una condición más oxidante, a las 8 horas del primer cultivo a 300 revoluciones por minuto (rpm), lo que probablemente genere una condición más oxidante y con ello el incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno (Fig. 11), en la cepa *katG* en SA con el ensayo sin TPP presenta menor actividad de PDH que la cepa *R. etli* CE3, y que en la mutante *katG* cultivada en SAB, la biotina incrementó la síntesis de PDH en el SA en el ensayo sin TPP, es notable que el incremento de las rpm también afectó el nivel de la PDH en la cepa silvestre (Fig. 10-11), debido probablemente a la sensibilidad del centro Fe-S del ácido lipoico el cual es componente del complejo de la PDH (Taté *et al.*, 1997). Estos datos indican que la biotina o la tiamina estimulan el crecimiento de la cepa *katG* en SA (Fig. 8).

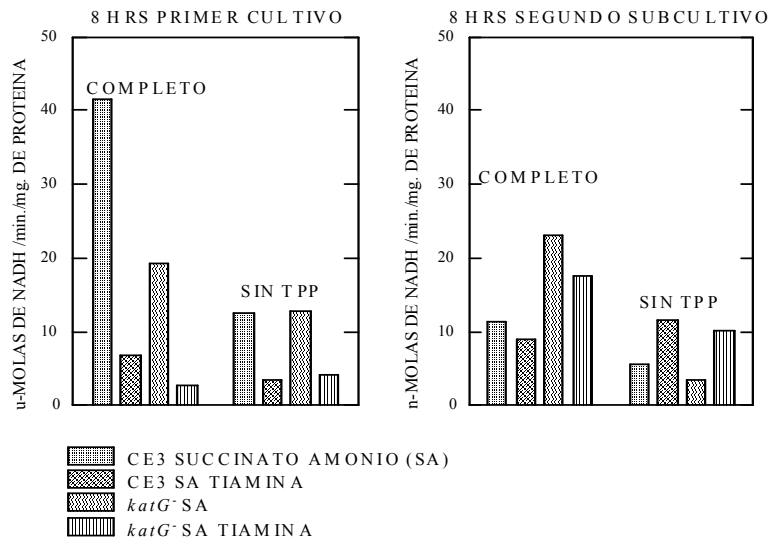


Figura 3 Actividad de piruvato deshidrogenasa con TPP (ensayo completo) y sin TPP de la cepa *R. etli* CE3 y la mutante *katG⁻* en succinato amonio con tiamina a las 8 horas durante el primer cultivo y segundo subcultivo en SA a 30 °C y 200 rpm.

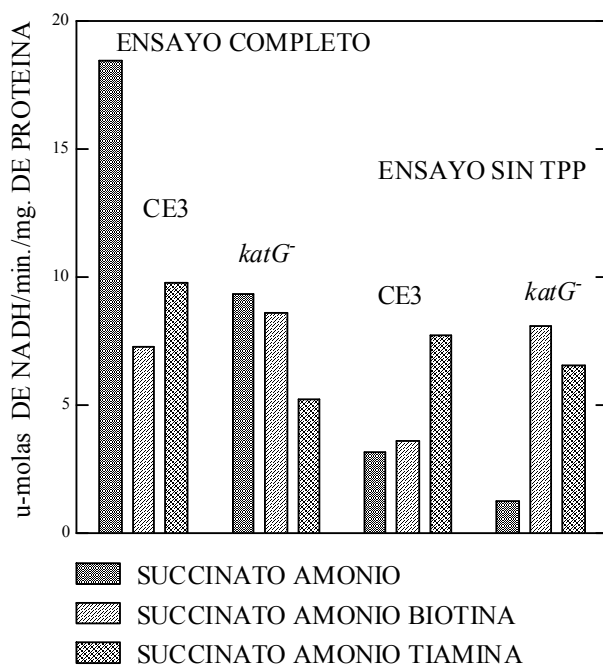


Figura 4 Actividades de piruvato deshidrogenasa de la cepa *R. etli* CE3 y la mutante *katG⁻* a las 8 horas del primer cultivo en SA con biotina o tiamina a 30 °C y 300 rpm.

Anteriormente se ha reportado que la aconitasa es un blanco de estrés oxidativo (Storz e Imlay, 1999). Para obtener evidencia de daño oxidativo en la cepa *katG⁻*, se midió la actividad de la aconitasa en el primer subcultivo (Fig. 12). Es notable el daño oxidativo de la cepa *katG⁻* en relación con la cepa *R. etli* CE3 ya que presentó niveles más bajos de actividad de aconitasa en SA y SAB. Los niveles de actividad de la aconitasa fueron aún más bajos a las 8 horas del segundo subcultivo (datos no presentados).

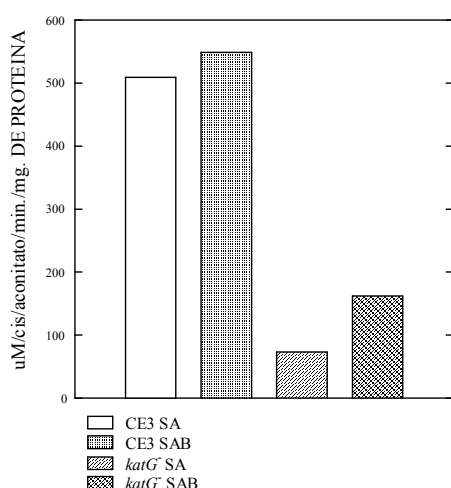


Figura 5 Actividades de aconitasa de la cepa *R. etli* CE3 y la mutante *katG* en SA con biotina a las 8 horas del primer cultivo a 30 °C y 200 rpm.

1.3.2 Contenido de TPP en la mutante *katG*.

Se realizó la determinación directa del contenido intracelular de TPP en las cepas *R. etli* CE3 y la mutante sin catalasa *katG*, las cepas se cultivaron en SA y SA suplementado con tiamina mas biotina (SA tiamina-biotina), las 24 horas se refiere al final del primer cultivo y las 32 horas son las 8 horas del segundo subcultivo, (Fig. 13). En SA tiamina-biotina a las 24 horas y a las 32 horas se observó que la cepa *katG* contiene menos TPP que la cepa *R. etli* CE3, probablemente la mutante está oxidando la TPP debido a una mayor oxidación de proteínas, se sabe además que la TPP se oxida por la presencia de peróxido de hidrógeno en condiciones *in vitro* (Lukienko *et al.*, 2000).

Las cepa *katG* sintetizó TPP en menor cantidad a las 32 horas en SA que la cepa *R. etli* CE3. Estos datos muestran que el estrés oxidativo de la mutante *katG* afectó la síntesis de la tiamina, probablemente la proteína ThiC se está oxidando más en la mutante que en la cepa *R. etli* CE3, si bien solo se ha reportado que es sensible al oxígeno (Martinez-Gomez y Downs., 2008), es posible que el daño de la actividad de la aconitasa esté disminuyendo el flujo de carbono, lo que también podría estar disminuyendo la síntesis y acumulación de TPP.

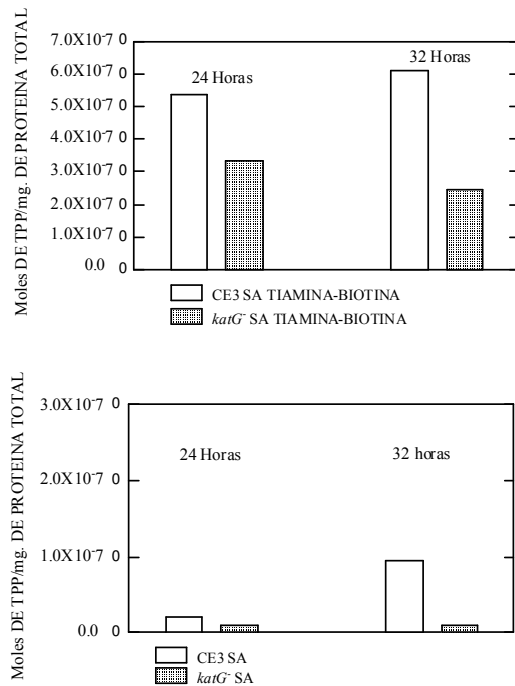


Figura 6 Niveles endógenos de tiamina pirofosfato (TPP) en la cepa *R. etli* CE3 y *katG*⁻ cultivadas en SA con biotina-tiamina y SA a las 24 horas del primer cultivo y a las 32 horas (las 32 horas son las 8 horas del segundo subcultivo) a 30 °C y 200 rpm.

1.3.3 Resultados y discusión de la disminución de la oxidación de carbono y su relación con la síntesis de la TPP.

1.3.3.1 La síntesis de la TPP en la mutante *phbC*⁻ de *R. etli* CE3.

El contenido de TPP de la cepa SAM100 *phbC*⁻ a las 24 horas fue semejante al observado en la cepa *R. etli* CE3, a las 32 horas en SA tiamina-biotina el contenido de TPP de la mutante SAM100 *phbC*⁻ disminuyó (Fig. 14).

En tanto a las 24 del primer cultivo y 32 horas del segundo subcultivo en SA la mutante SAM100 *phbC*⁻ disminuyó notablemente su contenido de TPP comparado con la cepa *R. etli* CE3 (Fig. 14). Esta mutante no tiene afectado el nivel de actividad de aconitasa (datos no presentados), si bien, el nivel de piruvato carboxilasa en SA es bajo, correlacionando con el nivel de transcripción de la fusión *pyc*::*gusA* (*pyc* es piruvato carboxilasa en inglés) de 47% respecto de la cepa silvestre (Dunn *et al.*, 2002), así mismo, la síntesis de la biotina también se observa disminuída, (Dunn, M. F. datos no publicados). Es importante mencionar que ésta cepa no puede crecer con otras fuentes de carbono como piruvato o glucosa, es decir que no puede crecer en fuentes de carbono glucolíticas, la cepa SAM100 *phbC*⁻ presenta niveles bajos de PDH en piruvato amonio y se ha reportado que ésta enzima se inhibe por acumulación de NADH (Cevallos *et al.*, 1996). Por lo que la acumulación de NADH probablemente disminuye la oxidación de carbono y con ello la síntesis y demanda de TPP en la cepa SAM100 *phbC*⁻.

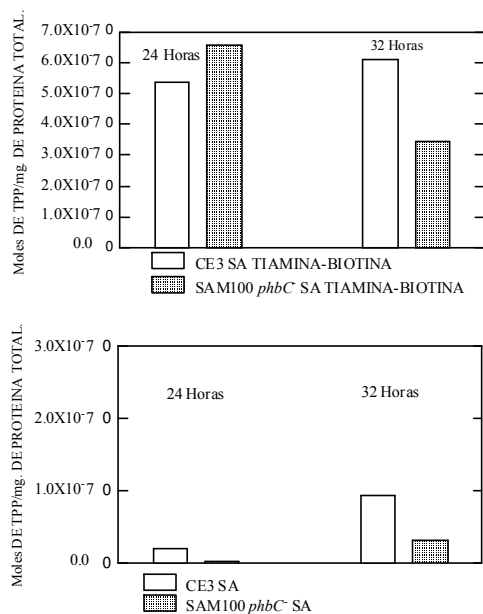


Figura 7 Niveles endógenos de tiamina pirofosfato (TPP) en la cepa *R. etli* CE3 y SAM100 *phbC*⁻ cultivadas en SA con tiamina+biotina y SA a las 24 horas del primer cultivo y a las 32 horas (las 32 horas corresponde a 8 horas del segundo subcultivo) a 30 °C y 200 rpm.

1.3.4 Resultados con discusión de la suplementación de piridoxal-HCl y su relación con la síntesis de la TPP.

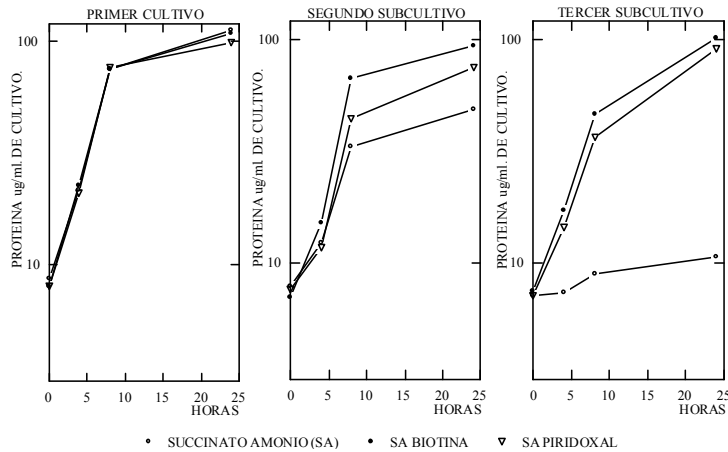
1.3.4.1 Efecto de la suplementación del piridoxal-HCl sobre el crecimiento de la cepa *R. etli* CE3 en succinato-amonio (SA) y piruvato-amonio (PA).

La cepa *R. etli* CE3 fue capaz de crecer en SA suplementado con 10 ug/ml de piridoxal-HCl durante los 3 subcultivos con una velocidad y rendimientos semejantes a los de MM suplementado con biotina (Fig. 15). Es probable que la limitación de TPP (Taboada *et al.*, 2008), también esté afectando la síntesis de piridoxal fosfato, el efecto de este cofactor en el metabolismo de la cepa *R. etli* CE3 probablemente se debe a que contribuye a una mejor distribución del carbono de manera directa o indirecta en las vías metabólicas, y con esto, a la síntesis de la tiamina y la biotina, las cuales requieren piridoxal fosfato para su síntesis (Fig. 7).

El efecto de la suplementación de piridoxal-HCl también se analizó en medio mínimo con piruvato como fuente de carbono (PA) (Fig. 16), dado que existen diferencias notables en el metabolismo de medio mínimo SA comparado con PA en la cepa *R. etli* CE3. Una de estas es que en PA la cepa *R. etli* CE3 ya no crece en el segundo subcultivo, mientras que en SA crece alrededor del 40 % con respecto del primer cultivo (Fig. 15-16). Otra notable diferencia es que la síntesis y acumulación de uno de los productos de fermentación del metabolismo de *Rhizobium*, el PHB, es muy elevada en PA en el primer cultivo mientras que es gradual su síntesis y acumulación durante los 3 subcultivos en SA (Encarnación *et al.*, 1995). Estas diferencias, entre otras, supone que los flujos de carbono sean diferentes en SA y PA.

Fue relevante que la cepa *R. etli* CE3 en PA suplementado con piridoxal-HCl mantuvo el crecimiento durante el segundo y tercer subcultivo, si bien con una

velocidad y rendimientos menores que en PA con biotina, pero significativamente mayores con respecto del control en PA (Fig. 16). Es probable que la acumulación del PHB en PA-piridoxal-HCl sea menor que en PA y que el acetil-CoA esté entrando al ciclo de Krebs, lo que conlleva que éste aporte mas carbono para vías anabólicas y exista una mayor distribución de carbono en las vías metabólicas, lo que aumentaría la síntesis de las vitaminas tiamina y biotina.



Crecimiento de la cepa *R. etli* CE3 en SA con biotina y SA con piridoxal-HCl a 30 °C y 200 rpm.

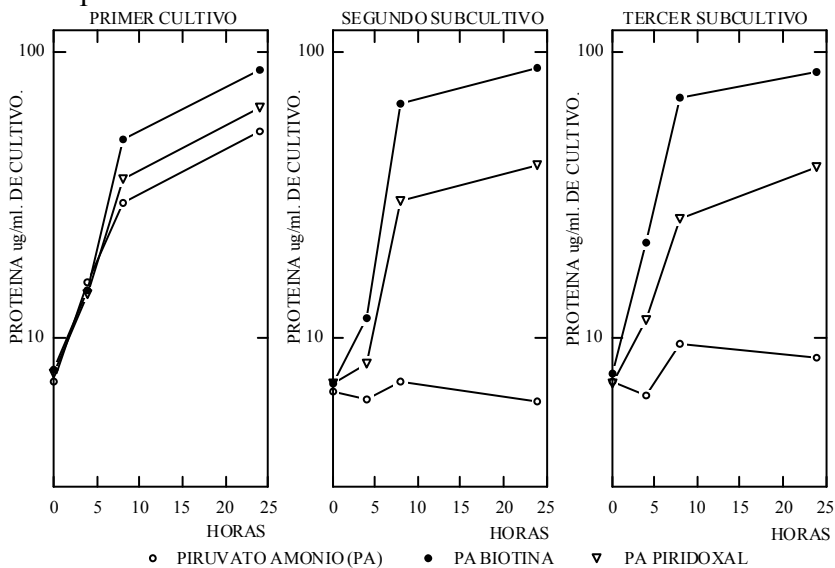


Figura 8 Crecimiento de la cepa *R. etli* CE3 en piruvato amonio con biotina o piridoxal-HCl a 30 °C y 200 rpm.

1.3.5 Resumen de la discusión capítulo III. Relación de la síntesis de la tiamina con el estrés oxidativo, la disminución de la oxidación de carbono y la suplementación de piridoxal-HCl.

El contenido de TPP en la cepa *katG* es menor con relación a la cepa *R. etli* CE3 en SA con tiamina biotina. Es probable que la tiamina en la cepa *katG* se esté oxidando por la presencia de ROS's. De acuerdo con lo anterior, se ha reportado en estudios *in vitro* que la tiamina en presencia de peroxidasa de rábano con H₂O₂ se oxida a tiocromo y disulfuro de tiamina (Lukienko *et al.*, 2000). Podría además deberse a que la cepa

katG tenga sus sistemas de reparación y biosíntesis más elevados que la cepa *R. etli* CE3, debido a una mayor oxidación, lo que le demandaría un mayor consumo de TPP. Es probable además, que el flujo de carbono en la mutante *katG* este disminuido, ya que presenta niveles muy bajos de actividad de aconitasa (Fig. 12) y piruvato deshidrogenasa (probablemente porque el ácido lipoico que contiene un centro 4F-4S que se une al componente E2 de la PDH y oxoglutarato deshidrogenasa (ODH) sea sensible a la oxidación (Taté *et al.*, 1997). Es posible que también las enzimas dependientes de TPP para la síntesis de aminoácidos aromáticos y de cadena larga sufran oxidación. La baja disposición de carbono puede estar afectando la síntesis de la TPP ya que la mutante SAM100 *phaC* con una capacidad de oxidación de carbono disminuida, debido a la disminución de la actividad de enzimas deshidrogenasas presenta un nivel bajo de TPP. La cepa SAM100 *phaC* tiene además niveles bajos de piruvato carboxilasa en SA y la síntesis de la biotina está disminuida (Dunn *et al.*, 2002).

Por lo tanto, las mutantes *katG* y SAM100 *phbC*, permiten establecer una correlación de la disminución de la oxidación de carbono con la disminución de la síntesis de la TPP, lo que apoya la hipótesis de que en la cepa *R. etli* CE3, la disminución de la síntesis de la TPP se debe a una disminución de carbono en las vías metabólicas, probablemente de carbono gluconeogénico (Fig. 6) entre otros.

El piridoxal-HCl participa como cofactor en muchas reacciones del metabolismo de carbono, aumentando actividades de enzimas transaminasas y transulfurasas entre otras, lo que sugiere una mayor distribución de carbono en las distintas vías metabólicas, a nivel puntual es claro que se requiere piridoxal para la síntesis de la tiamina y la biotina, y que la limitación de TPP muy probablemente también esté limitando la síntesis de piridoxal fosfato, ya que se requiere TPP para su síntesis (dxs-TPP) (Fig. 7). Es notable que el efecto metabólico favorable de la tiamina y la biotina se debe a la entrada de carbono directa al ciclo de Krebs, debido al incremento de la actividad de la PDH y piruvato carboxilasa, respectivamente (Fig. 3) (Encarnación *et al.*, 1995), mientras que el efecto del piridoxal fosfato es en una mayor diversidad de reacciones y vías metabólicas distribuyendo de manera mas eficiente el carbono que en SA, si bien el crecimiento es menor comparado con SAB, lo que apoya la propuesta de que la limitación de la síntesis de la tiamina, cuyo papel es central en el metabolismo en SA (Fig. 7) se debe a una disminución del flujo de carbono durante el metabolismo fermentativo de la cepa *R. etli* CE3.

1.3.6 CONCLUSIONES CAPITULO III. Relación de la síntesis de la tiamina con el estrés oxidativo, la disminución de la oxidación de carbono y la suplementación de piridoxal-HCl.

1.- La mutante *R. etli* VEM1673 *katG::Tn5* en SA a las 8 horas del segundo subcultivo presentó niveles de TPP significativamente bajos con respecto a la cepa *R. etli* CE3. Probablemente se debe a que: ésta cepa está sometida a daño oxidativo y la reparación de éste aumenta la demanda de TPP, a la disminución de la oxidación de carbono en el ciclo de Krebs debido al daño oxidativo de la aconitasa o a que la TPP se está oxidando por el incremento de H₂O₂ intracelular y extracelular.

2.- La cepa *R. etli* SAM100 *phbC* en SA a las 8 horas del segundo subcultivo presentó niveles bajos de TPP con respecto a la cepa *R. etli* CE3. Probablemente se debe a la disminución de la oxidación de carbono provocado por la acumulación de nucleótidos reducidos.

3.- El piridoxal-HCl estimuló el crecimiento en subcultivo de la cepa *R. etli* CE3 en SA y PA si bien en PA con una eficiencia menor que la biotina. Es importante que se requiere TPP para su síntesis y que la limitación de TPP conlleva la limitación de este cofactor. Es probable que el piridoxal-HCl estimule el flujo de carbono en distintas vías biosintéticas debido a que es importante en reacciones de transaminación y transulfuración, además, se requiere para la transulfuración en la síntesis de la tiamina y biotina y adicionalmente una transaminación para la síntesis de la biotina.

1 CONCLUSIONES GLOBALES.

El contenido de TPP de la cepa de *R. etli* CE3 en SA fue de 36% comparado con SAB durante el segundo subcultivo, por lo que se propone que la limitación de tiamina determina la transición del metabolismo aeróbico a fermentativo. Es relevante que durante este período la bacteria en SA incrementó la transcripción de los genes para la síntesis de la tiamina *thiC*, *thiEb* y *thiD*, así como la actividad de la PDH (Taboada *et al.*, 2008), es decir que como respuesta ante la limitación de TPP, la bacteria sobre-expresa los genes para su síntesis, siendo la elevación de la transcripción una respuesta probablemente mas general ante una limitación de carbono, los datos de los transcriptomas de SA-SAB y SA-SAT apoyan ésta propuesta, ya que el incremento de las actividades de fusiones a los genes para la síntesis de la tiamina concuerda con la elevación de la transcripción de estos genes, así como de los genes de la PDH en SA. La sobre-expresión de 2 operones para la síntesis de la tiamina; *thiCOSGE* y *thiMEeD* supone que existe una limitación de sustratos de carbono para la síntesis de la TPP, mas que una limitación de la síntesis de la tiamina por una regulación genética negativa. Se sabe que *R. etli* CE3 no es un auxótrofo de tiamina ya que es capaz de crecer en SA suplementado con biotina, ácido pimélico (es precursor de la síntesis de la biotina), fumarato con malato (son intermediarios del ciclo de Krebs), glutamina (glutámico y glutamina son donadores del nitrógeno), prolina (Puede dar glutámico y glutamina), AMPc (no se sabe su papel en *Rhizobium*), así como oxígeno (Encarnación *et al.*, 1995; Guillén-Navarro *et al.*, 2005b).

R. etli CE3 no tiene los genes *thiF*, *thiL* y *apbE* para la síntesis de la tiamina, es muy probable que se requiera el reclutamiento de enzimas con estas funciones homólogas, las cuales probablemente tengan constantes de afinidad mas altas comparadas con las enzimas clásicas (Morett *et al.*, 2003), que en condiciones de bajo flujo de carbono, debido a la oxidación incompleta del carbono, como en el metabolismo fermentativo, probablemente disminuya aún mas la eficiencia de su síntesis.

Se requiere TPP para la síntesis de TPP, lo que adicionalmente impone restricciones a su propia síntesis. Se requiere TPP para la síntesis del piridoxal, como consecuencia piridoxal fosfato probablemente también sea limitante, la función del piridoxal es muy ubicua en el metabolismo del carbono en las bacterias.

Los sustratos de carbono para la síntesis del tiazol de la tiamina; gliceraldehído 3P y piruvato, así como los de la parte pirimidina; el ácido amino-imidazol ribósido, AIR, provienen de la vía gluconeogénica, probablemente en ésta vía disminuya el flujo de carbono durante la fase fermentativa de crecimiento de la cepa *R. etli* CE3. La fuente de carbono para el crecimiento de la cepa *R. etli* CE3 en SA es el ácido succínico, por lo que ésta cepa requiere de la gluconeogénesis para la síntesis de una gran cantidad de metabolitos tales como; purinas, pirimidinas, azúcares, NADPH, la eritrosa 4P para la síntesis de los aminoácidos aromáticos, así como los precursores ya mencionados para la síntesis de la tiamina.

La actividad de la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa de la vía de gluconeogénesis está disminuida durante la fase fermentativa de *R. etli* CE3 en SA, mientras que está elevada en SAB (Encarnación *et al.*, 1995), lo que sugiere que el carbono gluconeogénico probablemente está limitado durante el metabolismo

fermentativo. Por tanto se propuso que en *R. etli* CE3, la limitación de la síntesis de la TPP durante la fase fermentativa se debe a la limitación de carbono gluconeogénico, ya que en SA solo el gen *zwf1* de la vía de las pentosas fosfato fue sobre-expresado significativamente, mientras que en SAB se elevó la transcripción de un mayor número de genes para el metabolismo de purinas: *iunH2*, *purF* y pirimidinas *dht*, *carA*, así como los genes relacionados con el carbono gluconeogénico *nadA*, *hisI*, *phhA* y *dht*.

De Igual manera los datos del transcriptoma en SA indican que está elevada la transcripción del operón *bioMNY* para el transporte de la biotina en contraste con SAB lo que indica que la biotina es limitante en SA, de acuerdo con resultados previamente publicados en donde la transcripción del operón para el transporte de biotina se eleva en SA y se reprime en presencia de biotina (Guillén-Navarro *et al.*, 2005a). Por lo anterior, además de la tiamina y el piridoxal fosfato, la biotina también es limitante durante el metabolismo fermentativo de la cepa *R. etli* CE3 (Dunn *et al.*, 1996).

La cepa *R. etli* CE3 crece óptimamente en SAB, de acuerdo con esto, en el experimento de transcriptoma de SA-SAB, en SAB se elevó la transcripción de varios genes para la síntesis de metabolitos que requieren carbono gluconeogénico, tales como: purinas, pirimidinas, aminoácidos, nicotinato y nicotinamida. Así como genes para la regulación de la asimilación del amonio, un alto número de genes para la síntesis de pared y membrana, genes para el procesamiento del RNAr y el factor sigma70. Es relevante además, que cuando se comparó en el experimento de transcriptoma las condiciones de SA y SAT, en SA se elevó la transcripción de 3 genes para la síntesis de purinas y uno de histidina, los cuales tienen como precursor común, el fosforibosil pirofosfato, además de 2 genes para la síntesis de aminoácidos aromáticos, cuyo precursor, eritrosa 4P, la cual se produce en la vía de las pentosas fosfato, lo que sugiere que el flujo de este carbono está disminuido en la cepa *R. etli* CE3 durante la fase fermentativa.

En contraste, cuando se comparó en un experimento de transcriptoma las condiciones de SA y SAT, en SAT, que es una condición de metabolismo aeróbico, la cepa *R. etli* CE3 sobre-transcribió 2 genes para la gluconeogénesis, así como el gen *rbsK* que codifica para la ribosa quinasa, lo que nos indica que en SAT la gluconeogénesis está funcionando mas eficientemente que en SA, además, se elevó la transcripción de 2 genes para la síntesis del piridoxal fosfato, cuya función es relevante en las reacciones de transulfuración para la síntesis de la biotina y la tiamina entre otras.

No se encontraron genes sobre-expresados comunes para ambas condiciones, SAB y SAT, a pesar de que son condiciones aeróbicas, es muy probable que estas vitaminas aumenten el flujo de carbono de manera distinta, así por ejemplo la tiamina en contraste con la biotina aumentó la transcripción en genes para vías que dependen de TPP, como la vía de síntesis de aminoácidos aromáticos, aminoácidos ramificados, la vía de las pentosas (con ello la vía de gluconeogénesis), la síntesis de aminoácidos de la familia del aspártico y piridoxal fosfato, un gen de la vía de síntesis de la ubiquinona, la vía de transulfuración. En contraste la biotina estimuló la transcripción de genes para la síntesis de ácidos grasos y la síntesis de membranas.

Además de la gluconeogénesis, es relevante la síntesis de metionina, treonina y lisina pertenecientes a la familia del aspártico, la cual depende del carbono gluconeogénico, ya que se encontraron genes sobre-transcritos en ambas condiciones

del transcriptoma SA-SAB y solo en SAT del transcriptoma SA-SAT (pero no en SA) (Fig. 4). Es probable que el flujo de carbono en ésta vía de síntesis tenga implicaciones regulatorias sobre el metabolismo de *R. etli* CE3, ya que la suplementación de estos tres aminoácidos no mantiene el crecimiento aeróbico (datos no mostrados), como si la saturación de carbono en ésta vía tuviese efectos negativos, pero sí la homoserina, la cual es intermediario de ésta vía metabólica (Encarnación *et al.*, datos no publicados; datos no mostrados), por lo que un incremento mediante suplementación o una probable disminución de flujo de carbono en ésta vía en SA, disminuye el crecimiento.

Se analizó la síntesis de la TPP en mutantes que no son en genes de la síntesis de la tiamina, específicamente en la cepa mutante *R. etli* VEM1673 en el gen de la catalasa *katG*, (Vargas *et al.*, 2003), el nivel de la TPP es bajo a las 8 horas del segundo subcultivo en comparación con la cepa *R. etli* CE3, es probable que ésta mutante con una muy baja actividad de aconitasa, entre otras enzimas, tenga afectada la oxidación de carbono en el ciclo de Krebs, lo que probablemente disminuya el flujo de carbono de manera generalizada afectando con ello la eficiencia de síntesis de la TPP.

Así mismo, la mutante SAM100 *phbC*⁻ (Cevallos *et al.*, 1996) que tiene afectada la síntesis del polímero polibetahidroxibutirato, la cual acumula nucleótidos reducidos y tiene disminuida la oxidación del carbono porque la actividad de las deshidrogenasas del ciclo de Krebs están disminuidas (Dunn, M. F. 1998). La cepa SAM100 *phbC*⁻ presentó niveles muy bajos de TPP comparada con la cepa *R. etli* CE3. El análisis del nivel de la TPP en estas dos mutantes permitió comprobar que la disminución de la oxidación de carbono afectó la síntesis de la TPP, en analogía con la cepa silvestre donde se propone que la disminución del flujo de carbono limita la síntesis de la TPP pero con un fenotipo mas drástico en las mutantes, lo que permitió apoyar la hipótesis de que la cepa *R. etli* CE3 presenta una limitación de sustratos de carbono, probablemente gluconeogénico, debido a la fermentación, lo cual se caracteriza por la excreción al medio de aminoácidos e intermediarios de carbono del ciclo de Krebs, una incrementada acumulación de PHB y una alta agregación celular, etc., lo que se sugiere conduce a una limitada síntesis de la TPP, piridoxal fosfato y biotina.

2 PERSPECTIVAS.

1.- Cuantificar los reguladores transcripcionales sobre-transcritos en SA y SAB mediante PCR en tiempo real, con el propósito de confirmar los niveles de sobre-transcripción.

2.- Realizar mutantes en los reguladores transcripcionales sobre-transcritos en SA y SAB para conocer su función durante el crecimiento en SA, SAB y SAT.

3.- Cuantificar los metabolitos para establecer su relación con el incremento de la transcripción de los genes en vías tales como: la gluconeogénesis, la síntesis de aminoácidos de la familia del aspártico y la transulfuración.

1 LITERATURA CITADA.

Aguilar, O. M. y Grasso, Daniel H. 1991. The product of the *Rhizobium meliloti* *ilvC* is required for Isoleucine and valine synthesis and nodulation of alfalfa. *J Bacteriol.* 173:7756-7764.

Alexeev, D., Alexeeva, M., Baxter, R. L., Campopiano, D J., Webster, S. P., Sawyer, L. 1998. The crystal structure of 8-amino-7-oxononanoate synthase: a bacterial PLP-dependent, acyl-CoA-condensing enzyme. *J Mol Biol.* 284:401-419.

Allen, S., Zilles, J. L. y Downs D. M. 2002. Metabolic flux in both the purine mononucleotide and histidine biosynthetic pathways can influence synthesis of the hydroxymethyl pyrimidine moiety of thiamine in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol.* 184:6130-6137.

Beck B. J. y Downs, D. M. 1998. The *apbE* gene encodes a lipoprotein involved in thiamine synthesis in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* 180:885-891.

Begley T. P., Xi, J., Kinsland, C., Taylor, S. y McLafferty, F. 1999a. The enzymology of sulfur activation during thiamin and biotin biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol.* 5:623-9.

Begley, T. P., Downs, D. M., Ealick, S. E., McLafferty, F. W., Van Loon, A. P., Taylor, S., Campobasso, N., Chiu, H. J., Kinsland, C., Reddick, J. J., Xi, J. 1999b. Thiamin biosynthesis in prokaryotes. *Arch Microbiol.* 171:293-300.

Brewin, J., Downie, A. y Young, W. 1992. Nodule formation in legumes. En: Encyclopedia of Microbiology. Academic Press. Vol.3 pp. 239-248.

Calderón-Flores, A., Du pont, G., Huerta-Saquero, A., Merchant-Larios, H., Servín-González, L. y Duran, S. 2005. The stringent response is required for amino acid and nitrate utilization, Nod factor regulation, nodulation and nitrogen fixation in *Rhizobium etli*. *J Bacteriol.* 187:5075-5083.

Cevallos, M. A., Encarnación, S., Leija, A., Mora, Y. y Mora, J. 1996. Genetic and physiological characterization of a *Rhizobium etli* mutant strain unable to synthesize poly-beta-hydroxybutyrate. *J Bacteriol.* 178:1646-1654.

Cronan, J. J. E. 1989. The *Escherichia coli* *bio* operón: Transcriptional repression by an essential protein modification enzyme. *Cell.* 58:427-429.

Cummings L., Riley L., Black L., Souvorov A., Resenchuk S., Dondoshansky I. y Tatusova T. 2002. Genomic BLAST: custom-defined virtual databases for complete and unfinished genomes. *FEMS Microbiol Lett.* 5;216:133-8. National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20894, USA.

Dingman, D. y Sonenshein, A. 1987. Purification of aconitase from *Bacillus subtilis* and correlation of its N-terminal amino acid sequence of the *citB* gene. *J Bacteriol.* 169:3062-3067.

Dorrestein, P. C., Zhai, H., McLafferty, F. W. y Begley, T. P. 2004. The biosynthesis of the thiazole phosphate moiety of thiamin: the sulfur transfer mediated by the sulfur carrier protein ThiS. *Chem Biol.* 10:1373-81.

Dunn, M. 1998. Tricarboxylic acid cycle and anaplerotic enzymes in rhizobia. *FEMS Microbiol Reviews* 22:105-123.

Dunn, M. F., Araíza, G., Cevallos, M. A., Mora, J. 1997. Regulation of pyruvate carboxylase in *Rhizobium etli*. *FEMS Microbiol Lett.* 157:301-306.

Dunn, M. F., Encarnación, S., Araíza, G., Vargas, M. C., Dávalos, A., Peralta, H., Mora, Y., Mora, J. 1996. Pyruvate carboxylase from *Rhizobium etli*: mutant characterization, nucleotide sequence, and physiological role. *J Bacteriol.* 178:5960-70.

Dunn, F., Araíza, G., Finan, T. M. 2001. Cloning and characterization of the pyruvate carboxylase from *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. *Arch Microbio.* 176:355-363.

Dunn, M. F., Araíza, G., Encarnación, S., Vargas, M. del C. y Mora, J. 2002. Effect of *aniA* (Carbon flux regulador) and (Poly- β -hydroxybutyrate synthase) mutations on pyruvate metabolism in *Rhizobium etli*. *J bacteriol.* 184:2296-2299.

Elkan, G. 1992. Biological nitrogen fixation. En: Encyclopedia of Microbiology. Academic Press. Vol. pp. 285-291.

Encarnación S. Guzmán, Y., Dunn, M. F., Hernández, M., Vargas, Ma. Del C. and Mora, J. 2003. Proteome analysis of the aerobic and fermentative metabolism in *Rhizobium etli* CE3. *Proteomics.* 3:1077-1085.

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

Entcheva, P., Phillips, D. A. y Streit, W. R. 2002. Functional analysis of *Sinorhizobium meliloti* genes involved in biotin synthesis and transport. *Appl and Environ Microbiol.* 68:2843-2848.

Ferraioli, S., Taté, R., Cermola, M., Favre R., Iaccarino, M, y Patriarca, E. J. 2002. Auxotrophic mutant strains of *Rhizobium etli* reveal new nodule development phenotypes. *MPMI.* 15: 501-510.

Fontecave, M. y Ollagnier-de-Choudens, S. 2008. Iron-Sulfur biosíntesis in Bacteria: Mechanisms of cluster assembly and transfer. *Arch Biochem and Biophys.* doi:10.1016/J.abb.2007.12.014.

Frank, R. A., Titman, C. M., Pratap, J. V., Luisi, B. F. and Perham R. N. 2004. A molecular switch and proton wire synchronize the active sites in thiamine enzymes. *Science.* 306:872-876.

González, V., Santamaría, R. I., Bustos, P., Hernández-González, I., Medrano-Soto, A., Moreno-Hagelsieb, G., Janga, S. C., Ramírez, M. A., Jiménez-Jacinto, V., Collado-Vides, J. y Dávila, G., 2006. The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103:3834-3839.

Gralnick, J. y Downs, D. 2001. Protection from superoxide damage associated with an increased level of the YggX protein in *Salmonella enterica*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98:8030-8035.

Gralnick, J., Webb, E. y Downs, D. 2000. Lesions in *gshA* (encoding gamma-L-glutamyl-L-cysteine synthetase) prevent aerobic synthesis of thiamine in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* LT2. *J Bacteriol*. 182:5180-5187.

Granados-Baeza, M. J., Gómez-Hernández, N., Mora, Y., Delgado, M. J., Romero, D. y Girard, L. 2007. Novel reiterated Fnr-type proteins control the production of the symbiotic terminal oxidase *cbb3* in *Rhizobium etli* CFN42. *Mol Plant Microbe Interact*. 10:1241-1249.

Guillén-Navarro, K., Araíza, G., García-de los Santos, A., Mora, Y. y Dunn, M. F. 2005a. The *Rhizobium etli bioMNY* operón is involved in biotin transport. *FEMS Microbiol Lett*. 250:209-219.

Guillén-Navarro, K., Encarnación, S. y Dunn, M. F. 2005b. Biotin biosynthesis, transport and utilization in rhizobia. *FEMS Microbiol Lett*. 2005 246:159-165.

Hassani, R., Prasad, C. K., Vineetha, K. E., Vij, N., Singh, P., Sud, R., Yadav, S. y Randhawa, G. S. 2002. Symbiotic characterization of isoleucine+valine and leucine auxotrophs of *Sinorhizobium meliloti*. *Indian j Exp Biol*. 10:1110-1120.

Heinz, E. B., Phillips, D. A y Streit, W. R. 1999. BioS, a biotin-induced, stationary- phase, and possible LysR-Type regulator in *Sinorhizobium meliloti*. *MPMI*. 12:803-812.

Heinz, E. B. y Streit, W. R. 2003. Biotin limitation in *Sinorhizobium meliloti* strain 1021 alters transcription and translation. *Appl and Environ Microbiol*. 69:1206-1213.

Hofman, K., Heinz, E. B., Charles, T. C., Hoppert, M., Liebl Wolfgang and Streit, W. R. 2000. *Sinorhizobium meliloti* strain 1021 *bioS* and *bdhA* gene transcriptions are both affected by biotin available in defined medium. *FEMS Microbiol Lett*. 182:41-44.

Imamura, N. y Nakayama, H. 1982. *thiK* and *thiL* loci of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 151:708-717.

INEGI. 2005. Estados Unidos Mexicanos. II Censo de Población y Vivienda 2005., México.

Jain, R y Shapleigh, J. P. 2001. Characterization of *nirV* and a gene encoding a novel pseudoazurin in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3. *Microbiol.* 147:2505-2515.

Joo-Heon, P., Dorrestein, C. P., Zhai, H., Kinsland, C., Mc Lafferty, F. W. y Begley, T. P. 2003. Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin pyrophosphate (Vitamin B1). *Biochem.* 42:12430-12438.

Kambampati, R. y Lauhon, C. T. 2003. MnmA and IscS are required for in Vitro 2-thiouridine biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochem.* 42:1109-1117.

Kanehisa, M., Araki, M., Goto, S., Hattori, M., Hirakawa, M., Itoh, M., Katayama, T., 2008. KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Research.* 36:480-484.

Karunakaran. R., Ebert. K., Leonard M. E, Ramachandran, V. y Poole, P. S. 2006. Thiamine is synthesized by a salvage pathway in *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae strain 3841. *J Bacteriol.* 188: 6661-6668.

Kovács, L. G., Balatti, P. A., Krishnan, H. B., Pueppke, S. G. 1995. Transcriptional organization and expression of *nolXWBTUV*, a locus that regulates cultivar-specific nodulation of soybean by *Rhizobium fredii* USDA257. *Mol Microbiol.* 17:923-933.

Lawhorn, B. G., Mehl, R. A. y Begley, T. P. 2004. Biosynthesis of the thiamin pyrimidine: the reconstitution of a remarkable rearrangement reaction. *Org Biomol Chem.* 2:2538-2546.

Leonardi, R., Fairhurst, S. A., Kriek, M., Lowe, D. J., Roach, P. L. 2003. Thiamine biosynthesis in *Escherichia coli*: isolation and initial characterization of the *thiGH* complex. *FEBS Lett.* 539:95-99.

Lerouge, I., Verreth, C., Michielis, J., Carlson, R. W., Datta, A., Gao, M. Y., y Vanderleyden, J. 2003. Three genes encoding for putative methyl- and acetyltransferases map adjacent to the *wzm* and *wzt* genes and are essential for O-antigen biosynthesis in *Rhizobium etli* CE3. *Mol Plant Microb Interact.* 16:1085-1093.

Lowry, H., Rosebrough, J., Farr, L. y Randall, J. 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem.* 193:265-275.

Lukienko, P. I., Mel'nicenko, N. G., Zverinskii, I. V. y Zabrodskaya, S. V. 2000. Antioxidant properties of thiamine. *Bulletin of experimental biology and Medicine.* 130:303-305.

Martinez-Gomez, N. C., Matt, R. y Downs, D. M. 2004. Mutational analysis of ThiH, a member of the S-Adenosylmethionine (AdoMet) protein Superfamily. *J Biol Chem.* 279:40505-40510.

Martinez-Gomez, N. C. y Downs D. M. 2008. ThiC is an [Fe-S] cluster rprotein that requires Adomet to generate the 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine moiety in thiamin synthesis. *Biochemistry.* 47:9054-9056.

Melnick, J., Lis, E., Park, J-H., Kinsland, C., Mori, H., Baba, T., Perkins, J., Schyns, G., Vassieva, O., Osterman, A. y Begley, T. P. 2004. Identification of two missing bacterial genes involved in thiamine salvage: thiamine pyrophosphokinase and thiamine kinase. *J Bacteriol.* 186:3660-3662.

Mering, C., Jensen, L. J., Kuhn, M., Chaffron, S., Doerks, T., Krüger, B., Snel, B., Bork, P. 2007. STRING7—recent developments in the integration and prediction of protein interactions. *Nucl Acids Res.* 35 D358:D362.

Miranda-Ríos, J. 2007. The THI-box riboswitch, or how RNA binds thiamin pyrophosphate. *Structure.* 15:259-265.

Miranda-Ríos, J., Morera, C., Taboada, H., Dávalos, A., Encarnación, S., Mora, J. y Soberón, M. 1997. Expression of thiamin biosynthetic genes (*thiCOGE*) and production of symbiotic terminal oxidase *cbb₃* in *Rhizobium etli*. *J Bacteriol.* 179:6887-93.

Miranda-Ríos, J., Navarro, M. y Soberón, M. 2001. A conserved RNA structure (thi box) is involved in regulation of thiamin biosynthetic gene expression in bacteria. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 98:9736-9741.

Morett, E., Korbel, J. O., Rajan, E., Saab-Rincón, G., Olvera, L., Olvera, M., Schmidt, S., Snel, B. y Bork, P. 2003. Systematic discovery of analogous enzymes in thiamin biosynthesis. *Nat Biotechnol.* 7:790-795.

Morett, E., Saab-Rincón, G., Olvera, L., Olvera, M., Flores, H. y Grande, R. 2008. Sensitive genome-wide screen for low secondary enzymatic activities: the YjbQ family shows thiamin phosphate synthase activity. *J Mol Biol.* 376:839-53.

Mörtl, M., Diederichs, K., Welte, W., Molla, G., Motterans, L., Andriolo, G., Pilone M. S. y Pollegioni, L. 2004. Structure-function correlation in glycine oxidase from *Bacillus subtilis*. *J of Biol Chem.* 279:29718-29727.

Nakahigashi, K., Yanagi, H. y Yura, T. 2001. DnaK chaperone-mediated control of activity of a sigma (32) homolog (*rpoH*) plays a major role in the heat shock response of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol.* 183:5302-5310.

Neidhardt, F. C. 1996. *Escherichia coli* and *Salmonella*. Editado por: Curtiss III, R., Ingraham, J. L., Lin, C. C. E., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. y Umberger., E. Edición segunda, Vol. I., Impreso por La American Society of Microbiology, Washington, D. C., 1996. United States of America.

Neidle, E. L. y Kaplan, S. *Rhodobacter sphaeroides rdxA*, a homolog of *Rhizobium meliloti fixG*, encodes a membrane protein which may bind cytoplasmic [4Fe-4S] clusters. 1992. *J Bacteriol.* 174:6444-6454.

Nelson, D. L., y Cox, M. M. 2000. Lehninger Principles of Biochemistry, 3^a Edic. Ed, Worth publishers. N.Y. USA. pp. 545.

Newell, P. C., y Tucker, R. G., 1968. Biosynthesis of the pyrimidine moiety of thiamine. *Biochem J.* 106:279-287.

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

Park, J. H., Dorrestein, P. C., Zhai, H., Kinsland, C., McLafferty, F. W. y Begley, T. P. 2003. Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin pyrophosphate (vitamin B1). *Biochemistry.* 42:12430-12438.

Preisig, O., Zufferey, R. y Hennecke, H. 1996. The *Bradyrhizobium japonicum* *fixGHIS* genes are required for the formation of the high-affinity cbb₃-type cytochrome oxidase. *Arch microbiol.* 165:297-305.

Ramos, I., Vivas, E. I. y Dones, D. M. 2008. Mutations in the tryptophan operon allow PurF-independent thiamine synthesis by altering flux *in vivo*. *J Bacteriol.* 190:815-822.

Reyda M. R., Dippold, R., Dotson, M. E. y Jarret, J. T. 2008. Loss of iron-sulfur clusters from biotin synthase as a result of catalysis promotes unfolding and degradation. *Arch Biochem and Biophys.* 471:32-41.

Rovira, A. D. y Harris, J. R. 1961. Plant root excretions in relation to the rizosphere effect V. The exudation of B-group vitamins. *Plant Soil.* 14:199-214.

Schörken, U. y Sprenger, G. A. 1998. Thiamin dependent enzymes as catalysts in chemoenzymatic syntheses. *Biochim Biophys Acta.* 1385:229-43.

Schowen, R. L., 1998. Thiamin-dependent enzymes. En Comprehensive biological catalysis., Ed. Sinnott M., Vol 2., Academic Press., San Diego. pp. 217-266.

Schultze, M. y Kondorosi, A. 1998. Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu Rev Genet.* 32:33-57.

Schlüter, A., Nöhlen, M., Krämer, M., Defez, R., y Priefer, U. P. 2000, *The Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* *glnD* gene encoding a uridylyl transferase/uridylyl-removing enzyme, is expressed in the root nodule but is not essential for nitrogen fixation. *Microbiol.* 146:2987-2996.

Seaver, L. e Imlay, J. 2001. Hydrogen peroxide fluxes and compartmentalization inside growing *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 183: 7182-7189.

Server, L. C. e Imlay, J. A. 2004. Are respiratory enzymes the primary sources of intracellular hydrogen peroxide?. *J Biol Chem.* 279:48742-48750.

Settembre, E. C., Dorrestein, P. C., Park, J. H., Augustine, A. M., Begley, T. P. y Ealick, S. E. 2003. Structural and mechanistic studies on ThiO, a glycine oxidase essential for thiamin biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Biochemistry.* 42:2971-2981.

Sullivan, J. T., Trzebiatowski, J. R., Cruikshank, R. W., Gouzy, J., Brown, S. D., Elliot, R. M., Fleetwood, D. J., McCallum, N. G., Rossbach, U., Stuart, G. S., Weaver, J. E., Webby, R. J., de Bruijn, F. J. y Ronson, C. 2002. Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. *J Bacteriol.* 184:3086-3095.

Soberón, M., Membrillo-Hernández, G., Aguilar, G. R. y Sánchez, F. 1990. Isolation of cytochrome terminal oxidases *o* and *aa₃*. *J Bacteriol.* 172:1676-1680.

Storz, G. e Imlay, J. 1999. Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol.* 2:188-194.

Sprenger, G. A., Schörken, U., Wiegert, T., Grolle, S., De Graaf, A. A., Taylor, S. V., Begley, T. P., Bringer-Meyer, S. y Sahn, H. 1997. Identification of thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulosa 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin and pyridoxol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:12857-12862.

Streit, W. R y Phillips, A. D. 1996 Recombinant *Rhizobium meliloti* strains with extra biotin synthesis capability. *Appl Environ Microbiol.* 62:3333-3338.

Streit, W. R. and Entcheva, P. 2003. Biotin in microbes, the genes involved in its biosynthesis, its biochemical role and perspectives for biotechnological production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 61:21-23.

Streit, W. R., Joseph, C. M. y Phillips, D. A. 1996. Biotin and other water-soluble vitamins are key growth factors for alfalfa root colonization by *Rhizobium meliloti* 1021. *MPMI.* 9:330-338.

Stroupe M. E., Leech, H. K., Daniels, D. S., Warren, M. J. y Getzoff, D. E. 2003. CysG structure reveals tetrapyrrole-binding features and novel regulation of sirohemo biosynthesis. *Nat Struct Biol.* 10:1064-1073.

Sullivan, J., Brown, S., Yocum, R. y Ronson, C. 2001. The *bio* operon on the acquired symbiosis island of *Mesorhizobium sp.* Strain R7A includes a novel gene involved in pimeloyl-CoA synthesis. *Microbiology.* 147:1315-1322.

Taboada, C. H., Encarnación, S., Vargas, Ma del C., Mora, Y., Miranda-Ríos, J., Soberón, M. y Mora, J. 2008. Thiamine limitation determines the transition from aerobic to fermentative-like metabolism in *Rhizobium etli* CE3. *FEMS Microbiol Lett.* 279:48-55.

Taylor, S. V., kelleher, N L., Kinsland, C., Chiu, H. J., Costello, C. A., Backstrom, A. D., McLafferty, F. W. y Begley, T. P. 1998. Thiamin biosynthesis in *Escherichia coli* Identification of this thiocarboxylate as the immediate sulfur donor in the thiazole formation. *J Biol Chem.* 273:16555-165560.

Téllez-Sosa, J., Soberón, N., Vega-Segura, A., Torres-Márquez, M. E. y Cevallos, M. A. 2002. The *Rhizobium etli cyuC* product: characterization of a novel adenylate cyclase class. *J Bacteriol.* 184:3560-3568.

Uchiyama, I. 2003. MGD: Microbial genome database for comparative analysis. *Nucleic Acids Research*. 1:58-62.

Vargas, M. Del C., Encarnación, S., Dávalos, A., Reyes-Pérez, A., Mora, Y., García-de los Santos, A., Brom, S. y Mora, J., 2003. Only one catalase, *katG*, is detectable in *Rhizobium etli*, and is encoded along with the regulator OxyR on a plasmid replicon. *Microbiology*. 149:1165-1176.

Voet, D. y Voet, J. 1995. Biochemistry. 2ª Edic., Ed. John Wiley & sons. N. Y. USA. pp. 538-552; 541-548; 771-772.

von Mering, C., Jensen, L. J., Kunh, M., Chaffron, T. D., Krüger, B., Snel, B. y Bork, P. 2007. STRING 7--recent developments in the integration and prediction of protein interactions. *Nucl Acids Res*. 35:D358-D362.

Webb, E., Claas, K., Downs, D. M. 1997. Characterization of *thiI*, a new gene involved in thiazole biosynthesis in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*. 179:4399-4402.

Winkler, W., Nahvi, A. y Breaker, R. R. 2002. Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature*. 419:952-956.

Xi, J., Ge, Y., Kinsland, C., McLafferty, F. W. y Begley T. P. 2001. Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin in *Escherichia coli*: identification of an acyldisulfide-linked protein-protein conjugate that is functionally analogous to the ubiquitin/E1 complex. *Proc Natl Acad Sci*. USA. 98:8513-8518.

Zheng, L., White, R. H., Cash, V. L., Jack, R. F. R. y Dean, D, R. 1993. Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci*. USA. 90:2754-2758.

Zhang, Y., Taylor, S, V., Chiu, S, J. y Begley, T. P. 1997. Characterization of the *Bacillus subtilis thiC* operon involved in thiamine biosynthesis. *J of Bacteriol*. 179:3030-3035.