

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR  
DE LOS GENES INVOLUCRADOS EN EL TRANSPORTE  
DE BIOTINA EN *Rhizobium etli* CE3

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
P R E S E N T A :  
**GRISELDA KARINA GUILLÉN NAVARRO**

TUTOR: DR. MICHAEL DUNN GOELLI

CUERNAVACA, MORELOS

SEPTIEMBRE DEL 2005



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

# INDICE

	Página
<b>RESUMEN</b>	2
<b>ABSTRACT</b>	3
<b>INTRODUCCIÓN</b>	4
1. BIOTINA	
1.1 Generalidades	4
1.2 Genes involucrados en la síntesis de biotina	6
1.3 Síntesis de biotina	7
1.4 Origen de los precursores de biotina	8
2. SISTEMAS DE TRANSPORTE	
2.1 Clasificación de los sistemas de transporte	9
2.2 Transportadores tipo ABC	12
3. LA BIOTINA EN EL METABOLISMO DE <i>RHIZOBIUM</i>	15
<b>OBJETIVOS</b>	20
<b>RESULTADOS</b>	21
1. ARTÍCULO DE REVISIÓN:	
“Biotin biosynthesis, transport and utilization in rhizobia”	22
2. ARTÍCULO:	
“The <i>Rhizobium etli</i> <i>bioMNY</i> operon is involved in biotin transport”	29
3. RESULTADOS ADICIONALES	
3.1 Búsqueda de <i>bioB</i> por PCR e hibridación	40
3.2 Búsqueda de genes <i>bio</i> por mutagénesis al azar	41
3.3 Búsqueda de genes <i>bio</i> por complementación de mutantes	41
3.4 Expresión de la fusión GUS del promotor del <i>orf1</i>	42
3.5 Identificación de BPL en <i>R. etli</i> CE3	44
3.6 Ensayos de utilización de biotina <i>in vivo</i>	45
3.7 Búsqueda de genes <i>bio</i> en otros microorganismos	47
<b>DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS</b>	54
<b>CONCLUSIONES</b>	58
<b>REFERENCIAS</b>	59
<b>Abreviaturas</b>	65

## RESUMEN

Las rhizobia son bacterias capaces de fijar nitrógeno atmosférico en asociación simbiótica con una leguminosa compatible. *Rhizobium etli* fija nitrógeno en simbiosis con frijol. Este organismo, como otras rhizobia, debe 'diferenciarse' a una forma simbiótica (bacterioide) para poder fijar nitrógeno. En *R. etli* ocurre una diferenciación metabólica similar *in vitro*, durante la transición de un metabolismo aeróbico a uno tipo fermentativo. Hemos demostrado que la biotina tiene un papel importante en esta transición pues, además de su función como grupo prostético de las actividades carboxilasas, ésta ejerce un efecto global en la expresión de proteínas y en el metabolismo. Por esta razón enfocamos este proyecto a la búsqueda de genes involucrados en la biosíntesis y transporte de biotina en *R. etli*.

Usando diversas estrategias, determinamos que los genes ortodoxos de síntesis de biotina *bioF*, *bioD* y *bioB*, no están presentes en *R. etli*. Por complementación de una mutante *bioM* de *Sinorhizobium meliloti*, aislamos una región cromosomal de *R. etli* que codifica los homólogos de los genes *bioMNB* de *S. meliloti*, cuyos productos están implicados en la retención intracelular de biotina en este organismo. La interrupción de *bioM* en *R. etli* le provocó dificultad para acumular biotina durante el crecimiento y captó significativamente menos biotina que la cepa silvestre en los ensayos de transporte. Como en *S. meliloti*, *BioMN* de *R. etli* parecen ser los componentes ATPasa y permeasa, respectivamente, de un transportador tipo ABC. El *bioB* en realidad es similar a miembros de la familia BioY, que se ha propuesto que está involucrada en el transporte de biotina. Para evitar confusión con los *bioB* que codifican la biotina sintasa, en este trabajo al "*bioB*" de *S. meliloti* y su homólogo en *R. etli* se referirán como *bioY*.

La mutante *bioY* de *R. etli* transportó menos biotina que la cepa silvestre, lo que aporta la primera evidencia experimental para una función de BioY como una permeasa involucrada en el transporte de biotina. Un análisis del genoma de una amplia variedad de microorganismos, sugiere que su función de transporte podría operar independientemente de BioMN. También mostramos que el operón *bioMNY* se reprime transcripcionalmente por biotina. El análisis de competencia de la cepa silvestre con la mutante *bioM* mostró que la mutante tiene una menor capacidad para formar nódulos en plantas de frijol.

## ABSTRACT

Rhizobia are able to fix atmospheric nitrogen in symbiotic association with a compatible host legume. *Rhizobium etli* fixes nitrogen in symbiosis with common bean. This organism, like other rhizobia, must 'differentiate' to a symbiotic form (bacteroid) in order to fix nitrogen. A similar metabolic differentiation occurs in *R. etli* during the transition from an aerobic to a fermentative-like metabolism *in vitro*. We have shown that biotin has an important role in this transition because, aside from its role as the prosthetic group of several carboxylases activities, it exerts a global effect on protein expression and metabolism. We have thus focused our research on looking for genes involved in biotin biosynthesis and biotin uptake in *R. etli*.

Using diverse genetic approaches we ascertained that orthodox biotin biosynthetic genes *bioF*, *bioD* and *bioB*, are not present in *R. etli*. By complementation of a *Sinorhizobium meliloti bioM* mutant, we isolated an *R. etli* chromosomal region encoding homologs of the *S. meliloti bioMNB* genes, whose products have been implicated in intracellular biotin retention in that organism. Disruption of the *R. etli bioM* resulted in a strain defective in biotin accumulation during growth and which transported significantly less biotin than the wild type in biotin uptake assays. As in *S. meliloti*, the *R. etli* BioMN resemble the ATPase and permease components, respectively, of an ABC-type transporter. The *bioB* gene is in fact similar to members of the BioY family, which has been postulated to function in biotin transport. To avoid confusion with *bioB* genes encoding biotin synthases, we refer in this work to the *S. meliloti "bioB"* and its *R. etli* homolog as *bioY*.

An *R. etli bioY* mutant exhibited lower biotin uptake than the wild-type, providing the first experimental evidence for a role of BioY as a permease involved in biotin transport, and genome analysis of a wide variety of microorganisms suggests that its transport function could operate independently of BioMN. We show that the *bioMNY* operon is transcriptionally repressed by biotin. An analysis of the competitiveness of the wild-type strain versus the *bioM* mutant showed that the mutant had a diminished capacity to form nodules on bean plants.

# INTRODUCCIÓN

## 1. BIOTINA:

### 1.1 Generalidades

Las vitaminas son moléculas de diversa composición cuya principal actividad es funcionar como cofactores o grupos prostéticos en múltiples reacciones enzimáticas, donde se requieren en pequeñas cantidades. La biotina (Fig. 1), es una vitamina hidrosoluble perteneciente al complejo B. Su estructura fue determinada por Melville *et al.* en 1942 y desde entonces ha sido objeto de un sinnúmero de estudios. También se conoce como vitamina H, por la palabra alemana Haut: piel, que fue uno de los materiales de donde se extrajo (Streit y Entcheva, 2003), coenzima R por su capacidad de promover el crecimiento en aislados rhizobianos (West y Wilson, 1940) y vitamina B<sub>8</sub>. La biotina actúa como grupo prostético de enzimas que llevan a cabo reacciones de carboxilación (carboxilasas) dependientes de ATP y bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), en las que biotina funciona como el acarreador del carboxilo.

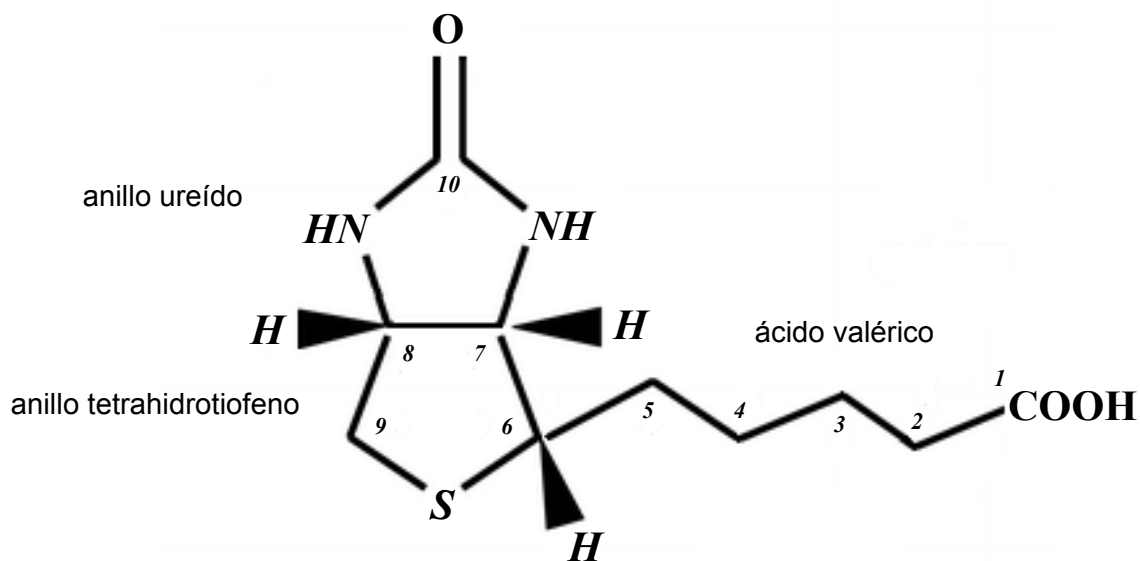


Figura 1. Molécula de biotina

Las carboxilasas se sintetizan como apo-carboxilasas y son transformadas a su forma activa (holo-carboxilasas) cuando la biotina se acopla de forma covalente a un residuo conservado de lisina, convirtiéndolas en proteínas biotiniladas. Esta reacción de biotinilación es catalizada por una holo-carboxilasa sintasa, conocida como BPL ('biotin-protein ligase'), cuya función es esencial, por lo que todos los organismos cuentan con una BPL. En algunos procariotes como *Bacillus* spp o *Escherichia coli* se ha encontrado una BPL bifuncional, que además de llevar a cabo la actividad de holo-carboxilasa sintasa, también se encarga de la regulación de la transcripción de los genes de biosíntesis de biotina, por lo que se denomina *birA*, 'biotin regulator' (Cronan Jr., 1989; Bower *et al.*, 1995).

En bacterias y células eucarióticas pueden haber hasta cinco tipos diferentes de proteínas biotiniladas. Estas juegan un papel esencial en el metabolismo de todos los organismos ya que participan en etapas clave del mismo, como en la gluconeogénesis, en la síntesis y elongación de los ácidos grasos (lipogénesis), en el metabolismo de aminoácidos y en reacciones anapleróticas. A continuación se mencionan algunas de las carboxilasas dependientes de biotina que llevan a cabo reacciones enzimáticas esenciales:

- Acetil-Coenzima A (CoA) carboxilasa: Cataliza la carboxilación de acetil-CoA para formar malonil-CoA, que es la primera etapa en la síntesis de ácidos grasos.
- Piruvato carboxilasa: Es una enzima anaplerótica involucrada en la formación de oxalacetato, importante componente del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA).
- Propionil-CoA carboxilasa: Enzima anaplerótica involucrada en la vía catabólica de los ácidos grasos de cadena impar, así como el catabolismo de colesterol y algunos aminoácidos.

Además de su papel como grupo prostético, la biotina está involucrada en otros procesos metabólicos tales como transcripción-traducción de proteínas y procesos de transporte. Por otra parte, se ha encontrado que en eucariotes la

biotina es responsable de la regulación de la expresión de genes que participan en fenómenos diversos, como en el metabolismo de la glucosa, en la expresión de transportadores de biotina, en la respuesta inmune, la expresión de oncogenes o efectos inductores y supresores similares al de ciertas hormonas (Rodríguez-Melendez y Zemleni, 2003; León-Del-Río, 2005). Lo anterior demuestra la importancia global que tiene la biotina en el metabolismo tanto de procariotes como de eucariotes.

## 1.2 Genes involucrados en la síntesis de biotina

A pesar de ser indispensable, solo algunos organismos tienen la capacidad de sintetizar biotina. En los procariotes existen cuatro genes esenciales para la síntesis de esta vitamina, *bioF*, *bioA*, *bioD* y *bioB*. En la mayoría de los casos, estos genes se encuentran en operón pero pueden variar en los diferentes organismos. Por ejemplo, en *Bacillus subtilis* se encuentran en un solo operón, en contraste con *Bacillus sphaericus* en el que están en dos operones separados (Fig. 2 del artículo de revisión Guillén-Navarro *et al.*, 2005a, incluido en esta tesis). En ambos casos se encuentran otros genes adicionales, como *bioI*, *bioW*, *bioX* y *bioY* (Bower *et al.*, 1996; Gloeckler *et al.*, 1990). Al parecer los productos de estos genes están involucrados en las etapas previas a la síntesis de ácido pimélico, que es el precursor de biotina en estos organismos (Fig. 1 de Guillén-Navarro *et al.*, 2005a).

Por otra parte, en *E. coli*, los genes para la biosíntesis de biotina constituyen un operón a excepción de *bioA*, que se transcribe en orientación contraria (Otsuka *et al.*, 1988; Cronan, 1989). Este organismo también presenta los genes *bioC* y *bioH*, que participan en la síntesis del precursor. El mismo arreglo del operón de *E. coli* también está presente en bacterias cercanas filogenéticamente, como es el caso de *Serratia marcescens* y *Erwinia herbicola* (Sakurai *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1996).



### 1.3 Síntesis de biotina

En los procariotes la ruta metabólica de la síntesis de biotina parece seguir una vía común a partir de pimeloil-CoA. En ella se involucran los productos de *bioF* (ácido 7-ceto-8-aminopelargónico (KAPA) sintasa), *bioA* (ácido 7,8-diaminopelargónico (DAPA) sintasa), *bioD* (detiobiotina sintasa), y *bioB* (biotina sintasa) en este orden (Fig. 1 de Guillén-Navarro *et al.*, 2005a). En *E. coli* se han estudiado ampliamente los mecanismos de acción de estas enzimas y dado que la secuencia de estos genes está conservada entre bacterias, plantas y levaduras, es posible que este mecanismo sea similar entre ellos.

La biosíntesis inicia con la incorporación de L-alanina a pimeloil-CoA, catalizada por BioF para generar ácido 7-ceto-8-aminopelargónico. Posteriormente, BioA cataliza la transaminación de este producto para producir ácido 7,8-diaminopelargónico, que sufre una carboxilación catalizada por BioD para dar lugar a la detiobiotina. La etapa final la lleva a cabo BioB (que es una proteína dimérica) con la introducción de azufre que cierra el anillo tetrahidrotiofeno para producir biotina (Schneider y Lindqvist, 2001). Esta reacción es muy compleja, dada la naturaleza de BioB y su mecanismo de reacción. Una característica muy importante de BioB, es que cada monómero contiene un centro Fe-S que está acoplado a la proteína en una región consenso (que comparte con otras enzimas dependientes de S-adenosil metionina -SAM- que también tienen centros Fe-S: C-X<sub>3</sub>-C-X<sub>2</sub>; Sanyal *et al.*, 1994a). Se sugiere que en su estado reducido [4Fe-4S]<sup>2+</sup> puede intervenir en el corte reductivo de SAM, mientras que en su estado oxidado [2Fe-2S]<sup>2+</sup> parece ser el donador de azufre (Ugulava *et al.*, 2001; Tse Sum Bui *et al.*, 2003).

La etapa previa a pimeloil-CoA varía entre los organismos y están involucrados otros genes diferentes, como se explica a continuación.

## 1.4 Origen de los precursores de biotina

Actualmente se comienza a esclarecer el origen de los precursores de la biotina en las etapas anteriores a **pimeloil-CoA**, los cuales no son similares en todos los organismos. Se sabe que tanto *B. sphaericus* como *B. subtilis* pueden convertir ácido pimérico en pimeloil-CoA en una reacción catalizada por pimeloil-CoA sintetasa (el producto de *bioW*) mediante la hidrólisis de un ATP, (Ploux *et al.*, 1992, 1999; Bower *et al.*, 1996). Adicionalmente, *B. sphaericus* posee un *bioX* cuya función se desconoce, aunque tiene similitud con proteínas acarreadoras de acilo (ACPs); mientras que *B. subtilis* tiene a *bioI*, que por sus características se define como un citocromo P450. Este podría catalizar el corte de un enlace carbono-carbono de un ácido graso acoplado a un ACP, para producir un pimeloil-ACP que también podría convertirse posteriormente en pimeloil-CoA (Stok y de Voss, 2000).

En *E. coli* se ha tratado de esclarecer el origen de pimeloil-CoA por medio de estudios de radio marcaje, donde se descarta que el ácido pimérico pueda ser un intermediario de este precursor, como ocurre en *B. sphaericus* y *B. subtilis* (Ifuku *et al.*, 1994; Sanyal *et al.*, 1994b). En estos estudios se propone que el sustrato carbonado podría derivarse a partir de L-alanina o acetato, que da lugar primero a acetil-CoA para luego producir malonil-CoA. Finalmente, por la condensación de tres moléculas de malonil-CoA se produce pimeloil-CoA, en un mecanismo similar al de la reacción ácido graso sintasa. Sin embargo, en este modelo no se esclarecen las funciones de BioH y BioC que al parecer son necesarias para producir pimeloil-CoA en esta bacteria

Recientemente se caracterizó la proteína BioH en *E. coli* y *S. marcescens* y se determinó que es una carboxiesterasa con actividad hidrolasa, específicamente esterasa (Akatsuka *et al.*, 2003; Sanishvili *et al.*, 2003). En este caso se propone que el papel de BioH consiste en condensar CoA y pimelato para originar pimeloil-CoA. Como BioH no puede usar ácido pimérico libre, requiere de un ACP (que podría ser BioC, ver a continuación) para formar primero un complejo pimeloil-BioC que se transfiere directamente a CoA.

A pesar de que no se conoce con exactitud la función del producto de *bioC*, se ha demostrado que tiene similitud con ACPs, al igual que el BioX de *B. sphaericus*. Por lo que es posible que funcionen como proteínas acarreadoras de acilo involucradas en la síntesis de pimeloil-CoA. Sin embargo, BioC y BioX no comparten semejanza entre sí.

En el caso de *Mesorhizobium loti* se encontró un gen diferente (*bioZ*) que se relacionó con la producción de pimeloil-CoA (Sullivan *et al.*, 2001). Este gen está codificado en el operón *bioBFDAZ* y tiene similitud con proteínas acarreadoras de  $\beta$ -cetoacil-acil sintasas (KAS III) de algunas especies de bacterias. Aunque es capaz de complementar a la mutante *bioH* de *E. coli*, no complementa a la *bioC*. Dada la similitud que presenta con *fabH* (cuyo producto es un ácido graso sintasa), BioZ podría estar involucrado en una reacción de condensación donde participaría un tioéster con número impar de átomos de carbono para producir pimeloil-ACP y después una transacilación que diera lugar a pimeloil-CoA (Sullivan *et al.*, 2001). Sin embargo, esta hipótesis tiene que verificarse y quizá esto se logre a partir de estudios cristalográficos y la comparación de su estructura tridimensional, además de ensayos bioquímicos.

Es importante señalar que no todos los organismos requieren sintetizar biotina puesto que pueden adquirirla de manera exógena, ya sea por difusión o mediante algún sistema de transporte.

## **2. SISTEMAS DE TRANSPORTE:**

### **2.1 Clasificación de los sistemas de transporte**

Todas las células requieren adquirir de su entorno componentes para la biosíntesis y la producción de energía; asimismo, necesitan liberar al exterior productos del metabolismo. Algunos compuestos pueden pasar a través de la membrana por difusión simple, sin necesidad de algún elemento que lo traslade. Sin embargo, el tráfico de la mayoría de moléculas a través de la membrana

requiere la intervención de proteínas que conforman canales transmembranales, acarreadores o las llamadas “bombas”. Tradicionalmente, los sistemas de transporte de solutos en procariotes se clasifican en dos grandes grupos: Los transportadores activos (aquellos que acoplan el transporte del soluto a un gasto de energía), y los transportadores pasivos (los que no requieren de un gasto de energía; Heidger, 1994; Nelson *et al.*, 2005).

Actualmente se ha propuesto un nuevo sistema de clasificación de los sistemas de transporte llamado TC (de ‘Transport Classification’, por sus siglas en inglés), el cual agrupa a los transportadores en base a su función y filogenia molecular, en nueve clases (Saier, 2000a). Las primeras cinco corresponden a las clases de transportadores reconocidos (ver Fig. 2) y las últimas dos (Clases 8 y 9) a permeasas y componentes no caracterizados, o involucrados indirectamente en el transporte (Para una revisión más detallada ver: Saier, 2000a; o <http://www.tcdb.org/>).

Según esta clasificación existen dos categorías principales en que se pueden agrupar los sistemas de transporte: el transporte facilitado tipo canal y el tipo acarreador (Fig. 2). Cuando el acarreador requiere de una fuente de energía, el sistema se convierte en un transportador activo, que puede ser primario o secundario.

Se considera como transportador activo primario (Clase 3, TC) al sistema que toma la energía de una fuente primaria acoplada al proceso de transporte, como es la hidrólisis de un enlace pirofosfato. Aquí es donde se encuentran agrupados los transportadores tipo ABC, como el sistema BioMN involucrado en el transporte de biotina en *Sinorhizobium meliloti* (Entcheva *et al.*, 2002). Mientras que cuando la fuente de energía acoplada al transporte, es generada a expensas de una fuente primaria, se considera al sistema como un transportador activo secundario.

Resulta importante destacar la posible existencia de sistemas de transporte muy peculiares, que resultarían en nuevas superfamilias con características propias; que hayan evolucionado independientemente de otros sistemas, o incluso que sean resultado de la asociación quimérica de distintos componentes de

transportadores conocidos, pertenecientes a diferentes grupos de la clasificación (Driessen *et al.*, 2000; Saier, 2000b). Es posible que de este sector surjan familias de transportadores que no caigan dentro de las clases ya descritas y formen parte de una nueva clase, para ello se dejaron las clases 6 y 7 que por el momento están vacías.

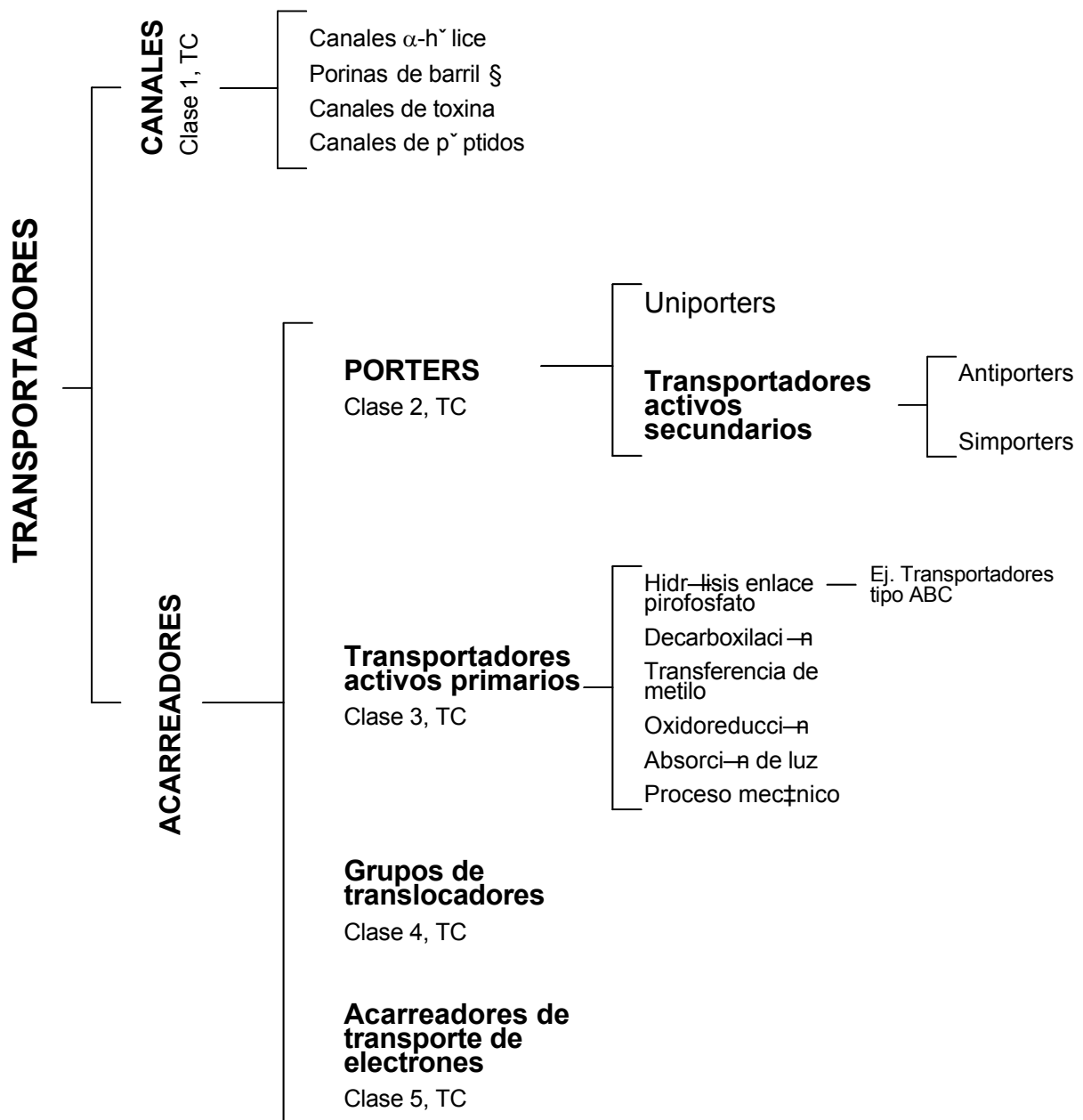


Figura 2. Esquema que muestra la clasificación de los transportadores identificados, según el sistema TC (Saier, 2000a).

## 2.2 Transportadores tipo ABC

Una parte importante del traslado de moléculas a través de la membrana se lleva a cabo por transportadores tipo ABC, que se encuentran ampliamente distribuidos entre los tres reinos (arquea, eubacteria y eucaria). Son proteínas integrales de membrana que utilizan energía celular primaria (ATP) para transportar moléculas. Representan una de las familias de proteínas de membrana parálogas mas grandes en muchos organismos, como es el caso de *E. coli* K-12 donde se encontró que alrededor del 5% de su genoma codifica para transportadores ABC (Schmitt y Tampé, 2002; Jones y George, 2004). Su amplia presencia se ve reflejada en la gran diversidad de moléculas que transportan, lo que hace que estén involucrados en diversos procesos celulares. Generalmente estos sistemas de transporte tienen alta afinidad por el sustrato y funcionan de una manera unidireccional para desplazar las moléculas contra altos gradientes de concentración.

Debido a que estos transportadores utilizan la energía de la hidrólisis de ATP para poder translocar los solutos a través de la membrana, es claro que necesitan un componente que acople ATP. Este componente es conocido como “ATP-binding cassette”, que es el que da el nombre “ABC” a esta familia de transportadores (Fath y Kolter, 1993; Jones y George, 2004). Estos tienen una estructura funcional básica compuesta por dos dominios ABC (conocidos también como “nucleotide-binding domains” o NBD por sus siglas en inglés) que pueden ser homólogos o idénticos, y dos dominios transmembranales citoplasmáticos (TMDs por sus siglas en inglés), que también pueden ser homólogos o idénticos (Fig. 3). Los dominios NBD y TMD usualmente se encuentran organizados en un *locus*, por lo que en bacterias generalmente forman un operón (Tomii y Kanehisa, 1998). Ambos están codificados como polipéptidos separados y a veces fusionados en proteínas con dominios múltiples, como en el caso de las proteínas de origen eucariótico (Driessen *et al.*, 2000; Schmitt y Tampé, 2002; Higgins y Linton, 2004).

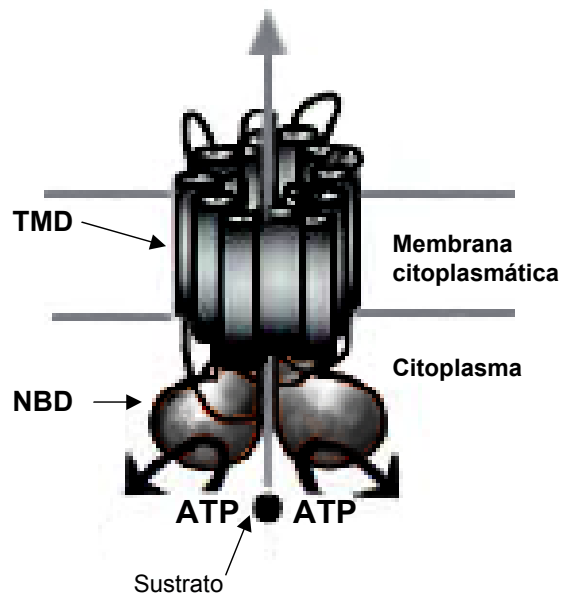


Figura 3. Representación esquemática de la organización de los dominios de los transportadores tipo ABC. TMD, dominio transmembranal; NBD, dominio de unión del nucleótido. Tomado de van der Heide y Poolman, 2002.

Los NBD tienen una secuencia y estructura muy conservada, sin importar si es de origen procariótico o eucariótico, o el tipo de sustrato que transportan. Su función es acoplar cambios conformacionales inducidos por el pegado e hidrólisis de ATP y la liberación de ADP, al proceso del transporte. La secuencia que caracteriza estos dominios, son los motivos altamente conservados conocidos como Walker A y B, que se encuentran en lo que algunos llaman Dominio I o dominio catalítico, que actúa como una especie de bolsa de pegado de ATP. Además se compone del Dominio II también llamado de señalización, que al parecer es el que interactúa con los TMDs (Schmitt y Tampé, 2002; Higgins y Linton, 2004; Jones y George, 2004).

A diferencia de los NBDs, los dominios TMD de diferentes subfamilias de transportadores ABC son menos conservados, aunque comparten cierta arquitectura. Al igual que los NBDs, los dominios TMDs están acoplados en dímeros, que juntos forman una especie de poro o canal a través del cual el sustrato cruza la bicapa lipídica, por lo que también se conocen como permeasas (Tomii y Kanehisa, 1998). Consisten de  $\alpha$ -hélices que atraviesan la membrana, las

cuales pueden presentarse en diferente cantidad, aunque los más comunes tienen 6 o 10 segmentos transmembranales por monómero. La especificidad por el sustrato en los transportadores ABC (con excepción de los que dependen de una proteína de pegado del sustrato –SBP, por sus siglas en inglés– ver a continuación) está determinada por uno o más sitios de pegado de sustrato localizados en los TMDs, aunque se desconoce su ubicación exacta (Jones y George, 2004; Higgins y Linton, 2004).

A pesar de que no hay diferencias fundamentales en cuanto a la arquitectura, como en el mecanismo de transporte entre importadores y exportadores de la familia ABC de transportadores, sí hay ciertas diferencias entre los TMDs. Sin embargo, la diferencia más importante es la presencia del componente SBP entre los sistemas importadores (Fath y Kolter, 1993); curiosamente, existen algunos que al parecer carecen de éste y son considerados como 'atípicos' (Tomii y Kanehisa, 1998; Driessen *et al.*, 2000). No obstante, por definición el SBP no pertenece al transportador ABC en sí, sino que únicamente facilita el reclutamiento del sustrato, pues es probable que el TMD sea quien reconozca al sustrato y actúe de manera análoga a un canal o un poro en el proceso de transporte (Schmitt y Tampé, 2002; Higgins y Linton, 2004).

Los SBP son muy divergentes en cuanto a similitud de secuencia y también son conocidos como proteínas periplásmicas de pegado (o PBP por sus siglas en inglés), puesto que se encuentran libres en el espacio periplásmico de las bacterias Gram negativas, donde fueron encontrados por primera vez. En bacterias Gram positivas, se encuentran anclados a la membrana citoplasmática. Recientemente también se han encontrado SBP fusionados a la región C- o N-terminal de TMDs, formando proteínas cuya presencia está ampliamente distribuida entre los microorganismos (van der Heide y Poolman, 2002; Jones y George, 2004).



### 3. LA BIOTINA EN EL METABOLISMO DE *RHIZOBIUM*

La familia *Rhizobiaceae* agrupa bacterias Gram-negativas capaces de fijar nitrógeno atmosférico en las raíces de plantas leguminosas y algunas especies patogénicas. Abarca los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium* y *Agrobacterium* (Young *et al.*, 2001). En particular, *R. etli* es capaz de fijar nitrógeno cuando establece simbiosis con plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*). El genoma de esta bacteria consta de un cromosoma y 6 plásmidos llamados p42a, p42b, p42c, p42d, p42e y p42f.

Para que se lleve a cabo la fijación de nitrógeno, es necesario que los rizobia infecten la raíz de la planta, por lo que su estilo de vida los obliga a adaptarse a diferentes ambientes: la vida libre en el suelo, luego la rizósfera, el hilo de infección en la raíz y las estructuras radiculares llamadas nódulos que es donde se establecen para fijar nitrógeno. Antes de que puedan fijar nitrógeno los rizobia deben multiplicarse y adaptarse al ambiente microaeróbico dentro del nódulo (Djordjevic, 2004), por lo que presentan cambios fisiológicos y morfológicos que los llevan a transformarse en bacteroides, que ahora son capaces de fijar nitrógeno.

En esta simbiosis, ocurre una interacción altamente coordinada y regulada entre la planta y el bacteroide (Lodwig y Poole, 2003; Djordjevic, 2004). El nitrógeno fijado por el bacteroide es suministrado a la planta, que a su vez le proporciona diversos nutrientes, principalmente compuestos carbonados como ácidos dicarboxílicos (succinato y malato). La oxidación de estos ácidos ocurre por medio del ciclo TCA, que le permite al bacteroide producir intermediarios para el metabolismo, donde intervienen varias enzimas anapleróticas como la piruvato carboxilasa, PYC (Dunn *et al.*, 1996; Dunn, 1998; Lodwig y Poole, 2003). En este estado, el bacteroide de *R. etli* comienza a acumular el polímero poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB), que es necesario para secuestrar poder reductor, permitiendo que el TCA opere bajo condiciones microaeróbicas (Encarnación *et al.*, 1995; Cevallos *et al.*, 1996; Lodwig y Poole, 2003). La síntesis de PHB comienza con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA para formar

acetoacetil-CoA que sufre una serie de reacciones de reducción y polimerización que producen PHB. Como se sabe, la síntesis de ácidos grasos también se da a partir de acetil-CoA, cuya primera reacción es catalizada por acetil-CoA carboxilasa (ACC). Por otra parte, se ha observado que otra de las actividades carboxilasas presentes en los bacteroides es la propionil-CoA carboxilasa (PCC) que lleva a cabo la carboxilación de propionato, que es convertido a succinil-CoA para ser metabolizado en el ciclo de TCA (de Hertogh *et al.*, 1964; Dunn, 1998).

El hecho de que tanto PYC, como las actividades de ACC y PCC dependen de biotina para su función, lleva a suponer que la biotina ejerce una influencia importante en el metabolismo de *R. etli* durante su transformación a bacteroide. Análisis del proteoma de *R. etli* y de *S. meliloti* han demostrado que la biotina ejerce un efecto global en la expresión de proteínas, además de las actividades de las carboxilasas. En *S. meliloti* se observó una expresión diferencial de al menos 100 proteínas al adicionar biotina en medio definido (Heinz y Streit, 2003); mientras que en *R. etli* se advirtió la expresión *de novo* de 595 proteínas en medio mínimo (MM) con biotina comparado contra MM (Encarnación *et al.*, 1995, 2003).

Adicionalmente, estudios realizados en este laboratorio han demostrado que la biotina puede ser un factor importante en el proceso de transformación a bacteroide. En estos experimentos, se encontró que al realizar subcultivos sucesivos en MM de *R. etli*, *Rhizobium tropici* y *S. meliloti*, éstos desarrollan una respuesta tipo fermentativa que puede ser evitada suplementando al medio ya sea con biotina, tiamina u O<sub>2</sub>, o bien subcultivando en medio rico (Encarnación *et al.*, 1995). Se ha observado que este estado fermentativo está estrechamente relacionado con el metabolismo que se expresa en el bacteroide durante la simbiosis (Encarnación *et al.*, 1995, 2003). La respuesta fermentativa de *R. etli* se caracteriza por un decremento en su crecimiento, acompañado de una reducción drástica del contenido de O<sub>2</sub> disuelto en el cultivo, acumulación de PHB, excreción de ácidos orgánicos y el decremento en la actividad de enzimas del ciclo TCA, como oxoglutarato deshidrogenasa (ODH) y enzimas anapleróticas, principalmente PYC. En contraste, cuando se suplementa al medio con biotina o tiamina, se incrementan las actividades del ciclo del TCA (principalmente ODH) y

de la PYC entre otras; no se acumula PHB, tampoco se excretan aminoácidos ni ácidos orgánicos, revirtiendo el proceso a un metabolismo aeróbico (Encarnación *et al.*, 1995).

En *R. etli* al parecer PYC tiene un papel importante en la transición del metabolismo aeróbico al fermentativo (Dunn *et al.*, 1996). Sin embargo, es importante resaltar que el nivel de la actividad de PYC no depende del nivel de su transcripción, sino mas bien de la cantidad de biotina presente, cosa que también parece ocurrir con las actividades ACC y PCC (Dunn *et al.*, 1997, 2004). Parece ser que a pesar de que en bacteroides no se detecta actividad de PYC, si hay una transcripción del gen, por lo que la enzima está presente en su forma inactiva (apo-PYC), lo que hace suponer que tiene una muy baja disponibilidad de biotina (Dunn *et al.*, 1997).

Estudios realizados en *S. meliloti* y *R. etli* demuestran que requieren sintetizar o captar biotina para ser eficientes en la competencia en rizósfera y en la colonización de raíces de sus respectivos hospederos (Streit *et al.*, 1996; Entcheva *et al.*, 2002; Guillén-Navarro *et al.*, 2005b). Hay evidencias que sugieren que ambas especies podrían sintetizar biotina; sin embargo, al parecer lo hacen en cantidades menores a la necesaria para la actividad máxima de sus actividades carboxilasas (Dunn, 1998; Entcheva *et al.*, 2002). En *R. etli* se ha sugerido que no es un auxótrofo de biotina por el hecho de que el suministro de tiamina, glutamina, fumarato y malato u O<sub>2</sub> es suficiente para mantener su crecimiento en los sucesivos subcultivos en MM. Además, también se ha observado que al suministrarle ácido pimérico, la bacteria crece de manera similar a cuando se le proporciona biotina. No obstante, también se sabe que, como la biotina está entre los compuestos que la planta le suministra al simbiote, puede adquirirla de manera exógena. Es posible que dentro del gran número de proteínas expresadas en el metabolismo fermentativo (Encarnación *et al.*, 2003) existan algunas que le permitan captar biotina del medio.

En cuanto al transporte de biotina en bacterias, se tiene poco conocimiento de cómo se lleva a cabo. Algunos estudios en *E. coli* han llevado a la conclusión de que pueden existir distintos mecanismos de transporte, puesto que se ha

observado que puede pasar por difusión a través de la membrana, pero también por un mecanismo dependiente de energía, de manera específica y contra un gradiente de concentración (Piffeteau y Gaudry, 1985). En 1972 se aisló una mutante de *E. coli* con dificultades para captar biotina; la mutación se mapeó en el *locus* llamado *birB* (por 'biotin retention', Campbell *et al.*, 1972). Posteriormente, otro grupo también aisló otra mutación que denominaron *bioP*, con características similares a *birB* (Eisenberg *et al.*, 1975). Estudios posteriores sugirieron que ambas mutaciones correspondían a un mismo *locus* (Campbell *et al.*, 1980). Sin embargo, no se hizo una mayor caracterización de estas mutantes y hasta ahora (a excepción de los datos reportados por Entcheva *et al.*, 2002) se ha estudiado poco, a nivel molecular, la presencia de transportadores de biotina.

El único reporte que se tiene de genes relacionados con el transporte de biotina es el que describe los genes del operón *bioMNB*, en *S. meliloti* (Entcheva *et al.*, 2002). Por su secuencia y algunos datos experimentales, se sugiere que *bioM* y *bioN* son transportadores tipo ABC involucrados en la retención de biotina (Entcheva *et al.*, 2002), cuyos dominios pertenecen a las familias *cbiO* y *cbiQ*, componentes ATPasa y permeasa, respectivamente (Entcheva *et al.*, 2002; Rodionov *et al.*, 2002). En lo que respecta a *bioB*, en realidad no tiene homología con los *bioB* clásicos (biotina sintasa), sino que su secuencia es similar a *bioY*. El gen *bioY* se ha localizado en varios organismos y por el hecho de estar incluido en ocasiones en el operón de biosíntesis de biotina, en un principio se sugirió que podría estar involucrado en su síntesis (Gloeckler *et al.*, 1990). Los *bioY* constituyen una familia única, sin similitud con algún gen de función conocida (Rodionov *et al.*, 2002). Sin embargo, debido a que presentan seis probables dominios transmembranales, propios de proteínas transportadoras, Rodionov *et al.* (2002) sugirieron que en realidad debían estar relacionadas con el transporte, más que la síntesis de biotina. Para evitar confusiones en la nomenclatura, el *bioB* de *S. meliloti* será denominado *bioY* en el presente trabajo.

Se ha demostrado que la biotina juega un papel importante en el metabolismo fermentativo de *R. etli*, que a su vez está estrechamente relacionado al metabolismo de los bacteroides (y por tanto en su capacidad de fijar nitrógeno).

Sin embargo, aún no se conoce el mecanismo ni los genes que participan en la captación y síntesis de biotina en esa bacteria. Por esta razón en el presente trabajo se realizó una búsqueda de genes involucrados en la síntesis de biotina, así como la búsqueda y caracterización de genes involucrados en el transporte de esta vitamina en *R. etli* CE3.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Determinar si existen genes involucrados en la biosíntesis y transporte de biotina en *Rhizobium etli* CE3 y caracterizarlos.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Localizar el gen homólogo a *bioB* (biotina sintasa) y otros posibles genes involucrados en la biosíntesis de biotina en este organismo.
- b) Localizar genes homólogos a *bioMNY* y determinar su posible función en el transporte de biotina en *R. etli*.
- c) Investigar la regulación transcripcional de *bioMNY* por el efecto de biotina.
- d) Determinar el fenotipo de mutantes *bioMNY* en vida libre y en simbiosis.

## RESULTADOS

Se publicó un artículo de revisión sobre el papel de la biotina en rizobia, en el artículo:

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

Los resultados obtenidos en el presente trabajo se reportaron en:

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

Los cuales se presentan a continuación. Además se incluye una sección de resultados adicionales.

MiniReview

## Biotin biosynthesis, transport and utilization in rhizobia

Karina Guillén-Navarro, Sergio Encarnación, Michael F. Dunn \*

*Programa de Ingeniería Metabólica, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 565-A, Cuernavaca, Morelos, Mexico*

Received 25 February 2005; received in revised form 12 April 2005; accepted 13 April 2005

First published online 27 April 2005

Edited by R.I. Aminov

### Abstract

Biotin, a B-group vitamin, performs an essential metabolic function in all organisms. Rhizobia are  $\alpha$ -proteobacteria with the remarkable ability to form a nitrogen-fixing symbiosis in combination with a compatible legume host, a process in which the importance of biotin biosynthesis and/or transport has been demonstrated for some rhizobia–legume combinations. Rhizobia have also been used to delimit the biosynthesis, metabolic effects and, more recently, transport of biotin. Molecular genetic analysis shows that an orthodox biotin biosynthesis pathway occurs in some rhizobia while others appear to synthesize the vitamin using alternative pathways. In addition to its well established function as a prosthetic group for biotin-dependent carboxylases, we are beginning to delineate a role for biotin as a metabolic regulator in rhizobia.

© 2005 Published by Elsevier B.V. on behalf of the Federation of European Microbiological Societies.

**Keywords:** Biotin biosynthesis; Rhizobia; Rhizobia–legume symbiosis

### 1. Introduction

Root nodule bacteria, collectively known as rhizobia, are a crucial component of the global nitrogen cycle because they reduce atmospheric nitrogen to ammonia in symbiotic association with a compatible plant host and thus reduce the need for synthetic nitrogen fertilizers. Before establishing symbiosis, rhizobia must survive in the soil awaiting the presence of a suitable host legume. Infection of the host requires multiplication in the rhizosphere as well as during early phases of the infection. Mature, nitrogen-fixing intracellular rhizobia (bacteroids) require large amounts of energy and reductant derived from the catabolism of plant-supplied organic acids. Consequently, the metabolism and growth factor

requirements of rhizobia have long been studied (for reviews, see [1–4]).

Biotin (vitamin H) has an essential metabolic function as the CO<sub>2</sub>-carrying prosthetic group of selected carboxylases, decarboxylases and transcarboxylases [5]. De novo biotin biosynthesis occurs in many prokaryotes while others are partly or totally dependent on external sources. The purpose of this review is to summarize what is known about biotin biosynthesis, transport and utilization in rhizobia. Rhizobia are the only prokaryotes in which novel regulatory roles for biotin have been investigated. Biotin transport is important for the establishment of symbiosis in some rhizobia, and they are the only prokaryotes in which genes encoding biotin transport proteins have been identified. A new aspect of biotin biosynthesis in rhizobia is the probable presence of novel pathways in some species.

\* Corresponding author. Tel.: +52 73 311 4662; fax: +52 73 317 5094.  
E-mail address: mike@cifn.unam.mx (M.F. Dunn).



## 2. Biotin requirement of rhizobia

Early studies on biotin used *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii to demonstrate that “heat-stable *Rhizobium* growth factor” was identical to “coenzyme R” from *Azotobacter* and that both were, in fact, identical to biotin [6]. Based on their growth response to biotin in defined media, rhizobia may be grouped with respect to their ability to biosynthesize the vitamin. Biotin auxotrophs are incapable of biotin biosynthesis and require external sources for growth [6–8]. An ecologically interesting example is provided by the non-symbiotic *Mesorhizobium loti* strains isolated from soils [9,10]. These isolates lack a 500 kb region of their chromosome termed the “symbiosis island” which, in addition to a variety of symbiosis-specific functions, encodes the biosynthesis of thiamine, nicotinic acid and biotin.

Biotin prototrophs synthesize biotin *de novo* and show neither a growth nor a significant metabolic response to exogenous biotin [6–8,11]. For example, *Rhizobium tropici* CFN299 grows well in minimal medium subcultures in the absence of biotin and maintains a high level of pyruvate carboxylase activity and holo-enzyme protein regardless of biotin supplementation [12,13].

Biotin bradytrophs synthesize biotin but either do so inefficiently or only under certain growth conditions [11,14]. A controversy exists as to whether *Rhizobium etli* and *Sinorhizobium meliloti* fit into this class [11,12,15] or with the biotin auxotrophs [16]. It is important to note that when *S. meliloti* Rm1021 was grown in biotin-free medium, a concomitant several-fold increase in biomass and extracellular biotin, detected with an ELISA assay, were found, indicating that this strain can produce the vitamin *de novo* [15]. Growth studies show that *S. meliloti* strain GR4B is a biotin bradytroph whose synthesis of biotin, detected with a standard bioassay, was dependent upon growth conditions [11].

Wild-type *R. etli* strain CE3 behaves as a biotin auxotroph when serially subcultured in minimal medium, where very low biotin-dependent carboxylase activities and protein levels confirm the presence of a biotin starved state. Growth is restored not only in the presence of exogenous biotin but also by supplementation with thiamine, pimelic acid (a biotin precursor), fumarate plus malate, cAMP, glutamate, proline, or oxygen ([12]; unpublished results). *S. meliloti* Rm1021 behaves similarly to *R. etli* CE3 with respect to the ability of thiamine to prevent biotin auxotrophy [12]. Given that both *S. meliloti* and *R. etli* lack genes homologous to most or all of the orthodox biotin biosynthesis genes (see Section 6), the challenge of providing an unequivocal demonstration of their ability to synthesize the vitamin remains.

## 3. Biotin-dependent carboxylases and biotin-protein ligase in rhizobia

Biotin and carbon dioxide are essential for the growth of rhizobia [1,6,17]. Genome sequence and biochemical analysis show that rhizobia contain the biotin-dependent enzymes pyruvate carboxylase (PYC), acetyl-CoA carboxylase (ACC), and two or more acyl-CoA carboxylases, including propionyl-CoA carboxylase (PCC) [18]. PYC is required for growth on sugars or pyruvate and, although its inactivation has no effect on nodulation and nitrogen fixation in *S. meliloti*, *R. etli* or *R. tropici* [13,19], it would be interesting to determine whether it plays a role in rhizosphere competition, since sugars are excreted to the rhizosphere by legume roots [20]. The symbiotic phenotype of a rhizobial PCC mutant has not been determined but inactivation of the *S. meliloti* methylmalonyl-CoA mutase, which catalyzes the step following that of PCC during propionyl-CoA degradation, does not affect symbiotic performance [21,22]. ACC has not been characterized but would be expected to be essential for fatty acid synthesis [18] and thus viability.

Apo-biotin-dependent carboxylases are converted to their active holo-enzymes by biotin-protein ligase (BPL) [5,23]. The BPLs of *Bacillus* and enteric bacteria are called BirA's (biotin regulators) because their N-terminal helix-turn-helix motif binds to and represses biotin operon transcription [23,24]. In these organisms, BirA catalyzes the conversion of biotin into biotinoyl-AMP, which functions with BirA as a co-repressor: when the intracellular concentration of biotin is elevated (e.g., in biotin-supplemented cultures), more BirA-biotinoyl-AMP is formed and transcription is repressed. The middle and C-terminal portion of BirA contain the catalytic residues for ligating biotin to target proteins [23].

Genome sequence analysis of *M. loti*, *B. japonicum*, *S. meliloti* (<http://www.kazusa.or.jp/rhizobase>) *R. etli* (G. Dávila, V. González, R. Gómez and P. Bustos, unpublished), and *R. leguminosarum* bv. *viciae* ([http://www.sanger.ac.uk/Projects/R\\_leguminosarum](http://www.sanger.ac.uk/Projects/R_leguminosarum)) shows that their deduced BPL gene products lack the N-terminus found in BirA's and retain only the catalytic motifs required for biotinylating apo-carboxylases. These monofunctional BPLs are present in many prokaryotes and all eukaryotes.

The fact that rhizobia contain multiple biotin-dependent carboxylases raises the question of how biotin is partitioned among them by a single BPL. Western blotting experiments designed to follow the biotinylating of the carboxylases in biotin-starved *R. etli* cells pulsed with biotin suggest that the relative level of each apo-carboxylase determines the amount of holo-carboxylase formed (M. Dunn, unpublished). It is not known if the

BPL has the same affinity for each of the different apocarboxylases.

#### 4. Effect of biotin on gene expression

Biotin affects gene expression in eukaryotes [25] but little information exists on biotin as a BirA-independent regulatory molecule in prokaryotes. Proteome analysis shows that biotin markedly alters global protein expression in *R. etli* [26] and *S. meliloti* [27,28]. In *R. etli*, however, most of the changes in protein expression caused by biotin were similar to those observed with thiamine supplementation or growth in complex medium [26]. Thus most of the changes observed with biotin reflect the general metabolic state of the cells rather than a specific effect of the vitamin, and so without appropriate controls claims of biotin-dependent gene expression must be interpreted with caution.

Gene fusion assays show that *S. meliloti* *bhdA* (encoding  $\beta$ -hydroxybutyrate dehydrogenase), *bioS* (putative biotin-responsive regulatory gene), and *copC* (possible copper resistance gene) are induced in response to culture biotin supplementation [27–29]. In contrast, *pem* (encoding L-isoaspartyl protein repair methyltransferase), *shl* (homoserine lactone autoinducer synthase) and *shlR* (homoserine lactone autoinducer transcriptional regulator) are repressed under these conditions [27]. Proteome analysis revealed that proteins whose levels decreased under biotin limitation included the gene product of the down-regulated *copC* mentioned above, 50S ribosomal protein L7/L12, RNA polymerase  $\omega$  subunit, periplasmic transporter substrate binding proteins (two for sugars, one for amino acids) and 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase (part of the Entner-Doudoroff pathway). As Heinz and Streit [27] discuss in detail, there is some correlation between these results and the physiological response of *S. meliloti* to biotin. For instance, the upregulated BdhA participates in the degradation of the carbon storage polymer poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB), consistent with the finding that biotin supplementation prevents PHB accumulation in *S. meliloti* [12,28]. Regulation of PHB degradation by biotin could prevent its accumulation in bacteroids [3] and promote its accumulation and gradual utilization in oligotrophic environments like soil.

#### 5. Biotin and the rhizobia–legume symbiosis

The effect of biotin on symbiosis depends on the rhizobia–legume combination in question, and many naturally-occurring, symbiotically proficient rhizobia are biotin auxotrophs. A *M. loti* R7A biotin auxotroph (*bioA::Tn5*) was indistinguishable from the wild-type in colonizing the *Lotus corniculatus* rhizosphere. However,

the biotin phenotype of this mutant is leaky [14] perhaps due to the presence of a second copy of *bioA*, as occurs in *M. loti* MAFF303099 [30]. Studies with *S. meliloti* and *R. etli* *bioN* and *bioM* biotin uptake mutants indicate that high affinity uptake is required for efficient nodulation of their respective legume hosts ([5,15]; K. Guillén-Navarro, submitted). Interestingly, *S. meliloti* *bioN* mutants engineered for biotin overproduction by the introduction of the *E. coli* *bio* operon were also found to compete poorly with the wild-type in the alfalfa rhizosphere, perhaps due to the reduced viability observed in the overproducing strains [29].

Determining the absolute symbiotic requirement for biotin in rhizobia is complicated by the fact that the vitamin is excreted from the roots of host plants [15,31]. The very low bacteroid activities of biotin-dependent carboxylases in the bradytroph *R. etli* CE3 indicate that little biotin is synthesized by, or available to, the microsymbiont. In contrast, bacteroids of the biotin prototroph *R. tropici* CFN299 from nodules formed on the same host (bean) have high activities, indicating de novo synthesis of the vitamin ([32]; M. Dunn, unpublished).

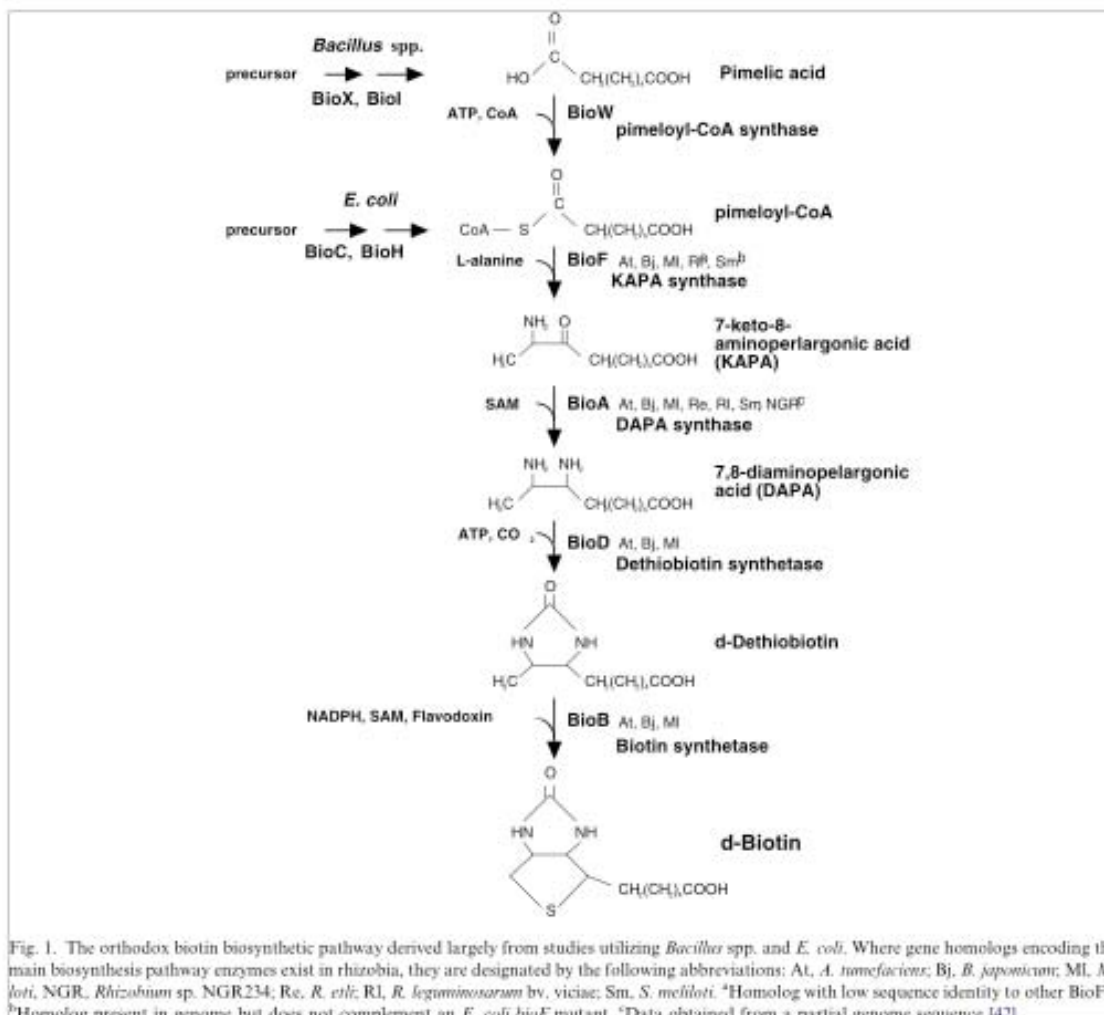
#### 6. Biotin biosynthesis

*Escherichia coli* and *Bacillus* species are the model organisms to which we owe most of our understanding of biotin biosynthesis (Fig. 1). *Bacillus* spp. are able to take up (apparently by passive diffusion) and use pimelic acid as a precursor of biotin. Pimelic acid is derived through an unknown pathway which may involve the postulated fatty acid synthase-like activities of BioX and BioI [33]. Pimelic acid is activated to its CoA derivative by pimeloyl-CoA synthetase, the product of *bioW* [34]. *E. coli* is unable to utilize pimelic acid as a biotin precursor and instead synthesizes pimeloyl-CoA, possibly from acetyl-CoA [35], using BioH, a probable carboxyl esterase [36] and the yet uncharacterized BioC [33]. *bioW* homologs do not occur in the sequenced genomes of *M. loti*, *B. japonicum*, *S. meliloti* or *A. tumefaciens*.

The *M. loti* gene encoding BioZ is part of the *bioBF-DAZ* operon (Fig. 2) and shows similarity to  $\beta$ -ketoacyl synthases. BioZ can functionally complement *E. coli* *bioH*, but not *bioC*, mutants. Based on this, Sullivan et al. [14] proposed that BioZ catalyzes both the condensation of a thioester with an odd number of carbon atoms to produce pimeoyl-ACP and its subsequent transacetylation to pimeloyl-CoA. This hypothesis is consistent with recent enzymological data on the *E. coli* BioH [36].

Four enzymes convert pimeloyl-CoA to biotin, namely BioF (7-keto-8-aminopelargonic acid synthase), BioA (7,8-diaminopelargonic acid aminotransferase),





BioD (dethiobiotin synthetase) and BioB (biotin synthetase) (Fig. 1). The physical arrangement of gene clusters encoding these orthodox biotin biosynthetic enzymes are presented in Fig. 2. In *M. loti* R7A, a functional *bioBFDA* operon was confirmed by complementation of *E. coli* mutants inactivated in one of these genes [14]. Entcheva and co-workers [5] used genome sequence analysis and complementation tests with *E. coli* biotin mutants to identify putative biotin biosynthesis genes in *S. meliloti*. *bioF* and *bioA* homologs, potentially encoding the first two enzymes for the pimeloyl-CoA to biotin pathway, were found, but only the *bioF* homolog could complement the corresponding *E. coli* mutant. Homologs for the last enzymes of the pathway (*bioD* and *bioB*) were not found. Genes possibly encoding BioH and

BioZ, involved in pimeloyl-CoA synthesis, were also found but could not complement their respective *E. coli* mutants (a *bioI* homolog was encountered but complementation was not tested since no homolog occurs in *E. coli*). The genome sequence of *R. etli* CE3 contains a *bioA* homolog on plasmid f, but no *bioB*, *bioD* or *bioF* homologs (unpublished results), while that of *R. leguminosarum* bv. viciae contains *bioA* and *bioF* homologs but lacks homologs for *bioB* and *bioD*.

## 7. Biotin transport

Active biotin uptake occurs in *E. coli* but the transport system involved is not known [37]. An *S. meliloti*

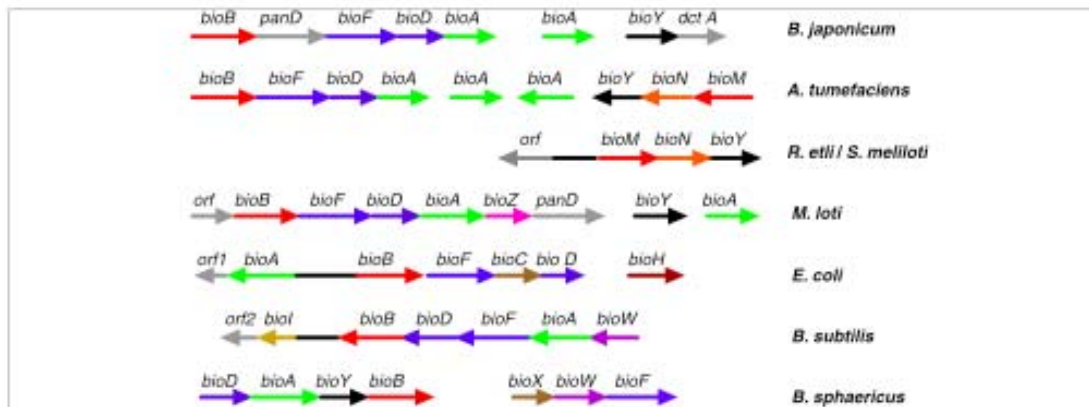


Fig. 2. Biotin biosynthesis gene clusters in selected prokaryotes. Data were obtained from the literature cited in the text or by homology searches of the following genome databases: *A. tumefaciens*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/MICROBES/Complete.html>; *B. japonicum*, <http://www.kazusa.or.jp/rhizobase>; *R. etli*, G. Dávila, V. González, R. Gómez and P. Bustos, unpublished. Contiguous arrows represent gene clusters and spaces denote genes or clusters in other parts of the genome. The drawings are not to scale.

mutant inactivated in *bioS*, the biotin-upregulated gene mentioned in Section 4, has a higher level of biotin uptake than the wild-type [38]. *bioS* encodes a LysR type protein and its role in biotin uptake would appear to be regulatory [28]. Both *S. meliloti* and *R. etli* contain operons (*bioMNB*) encoding products involved in biotin uptake or retention which are identically organized and share high sequence identity ([5], Guillén-Navarro et al., submitted). Very similar operon exists in *R. leguminosarum* bv. viciae and *A. tumefaciens* but have not been characterized experimentally. The gene originally designated *bioB* in *S. meliloti* [5] does not resemble a biotin synthase (the classical *bioB* product) but instead has similarity to *bioY*, first implicated in biotin biosynthesis in *Bacillus sphaericus* because of its proximity to other genes involved in biotin biosynthesis [39]. We refer here to the *S. meliloti* and *R. etli* "*bioB*" homologs as *bioY*. Sequence analysis and experimental data [5,40] suggest that *bioM* and *bioN* are ABC-type transporters for biotin and encode the ATPase and permease components, respectively. BioY has six probable transmembrane domains like those of transport permeases but constitutes its own family in the Pfam database [40]. In *S. meliloti*, uptake experiments with a high concentration of external biotin (40 nM) showed that a *bioM* mutant was deficient in biotin retention but not uptake [5]. We used low external biotin concentrations (10–100 pM) to show that a *R. etli bioM* mutant had significantly reduced uptake of biotin but was not defective in retaining it (Guillén-Navarro, submitted). Overexpression of *bioY* in wild-type *S. meliloti* Rm1021 allows better than wild-type growth in medias supplemented with dethiobiotin. It was suggested that BioY might play a role in converting dethiobiotin to biotin by a mechanism distinct from that of a classical biotin synthase [5]. However, because com-

mercially available dethiobiotin contains biotin as a contaminant [41], extra copies of *bioY* may promote growth in dethiobiotin-supplemented cultures by allowing more efficient uptake of the contaminating biotin.

BlastN analysis was used to determine the presence of homologs of *bioB*, *bioD*, *bioF* and *bioA* (the orthodox biotin biosynthesis genes) and *bioY* (the putative high affinity transport component) in 159 sequenced genomes (including 37 incomplete genomes) in the GenBank and KEGG databases. We found that (i) nearly 16% of the genomes contained only *bioY*, (ii) 39% lacked *bioY* and contained all of the orthodox biosynthetic genes, (iii) nearly 18% contained *bioY* and all of the orthodox biosynthetic genes and (iv) the remainder contained *bioY* plus one or two of the classical genes. The genomes encoding all of the genes included those of *A. tumefaciens* and *M. loti*, which could benefit from possessing both the orthodox biosynthetic route and high affinity uptake capability, since both species colonize plant tissues but also survive as saprophytes in soil.

## 8. Perspectives

Rhizobia make enlightening subjects for the study of biotin metabolism and utilization owing to characteristics which differ from the standard model organisms including (i) their ability to enter into symbiosis, which has been dissected at the molecular level and for which the importance of biotin is dependent on the symbiotic combination; (ii) the presence of multiple biotin-dependent carboxylases; (iii) absence of BirA regulatory functions; (iv) preliminary data indicating a metabolic regulatory function for biotin and (v) the apparent presence of novel biosynthetic pathways. We need to pursue

the work on possible novel biotin biosynthesis pathways with a rigorous biochemical and physiological characterization, including the use purified precursors to demonstrate actual substrate/product relationships. The application of global methodologies such as proteomics and transcriptomics in rhizobia will allow further identification of genes and gene products regulated by biotin. Our knowledge of biotin uptake and the regulation of its utilization can also be greatly expanded with rhizobia as experimental organisms.

### Acknowledgments

We apologize to the authors of papers which were not cited because of the publishers space limitations. K. G-N. was supported by graduate student fellowships 138526 from CONACyT and 202327 and 202363 from DGAPA-UNAM. We thank G. Dávila, V. González, R. Gómez and P. Bustos for access to the *R. etli* genome sequence prior to publication.

### References

- [1] Allen, E.K. and Allen, O.N. (1950) Biochemical and symbiotic properties of the rhizobia. *Bacteriol. Rev.* 14, 273–330.
- [2] Dunn, M.F. (1998) Tricarboxylic acid cycle and anaplerotic enzymes in rhizobia. *FEMS Microbiol. Rev.* 22, 105–123.
- [3] Ludwig, E. and Poole, P. (2003) Metabolism of *Rhizobium* bacteroids. *Crit. Rev. Plant Sci.* 22, 37–78.
- [4] Streit, W. 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, 21–31.
- [5] Entcheva, P., Phillips, D. and Streit, W. (2002) Functional analysis of *Simorhizobium meliloti* genes involved in biotin synthesis and transport. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2843–2848.
- [6] West, P.M. and Wilson, P.W. (1940) Biotin as a growth stimulant for the root nodule bacteria. *Enzymologia* 8, 152–162.
- [7] Graham, P.H. (1963) Vitamin requirements of root nodule bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 30, 245–248.
- [8] Bunn, C.R., McNeill, J.J. and Elkan, G.H. (1970) Effect of biotin on fatty acids and phospholipids of biotin-sensitive strains of *Rhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 102, 24–29.
- [9] Sullivan, J.T. and Ronson, C.W. (1998) Evolution of rhizobia by the acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5145–5149.
- [10] Sullivan, J.T., Eardly, B.D., van Berkum, P. and Ronson, C.W. (1996) Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2818–2825.
- [11] Sierra, S., Rodelas, B., Martínez-Toledo, M.V., Pozo, C. and González-López, J. (1999) Production of B-group vitamins by two *Rhizobium* strains in chemically defined media. *J. Appl. Microbiol.* 86, 851–858.
- [12] Encarnación, S., Dunn, M., Willms, K. and Mora, J. (1995) Fermentative and aerobic metabolism in *Rhizobium etli*. *J. Bacteriol.* 177, 3058–3066.
- [13] Dunn, M.F., Encarnación, S., Araiza, G., Vargas, M.C., Dávalos, A., Peralta, H., Mora, Y. and Mora, J. (1996) Pyruvate carboxylase from *Rhizobium etli*: Mutant characterization, nucleotide sequence, and physiological role. *J. Bacteriol.* 178, 5960–5970.
- [14] Sullivan, J., Brown, S., Yocum, R. and 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. *Microbiologica* 147, 1315–1322.
- [15] Streit, W.R., Joseph, C.M. and Phillips, D.A. (1996) Biotin and other water-soluble vitamins are key growth factors for alfalfa root colonization by *Rhizobium meliloti* 1021. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9, 330–338.
- [16] Watson, R.J., Heys, R., Martin, T. and Savard, M. (2001) *Simorhizobium meliloti* cells require biotin and either cobalt or methionine for growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3767–3770.
- [17] Lowe, R.H. and Evans, H.J. (1962) Carbon dioxide requirement for growth of legume nodule bacteria. *Soil Sci.* 94, 351–356.
- [18] Dunn, M.F., Araiza, G., Encarnación, S., Finan, T.M. and Mora, J. (2002) Characteristics and metabolic roles of biotin-dependent enzymes in rhizobia. In: *Nitrogen Fixation: Global Perspectives* (Finan, T., O'Brian, M.R., Layzell, D.B., Vessey, J.K. and Newton, W., Eds.), pp. 158–162. CABI, Wallingford, Oxon, UK.
- [19] Dunn, M.F., Araiza, G. and Finan, T.M. (2001) Cloning and characterization of the pyruvate carboxylase from *Simorhizobium meliloti* Rm1021. *Arch. Microbiol.* 176, 355–363.
- [20] Rovira, A.D. (1960) Plant root exudates. *Bot. Rev.* 35, 35–59.
- [21] Dunn, M.F., Araiza, G. and Mora, J. (2004) Biochemical characterization of a *Rhizobium etli* monovalent cation-stimulated acyl-coenzyme A carboxylase with a high substrate specificity constant for propionyl-coenzyme A. *Microbiologica* 150, 399–406.
- [22] Charles, T.C. and Anceja, P. (1999) Methylmalonyl-CoA mutase encoding gene of *Simorhizobium meliloti*. *Gene* 226, 121–127.
- [23] Cronan Jr, J.E. (1989) The *E. coli bio* operon: transcriptional repression by an essential protein modification enzyme. *Cell* 58, 427–429.
- [24] Bower, S., Perkins, J., Yocum, R.R., Serrero, P., Sorokin, A., Rahaim, P., Howitt, C.L., Prasad, N., Ehrlich, S.D. and Pero, J. (1995) Cloning and characterization of the *Bacillus subtilis birA* gene encoding a repressor of the biotin operon. *J. Bacteriol.* 178, 2572–2575.
- [25] Rodríguez-Melendez, R. and Zemleni, J. (2003) Regulation of gene expression by biotin. *J. Nutr. Biochem.* 14, 680–690.
- [26] Encarnación, S., Guzmán, Y., Dunn, M.F., Hernández, M., Vargas, M.C. and Mora, J. (2003) Proteome analysis of aerobic and fermentative metabolism in *Rhizobium etli* CE3. *Proteomics* 3, 1077–1085.
- [27] Heinz, E.B. and Streit, W.R. (2003) Biotin limitation in *Simorhizobium meliloti* strain 1021 alters transcription and translation. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1206–1213.
- [28] Hofmann, K., Heinz, E.B., Charles, T.C., Hoppert, M., Liebl, W. and Streit, W.R. (2000) *Simorhizobium meliloti* strain 1021 *bioS* and *bdtA* gene transcriptions are both affected by biotin available in defined medium. *FEMS Microbiol. Lett.* 182, 41–44.
- [29] Streit, W.R. and Phillips, D.A. (1996) Recombinant *Rhizobium meliloti* strains with extra biotin synthesis capability. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3333–3338.
- [30] Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M. and Tabata, S. (2000) Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* 7, 331–338.
- [31] Rovira, A.D. and Harris, J.R. (1961) Plant root excretions in relation to the rhizosphere effect. V. The exudation of B-group vitamins. *Plant Soil* 14, 199–214.

- [32] Dunn, M.F., Araiza, G., Cevallos, M.A. and Mora, J. (1997) Regulation of pyruvate carboxylase in *Rhizobium etli*. FEMS Microbiol. Lett. 157, 301–306.
- [33] Lemoine, Y., Wach, A. and Jeltsch, J.-M. (1996) To be free or not: the fate of pimelate in *Bacillus sphaericus* and in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 19, 645–647.
- [34] Ploux, O., Soularue, P., Marquet, A., Gloeckler, R. and Lemoine, Y. (1992) Investigation of the first step of biotin biosynthesis in *Bacillus sphaericus*: purification and characterization of the pimeloyl-CoA synthase, and uptake of pimelate. Biochem. J. 287, 685–690.
- [35] Ifuku, O., Miyaoka, H., Koga, N., Kishimoto, J., Haze, S., Wachi, Y. and Kajiwara, M. (1994) Origin of carbon atoms of biotin:  $^{13}\text{C}$ -NMR studies on biotin biosynthesis in *Escherichia coli*. Eur. J. Biochem. 220, 585–591.
- [36] Sanishvili, R., Yakunin, A., Laskowski, R., Skarina, T., Evdokimova, E., Doherty-Kirby, A., Lajoie, G., Thornton, T., Arrowsmith, C., Savchenko, A., Joachimiak, A. and Edwards, A. (2003) Integrating structure, bioinformatics and enzymology to discover function. BioH, a new carboxyl esterase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 278, 26039–26045.
- [37] Piffeteau, A. and Gaudry, M. (1985) Biotin uptake: influx, efflux and countertransport in *Escherichia coli* K12. Biochim. Biophys. Acta 816, 77–82.
- [38] Streit, W.R. and Phillips, D.A. (1997) A biotin-regulated locus, *bioS*, in a possible survival operon of *Rhizobium meliloti*. Mol. Plant-Microbe Interact. 10, 933–937.
- [39] Gloeckler, R., Ohsawa, I., Speck, D., Ledoux, C., Bernard, S., Zinsius, M., Villeval, D., Kisou, T., Kamogawa, K. and Lemoine, Y. (1990) Cloning and characterization of the *Bacillus sphaericus* genes controlling the bioconversion of pimelate into dethiobiotin. Gene 87, 63–70.
- [40] Rodinov, D.A., Mironov, A. and Gelfand, M. (2002) Conservation of the biotin regulon and the BirA regulatory signal in Eubacteria and Archaea. Genome Res. 12, 1507–1516.
- [41] Bowman, W.C. and DeMoll, E. (1993) Biosynthesis of biotin from dethiobiotin by the biotin auxotroph *Lactobacillus plantarum*. J. Bacteriol. 175, 7702–7704.
- [42] Viprey, V., Rosenthal, A., Broughton, W.J. and Perret, X. (2000) Genetic snapshots of the *Rhizobium* species NGR234 genome. Genome Biol. 1, 0014.1–0014.17.



## 2 The *Rhizobium etli* *bioMNY* operon is involved in biotin transport

3 Karina Guillén-Navarro <sup>a</sup>, Gisela Araíza <sup>a</sup>, Alejandro García-de los Santos <sup>b</sup>,  
 4 Yolanda Mora <sup>a</sup>, Michael F. Dunn <sup>a,\*</sup>

5 <sup>a</sup> Programa de Ingeniería Metabólica, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México,  
 6 A. P. 565-A, Cuernavaca, Morelos, México

7 <sup>b</sup> Programa de Genética Molecular de Plasmidos Bacterianos, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México,  
 8 A. P. 565-A, Cuernavaca, Morelos, México

Received 21 April 2005; received in revised form 5 July 2005; accepted 14 July 2005

First published online

Edited by W.J. Mitchell

### 12 Abstract

13 Because *Rhizobium etli* CE3 is normally dependent on an external source of biotin and lacks orthodox biotin biosynthesis  
 14 genes, we undertook an analysis of biotin uptake in this organism. By complementation of a *Sinorhizobium meliloti* *bioM* mutant  
 15 we isolated an *R. etli* chromosomal region encoding homologs of the *S. meliloti* *bioMNB* genes, whose products have been impli-  
 16 cated in intracellular biotin retention in that organism. Disruption of the *R. etli* *bioM* resulted in a mutant which took up biotin  
 17 at a lower rate and accumulated significantly less biotin than the wild type. As in *S. meliloti*, the *R. etli* *bioMN* gene-products  
 18 resemble the ATPase and permease components, respectively, of an ABC-type transporter. The *bioB* gene product is in fact sim-  
 19 ilar to members of the BioY family, which has been postulated to function in biotin transport, and we refer to this gene as *bioY*.  
 20 An *R. etli* *bioY* mutant exhibited lower biotin uptake than the wild-type, providing the first experimental evidence for a role of  
 21 BioY in biotin transport. We show that the *bioMNY* operon is transcriptionally repressed by biotin. An analysis of the compet-  
 22 itiveness of the wild-type strain versus the *bioM* mutant showed that the mutant had a diminished capacity to form nodules on  
 23 bean plants.

24 © 2005 Published by Elsevier B.V. on behalf of the Federation of European Microbiological Societies.

25 **Keywords:** Biotin; Rhizobia; *Rhizobium etli*; Transport

### 27 1. Introduction

28 Rhizobia, the collective term for bacteria in the genera  
 29 *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Brady-*  
 30 *rhizobium* and *Azorhizobium*, are able to reduce  
 31 atmospheric nitrogen to ammonia in symbiotic associa-  
 32 tion with a compatible host legume and thus occupy an

important niche in the global nitrogen cycle. Because of  
 33 the agricultural importance of symbiotic nitrogen fixation  
 34 and an academic interest in the symbiotic process,  
 35 the growth requirements and metabolism of rhizobia  
 36 have long been the subject of study (reviewed in [1–3]).  
 37

The B-group vitamin biotin plays a vital metabolic  
 38 role as the prosthetic group of selected carboxylases,  
 39 decarboxylases and transcarboxylases. Biotin was  
 40 shown to promote or be essential for the growth of  
 41 many rhizobia while others are fully prototrophic for  
 42 the vitamin. The biotin-dependent enzymes pyruvate  
 43

\* Corresponding author. Tel.: +52 73 311 4662; fax: +52 73 317  
 5094.

E-mail address: mike@cifn.unam.mx (M.F. Dunn).



44	carboxylase and acyl-coenzyme A carboxylase have	100
45	been characterized in <i>Sinorhizobium meliloti</i> and <i>Rhizo-</i>	101
46	<i>bium etli</i> , and profound changes in global protein	
47	expression, enzyme activities and growth are mediated	
48	by biotin in both organisms [4].	
49	The biotin metabolic pathway starting from pime-	
50	loyl-coenzyme A is common to many organisms and in-	
51	volves four enzymes. These are the products of <i>bioF</i>	
52	(BioF, 8-amino-7-oxononanoate synthase), <i>bioA</i> (BioA,	
53	7,8-diaminopelargonic acid synthase), <i>bioD</i> (BioD,	
54	dethiobiotin synthase), and <i>bioB</i> (BioB, biotin syn-	
55	thase). These genes are usually arranged in operons	
56	and are present in a wide variety of organisms including	
57	bacteria, archaea, and some eukarya (for reviews see [4–	
58	6]). In this paper we refer to the genes encoding the en-	
59	zymes of this pathway as the “orthodox” biotin genes.	
60	Rhizobia such as <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Mesorhiz-</i>	
61	<i>obium loti</i> and <i>Bradyrhizobium japonicum</i> appear to be	
62	capable of synthesizing biotin by the orthodox pathway	
63	using BioF, BioA, BioD and BioB because genes puta-	
64	tively encoding these enzymes are present in their ge-	
65	nomes [7–10]. Genetic complementation studies with	
66	<i>Escherichia coli</i> biotin mutants have demonstrated the	
67	functionality of several biotin biosynthesis genes from	
68	<i>M. loti</i> [11]. In <i>S. meliloti</i> , genes proposed to be involved	
69	in biotin synthesis and/or transport have been desig-	
70	nated <i>bioMNB</i> and have no significant sequence similar-	
71	ity to the orthodox genes [12]. Inactivation of either	
72	<i>bioM</i> or <i>bioN</i> causes biotin auxotrophy and a <i>bioM</i>	
73	strain is deficient in retaining intracellular biotin and	
74	in colonizing alfalfa roots [12,13]. Sequence similarities	
75	suggest that the <i>S. meliloti bioM</i> and <i>bioN</i> are the ATP-	
76	ase and permease components, respectively, of an ABC-	
77	type transporter [12,14], whereas the <i>bioB</i> gene product	
78	sequence is actually homologous to BioY, which has	
79	been implicated in biotin metabolism in <i>Bacillus sphaeri-</i>	
80	<i>cus</i> but the function of which has not been demonstrated	
81	[15]. The <i>bioY</i> products form a unique protein family	
82	(BioY; InterPro IPR003784) whose members have six	
83	probable transmembrane domains typical of prokary-	
84	otic transporters and which were recently proposed,	
85	based on sequence analysis, to play a role in biotin up-	
86	take [14]. To avoid confusion with <i>bioB</i> genes encoding	
87	biotin synthases, we refer in this paper to the <i>S. meliloti</i>	
88	“ <i>bioB</i> ” and its <i>R. etli</i> homolog (see below) as <i>bioY</i> .	
89	We showed previously the importance of exogenous	
90	biotin in the metabolism of <i>R. etli</i> [16]. Using functional	
91	complementation, genome sequence analysis and other	
92	genetic approaches we ascertained that orthodox biotin	
93	biosynthesis genes are not present in <i>R. etli</i> [4] and so fo-	
94	cused on biotin transport in strain CE3, which led to the	
95	cloning of an operon functionally homologous to <i>bio-</i>	
96	<i>MNY</i> present in <i>S. meliloti</i> . We characterized these	
97	genes in <i>R. etli</i> with the aim of (i) determining their pos-	
98	sible roles in biotin transport (ii) investigating their tran-	
99	scriptional regulation by biotin and the biotin vitam- dethiobiotin and (iii) ascertaining the phenotype of <i>bio-</i> <i>MNY</i> mutants in free life and in symbiosis.	146 147

<b>2. Materials and methods</b>	<b>102</b>
<i>2.1. Bacterial strains, plasmids and growth conditions</i>	103
<i>2.2. DNA manipulations</i>	120
<i>2.3. PCR amplifications and cloning of products</i>	135

The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. Rhizobia were grown at 30 °C in PY rich medium (yeast extract, 3 g l<sup>-1</sup>; peptone, 5 g l<sup>-1</sup>, and CaCl<sub>2</sub> 7 mM), or minimal medium (MM) with succinate (10 mM final concentration) as carbon source [16], or in GTS minimal medium [13]. *E. coli* strains were grown at 37 °C on Luria–Bertani (LB) medium [17]. For vitamin supplementation studies, MM was augmented with biotin, dethiobiotin or thiamine to a final concentration of 1 µg ml<sup>-1</sup>. Cells were serially subcultured as described by Encarnación et al. [16]. When required, antibiotics were added at the following concentrations (per milliliter): nalidixic acid (Nal), 20 µg; streptomycin (Sm), 200 µg; kanamycin (Km) 30 µg; gentamicin (Gm), 15 µg; tetracycline (Tc), 10 µg; carbenicillin (Cb), 100 µg, chloramphenicol (Cm), 100 µg.

Conjugation between *E. coli* and *R. etli* or *S. meliloti* was done by tri- or bi-parental matings as described previously [18,19]. Genomic and plasmid DNA isolation, cloning procedures and transformation were performed using standards methods [17]. Restriction digestions were performed as specified by the manufacturer (Amersham). DNA hybridizations were done with DNA probes labeled with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP by random priming with the Amersham Readyprime system. Hybridizations were performed under high-stringency conditions (hybridization overnight at 65 °C, followed by washing at 37 °C in 2× SSC–0.5% SDS for 5 min, 2× SSC–0.1% SDS for 15 min, 30 min in 0.1× SSC–0.5% SDS and finally 30 min in this buffer at 65 °C).

The oligonucleotides used in this study are listed in Table 2. Primer names suffixed Ec or Ba were designed to introduce *EcoRI* or *BamHI* sites, respectively (underlined; Table 2). PCR amplifications were done using *Taq* DNA polymerase (Amersham) with the following program: 95 °C for 5 min followed by 37 cycles of 95 °C for 45 s, 60 °C for 1.5 min and 72 °C for 1.5 min. PCR products (Fig. 1) were purified with Wizard minicolumns (Promega) and ligated into pBRR1MCS-5 [42] (Table 1), digested with the suitable restriction enzymes, such that the genes were placed under control of the *lacZ* promoter of the vector.



Table 1  
Bacterial strains and plasmids

Strain or plasmid	Relevant features	Reference or source
<b>Strains</b>		
<i>R. etli</i>		
CE3	Sm <sup>r</sup> derivative of wild type strain CFN42	[33]
CE3M	CE3 derivative, bioM::ΩKm	This work
CE3Y	CE3 derivative, bioY::ΩKm	This work
CE3pM2	CE3 derivative containing pKG4	This work
CE3pG	CE3 derivative containing pBBMCS53	This work
<i>S. meliloti</i>		
Rm1021	Sm <sup>r</sup> derivative of wild-type strain 2011	[34]
Rm1021-B3	Rm1021 derivative carrying Tn5-B30 in bioM, Tc <sup>r</sup>	[13]
Rm1021-B3a	Rm1021-B3 derivative containing pKG2	This work
Rm1021-B3b	Rm1021-B3 derivative containing pMMB206	This work
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>SupE44 lacU169 (80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Bethesda Research Laboratories
S17-1	C600::RP-4-2 (Tc::Mu) (Km::Tn7)	[35]
HB101	F <sup>-</sup> <i>recA13</i> ; host for <i>R. etli</i> pLAFR1 genomic library	[36]
<b>Plasmids</b>		
pSK+	pBluescript II SK + cloning vector, Ap <sup>r</sup>	Stratagene
pBCSK+	pBluescript BC SK + cloning vector, Cm <sup>r</sup>	Stratagene
pBCKS+	pBluescript BC KS + cloning vector, Cm <sup>r</sup>	Stratagene
pIC20R	pUC8 derivative with extended polylinker, LacZα, Cb <sup>r</sup>	[37]
pRK2013	Conjugation helper plasmid, Km <sup>r</sup>	[38]
pKOK4	Suicide cloning vector, Ap <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	[39]
pBSL128	Modified pBCKS + plasmid with direct multiple cloning sites flanking the ΩKm cassette, Cb <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	[40]
pMMB206	Broad-host-range cloning vector, Cm <sup>r</sup>	[41]
pBBR1MCS-5	Broad-host-range cloning vector, Gm <sup>r</sup>	[42]
pBBMCS53	Δ <i>placZ</i> pBBR1MCS-5 derivative carrying the promoterless <i>gusA</i> gene from pWM5, Gm <sup>r</sup>	[43]
pWM5	Source of the <i>gusA</i> cassette, Sp <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup>	[44]
pREB13	pLAFR1 harboring 7 kb of <i>R. etli</i> genomic DNA containing <i>bioMNY</i> , Tc <sup>r</sup>	This work
pREBb	pREB13 subclone with 3.7 kb <i>EcoRI</i> fragment containing <i>bioMNY</i>	This work
pKG1	pSK + harboring the 3.7 kb <i>EcoRI</i> fragment containing <i>bioMNY</i>	This work
pKG1a	pBCSK + with a 1.4 kb <i>EcoRI</i> - <i>SmaI</i> fragment containing the <i>R. etli</i> <i>bioM</i> promoter	This work
pKG1aR	pIC20R carrying the 1.4 kb <i>EcoRI</i> - <i>SmaI</i> fragment with the <i>R. etli</i> <i>bioM</i> promoter	This work
pKG1b	pBCSK + harboring 2.2 kb <i>EcoRI</i> - <i>XhoI</i> fragment with the complete <i>R. etli</i> <i>bioN</i> and <i>bioY</i> genes	This work
pKG2	pMMB206 harboring the 3.7 kb <i>EcoRI</i> fragment with the complete <i>R. etli</i> <i>bioMNY</i>	This work
pKG4	pBBMCS53 <i>bioM::gusA</i> fusion construct	This work
pKG5	pKOK4 carrying 3.7 kb <i>EcoRI</i> fragment with the <i>R. etli</i> <i>bioMNY</i> operon	This work
pKG6	pKG5 containing <i>bioM::ΩKm</i> in the <i>SmaI</i> site	This work
pKG6b	pKG5 containing <i>bioY::ΩKm</i> in the <i>NorI</i> site	This work
pKG7	pBBR1MCS-5 carrying a 1172 bp PCR product containing <i>bioM</i> generated with primers UbioM-Ec and LbioM-Ba	This work
pKG9	pBBR1MCS-5 carrying a 728 bp PCR product containing <i>bioY</i> generated with primers UbioY-Ec and LbioY-Ba	This work
pKG10	pBBR1MCS-5 carrying a 2185 bp PCR product with <i>bioMNY</i> generated with primers UbioM-Ec and LbioY-Ba	This work
pKG11	pBBR1MCS-5 carrying a 2.2 kb <i>XhoI</i> - <i>EcoRI</i> fragment containing the complete <i>bioN</i> and <i>bioY</i> genes	This work

#### 148 2.4. Construction of the *R. etli* bioM and bioY mutants

149 Mutants were generated by inserting a ΩKm cassette  
 150 [40] into *bioM* or *bioY* as follows. The 3.7 kb *EcoRI*  
 151 fragment from pKG1 harboring the complete *bioMNY*  
 152 operon was cloned in vector pKOK4 [39] to give  
 153 pKG5. A ΩKm cassette from pBSL128 [40] was inserted  
 154 into the *SmaI* site of *bioM* or the *NorI* site of *bioY* in

pKG5 (Fig. 1) to produce pKG6 and pKG6b, respec- 155  
 tively. These constructs were mobilized into strain CE3 156  
 and Km<sup>r</sup> Cb<sup>r</sup> Tc<sup>r</sup> double recombinants (strains CE3M 157  
 and CE3Y respectively) were selected. The presence of 158  
 the interrupted *bioM* or *bioY*, and absence of vector se- 159  
 quence, was verified by Southern hybridization. PCR 160  
 analysis of DNA from CE3M using *bioM* intragenic 161  
 primers M1-U and M1-L, and from CE3Y using *bioY* 162

Table 2  
Oligonucleotides used in this work

Primers	Sequence (5'–3')	Use of the primers
UbioM-Ec	GGAAATTC AACCGTATAGAAGGAGCG	Upper primer for <i>bioM</i> cloning
LbioM-Ba	GACGGATCCAATCGTCAGGAAGATCG	Lower primer for <i>bioM</i> cloning
UbioY-Ec	AGAATTCGCCGACGAGCCTGCTTGCG	Upper primer for <i>bioY</i> cloning and confirming the CE3Y construct
LbioY-Ba	GCGGATCCTGTGCGGTATGCTCAGCAA	Lower primer for <i>bioY</i> cloning and confirming the CE3Y construct
M1-U	AGATCGAGGCAAGGGTCGAGG	Upper primer for confirming the CE3M construct
M1-L	CGATGATCCTCTCGACCAGC	Lower primer for confirming the CE3M construct
BSL-L1	GCTTGCTCAATCAATCACCG	Upper and lower primer for confirming the CE3M and CE3Y constructs

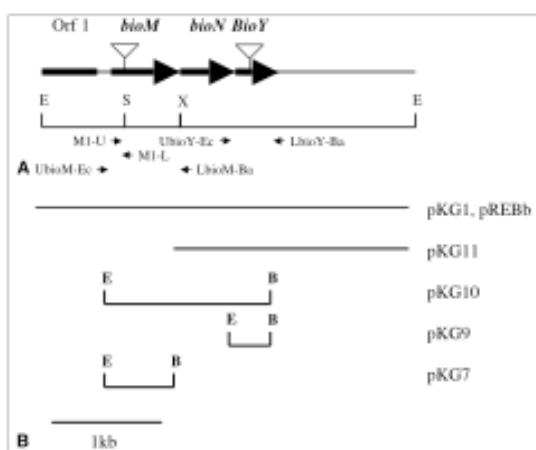


Fig. 1. (A) Physical map of the *R. etli* CE3 *bioMNY* region. The  $\Omega$ Km insertions in strains CE3M and CE3Y are indicated by inverted triangles. Restriction enzyme sites: E, *EcoRI*; S, *SmaI*; X, *XbaI*. Small arrows show the region amplified with the oligonucleotide primers described in the text. (B) Plasmid inserts tested for growth complementation of strain CE3M. Restriction sites in boldface (E, *EcoRI*; B, *BamHI*) are those introduced by PCR amplification.

163 intergenic primers UbioY-Ec and LbioY-Ba (Fig. 1), in  
164 combination with primer BSL-L1, which corresponds to  
165 both ends of the  $\Omega$ Km cassette, yielded products of the  
166 size expected (approximately 200 bp for CE3M and  
167 300 bp for CE3Y).

#### 168 2.5. Construction of the *bioM::gusA* transcriptional 169 fusion and $\beta$ -glucuronidase assays

170 The 1.4 kb *EcoRI*–*SmaI* fragment from pREB13 was  
171 cloned in pBCSK + (Stratagene) to produce pKG1a  
172 (Table 1). This insert contains 561 nt of the upstream,  
173 divergently transcribed *Orf1* (Fig. 1) next to *bioM*, the  
174 *Orf1*–*bioM* intergenic region (designated the *p<sub>bioM</sub>* region),  
175 and the first 459 nt of *bioM*. The 1.4 kb fragment  
176 was removed from pKG1a using the *BamHI*–*SaI* sites  
177 of the polylinker and cloned into pIC20R [37] to give  
178 pKG1aR. Finally, the fragment in pKG1aR was re-  
179 moved using the *KpnI*–*SaI* sites of the polylinker and  
180 inserted into pBBMCS53 [43] to produce pKG4, in  
181 which *p<sub>bioM</sub>* and *gusA* have the same transcriptional

orientation. Cultures of *R. etli* derivatives harboring  
transcriptional fusion plasmid pKG4 (strain CE3pM2)  
or plasmid pBBMCS53 (strain CE3pG) were precul-  
tured in MM lacking supplements and used to inoculate  
fresh MM or MM supplemented with biotin, thiamine  
or dethiobiotin. One milliliter samples of the cultures  
were taken at 8, 12, 24 and 48 h, which correspond to  
mid-log, late-log, early stationary and late stationary  
phases, respectively.  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) activity  
was measured in the samples with *p*-nitrophenyl  $\beta$ -D-glu-  
curonide (PNPG) as substrate and specific activities are  
expressed in nmol *p*-nitrophenol formed  $\text{min}^{-1} \text{OD}_{540}^{-1}$   
of cell suspension [20].

#### 2.6. Nodulation and nitrogen fixation assays

Plant assays using *Phaseolus vulgaris* cv. Negro jam-  
apa were performed as described previously [18], but  
with washed 24 h cells from the second MM subculture  
used as inoculum. Acetylene reduction assays, nodule  
number and plant and nodule dry weight determinations  
were performed using 25 plants per inoculum strain  
tested. Nodule occupancy was determined on 20 nodules  
from each of 5 plants, with each plant being inoculated  
with 1 ml of suspension containing  $4.5 \times 10^5$  cells  $\text{ml}^{-1}$   
of both strains CE3 and CE3M. Additional nodulation  
competition assays between CE3, CE3M and CE3M/  
pKG10 (Table 1) were performed as described by Brom  
et al. [21], but with washed 24 h cells from the second  
MM subculture used as inoculum, and nodule occu-  
pancy determined on 10 nodules from each of 10 plants.

#### 2.7. Biotin transport assays

For uptake studies using resting cells of *R. etli*, cul-  
tures were grown in PY rich medium for 24 h, washed  
twice with uptake buffer (50 mM potassium phosphate  
(pH 6.6), 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100  $\mu\text{g Cm ml}^{-1}$ ) and resus-  
pended in fresh buffer to an  $\text{OD}_{540}$  of  $3.0 \pm 0.1$ . The cell  
suspension (1.5 ml per assay) was equilibrated at 30 °C  
for 10 min before adding biotin to a final concentration  
of 25.5 pM containing  $2.8 \times 10^{-5}$  MBq d-[8,9- $^3\text{H}$ ]biotin.  
To measure intracellular biotin content at different time  
points, 200  $\mu\text{l}$  aliquots were rapidly filtered through Mil-  
lipore HA-type 0.45- $\mu\text{m}$  nitrocellulose filters and washed

twice with 5 ml portions of ice-cold uptake buffer. The filters were air-dried and then combined with 5 ml scintillation fluid [22] and radioactivity determined in a liquid scintillation counter. To determine the biotin content of the extracellular medium, 200  $\mu$ l aliquots were removed at the same time points as for intracellular biotin determinations, centrifuged in a microcentrifuge at maximum speed for 15 s, and 150  $\mu$ l of supernatant combined with scintillation fluid and radioactivity determined as described above.

Biotin incorporation by growing cells was determined during growth in MM supplemented with biotin at a final concentration of 0.532 nM containing 0.041 MBq d-[8,9- $^3$ H]biotin. Washed cells from PY cultures were used as inoculum. At intervals, 1.5 ml of culture was pelleted in a microcentrifuge and radioactivity determined in triplicate 250  $\mu$ l aliquots of supernatant. The remaining supernatant was carefully aspirated and the cell pellets resuspended in 150  $\mu$ l water. Following what is essentially the biotin uptake assay described by Cronan [23], 100  $\mu$ l of resuspended sample was spotted onto a 2  $\times$  2 cm $^2$  of blotter paper, the paper was washed twice with 5 ml of 10% trichloroacetic acid and twice with 5 ml 5% trichloroacetic acid, and then transferred to a vial containing scintillation fluid and radioactivity determined as described above.

### 2.8. Sequencing and sequence analysis

Nucleic acid sequencing was done with an Applied Biosystems (Foster City, CA) 373 A DNA sequencing system. Nucleotide and protein sequence homology searches were made using the BLAST program [24] via the National Center for Biotechnology Information server. Multiple protein sequence alignments were made with the Multalin program 1.5 [25] at the Network Protein Sequence Analysis server. Protein signal sequence and transmembrane domains were searched for using the SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/>) [26] and TMHMM programs (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) [27], respectively. The GenBank Accession No. for the *R. etli* bioMNY nucleotide sequence reported in this paper is AY644481.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Cloning of the bioMNY operon from *R. etli* CE3

Attempts at functional complementation of orthodox biotin gene mutants of *E. coli* or *M. luti* with a *R. etli* CE3 gene bank, and identification of *bioB* homologs by PCR or hybridization techniques were unsuccessful. These results and analysis of the *R. etli* genome sequence suggest that it does not encode the orthodox *bio* genes with the exception of a possible *bioA* homolog [4]. We

thus focused on biotin uptake in strain CE3, mobilizing a pLAFR1 cosmid bank of this strain [36] into *S. meliloti* *bioM* mutant Rm1021-B3 (Table 1) followed by selection on GTS medium lacking biotin. Following a 2 day, 30 °C incubation, larger colonies were picked from a background of microcolonies and streaked onto GTS with or without 0.04 U ml $^{-1}$  avidin. Avidin is a biotin-binding protein, which would sequester any free biotin introduced into the medium as a contaminant of the agarose or other medium components. Strain Rm1021-B3 is unable to grow on GTS containing avidin and forms only microcolonies on GTS without avidin: several putatively complemented clones of the mutant were selected owing to their ability to form small colonies on the avidin-containing medium and larger colonies on the medium lacking avidin. Cosmids isolated from several of these clones revealed a number of different restriction patterns, all of which contained three common *EcoRI* bands. The cosmid containing the smallest insert, designated pREB13 (Table 1) was further characterized. *EcoRI* fragment deletion subcloning localized the complementing region of pREB13 to a 3.7 kb *EcoRI* fragment. This fragment cloned either in vector pLAFR1 (plasmid pREBb) or vector pMMB206 [41] (plasmid pKG2; Table 1) allowed wild-type growth of Rm1021-B3 on GTS medium lacking biotin. We observed a clear complementation of Rm1021-B3 by pKG2 in MM batch cultures, where it grew similarly to the *S. meliloti* Rm-1021 wild-type, while a control strain containing the vector pMMB206 grew similarly to *bioM* mutant Rm1021-B3 (results not shown). Thus, plasmid pKG2 expresses a gene that is functionally homologous to *S. meliloti* *bioM*.

The nucleotide sequence of the 3.7 kb region of *R. etli* DNA complementing *S. meliloti* Rm1021-B3 revealed three open reading frames (Orfs) with similarity to *S. meliloti* *bioMNY*, with the genes arranged in the same order (Fig. 1). The *R. etli* *bioM*, *bioN* and *bioY* genes encode predicted products of 223, 201, and 185 aa, with amino acid sequence identities of 60%, 47% and 54%, respectively, to the corresponding deduced protein products from *S. meliloti*. Upstream of *bioM* a divergent partial Orf is predicted to encode the first 196 aa of a protein with 70% identity to the corresponding region of *S. meliloti* Orf Y00961, which occurs in the same relative position in that organism. A possible ribosomal binding site (AGGTA), preceded by a putative -35 promoter region (TTGACC), occurs before *bioM*; we did not find a corresponding -10 region. *bioM* has a TTG start codon inferred by the deduced translation product sequence alignment with BioM from *S. meliloti*. The *S. meliloti* *bioM* promoter contains these features in addition to a possible -10 region, but apart from this has little similarity to the promoter region of *R. etli*. In agreement with the *S. meliloti* BioM and BioN similarity search results of Entcheva et al. [12], the *R. etli* BioM



329 and BioN are most similar to cobalt transporter ATPase  
330 (CbiO) and permease (CbiQ) components, which occur  
331 in a number of bacteria. Based on studies of biotin  
332 transport in the *S. meliloti* wild-type and a *bioM* mutant,  
333 Entcheva et al. [12] suggested that *bioMN* were involved  
334 in retaining intracellular biotin rather than its transport.  
335 The biotin transport characteristics of the *R. etli bioM*  
336 mutant (see below) show that the *bioMNY* operon is in-  
337 volved in biotin transport at low extracellular concentra-  
338 tions of the vitamin.

339 Previously, the involvement of BioY in biotin metabo-  
340 lism in *B. sphaericus* was suggested [15], and *bioY*  
341 homologs occur in many bacteria, alone or sometimes  
342 associated with *bioM* and *bioN* homologs or with genes  
343 involved in biotin biosynthesis [4,14]. Interestingly, *A.*  
344 *tumefaciens* has three contiguous Orfs encoding proteins  
345 with 62%, 48%, and 68% deduced amino acid identity to  
346 the *R. etli bioM*, *bioN* and *bioY* predicted gene products  
347 and it also encodes the orthodox *bio* genes (in the oper-  
348 on *bioBFDA*) in a different place in its chromosome [10].  
349 Other rhizobia like *M. loti* and *B. japonicum* have only a  
350 *bioY* homolog in addition to the orthodox *bio* genes  
351 [8,9], while *S. meliloti* contains *bioM*, *bioN* and *bioY*  
352 but lacks functional orthodox biotin genes with the  
353 exception of *bioF* [7,12]. In *R. etli*, which also lacks  
354 orthodox biotin genes (except for a putative *bioA* homo-  
355 log [4]), a functional *bioMNY* operon is sufficient to al-  
356 low good growth when a minimal concentration of  
357 exogenous biotin is present, as described below.

### 358 3.2. Growth characteristics of the *R. etli bioM* mutant

359 We constructed a double recombinant strain (CE3M)  
360 in which *bioM* was insertionally inactivated (Fig. 1) and  
361 analyzed its growth in MM in the presence or absence of  
362 biotin or the biotin vitamer dethiobiotin. Strain CE3M  
363 showed a biotin auxotrophic phenotype during the sec-  
364 ond subculture in MM lacking biotin (Fig. 2A).  
365 Although the mutant also grew more slowly than wild-  
366 type strain CE3 in MM supplemented with dethiobiotin  
367 or biotin, it eventually attained the same cellular density  
368 (Fig. 2A). These results are consistent with a transport  
369 defect in the mutant, which is largely overcome by the  
370 entry of biotin into the cell by passive diffusion (as can  
371 occur in *E. coli*, [28]) and the results of transport assays  
372 (see below) suggest that biotin uptake in the mutant is  
373 affected only at very low biotin concentrations.

374 Introduction of pKG10 (containing the *R. etli bio-*  
375 *MNY* operon) or pKG11 (containing *bioNY*) into  
376 CE3M (Fig. 2A and B), but not pKG7 (containing only  
377 *bioM*; Fig. 2C) or vector alone (pBBR1MCS-5) (result  
378 not shown), restored its growth in MM and MM supple-  
379 mented with biotin or dethiobiotin. The mutant could be  
380 partially complemented by pKG9 (*bioY*) (Fig. 2D).  
381 These results suggest that *bioM* by itself cannot comple-  
382 ment CE3M because *bioNY* transcription does not occur

383 in the mutant. Functional complementation of CE3M  
384 by the plasmid containing *bioNY*, might occur because  
385 the missing BioM is cross-complemented by the ATPase  
386 component of a different ABC-type transporter, consis-  
387 tent with the ATPase being the most conserved compo-  
388 nent of ABC-type transporters [32]. Examples of this  
389 type of functional cross-complementation have been re-  
390 ported in *Salmonella typhimurium* [29] and *E. coli* [30].  
391 The fact that *bioY* could support partial growth of the  
392 mutant indicates that it by itself is able to fulfil some  
393 function related to biotin transport (see below).

### 394 3.3. The *bioMNY* operon is involved in biotin transport

395 The incorporation of biotin by resting cells, and its  
396 concomitant disappearance from the assay medium,  
397 was determined for the wild-type and *bioM* mutant  
398 strains. Cells were obtained from PY cultures grown  
399 for 24 h and therefore correspond to the physiological  
400 state of the cells used to inoculate the MM cultures  
401 for the long-term incorporation studies described below.  
402 Strain CE3M transported biotin at a slower rate and  
403 incorporated it to a lower final intracellular concentra-  
404 tion than did wild-type CE3 (Fig. 3). Differences in bio-  
405 tin transport were most evident at the earliest time point  
406 assayed (2 min), where incorporation in the mutant was  
407 only 38% that of the wild-type. Neither strain incorpo-  
408 rated additional biotin at 30 min or beyond, with the to-  
409 tal biotin incorporated in the mutant being about 80%  
410 that of the wild type. The slower transport rate of the  
411 mutant was mirrored by the lower rate of biotin disap-  
412 pearance from the assay medium in comparison to the  
413 wild-type. Similar differences in biotin transport were  
414 found at biotin concentrations ranging from 10 to  
415 100 pM, beyond which no differences were seen.

416 To further characterize the biotin transport function  
417 of the *bioMNY* operon, we analyzed the ability of  
418 wild-type CE3 and *bioM* mutant CE3M to accumulate  
419 <sup>3</sup>H-biotin during growth in MM (Fig. 4). Data are pre-  
420 sented for CE3M containing the control vector  
421 (pBBR1MCS-5) to allow comparison with the biotin  
422 incorporation by plasmid-complemented CE3M strains  
423 discussed below: biotin incorporation by strain CE3M  
424 was essentially identical to that of CE3M/vector. Biotin  
425 accumulation in CE3M/vector was 50% that of wild-  
426 type strain CE3 after 4 h of growth, with this difference  
427 progressively diminishing with further growth, possibly  
428 as a result of the passive diffusion of biotin across the  
429 membrane. The lower biotin accumulation in the mu-  
430 tant is consistent with its markedly slower growth in  
431 MM with biotin (Fig. 2A). Differences in biotin accumu-  
432 lation between CE3 and CE3M/vector were found only  
433 when the biotin concentration was lower than 0.532 nM;  
434 at higher concentrations the levels of biotin incorpo-  
435 rated by wild-type and mutant were similar (results  
436 not shown).

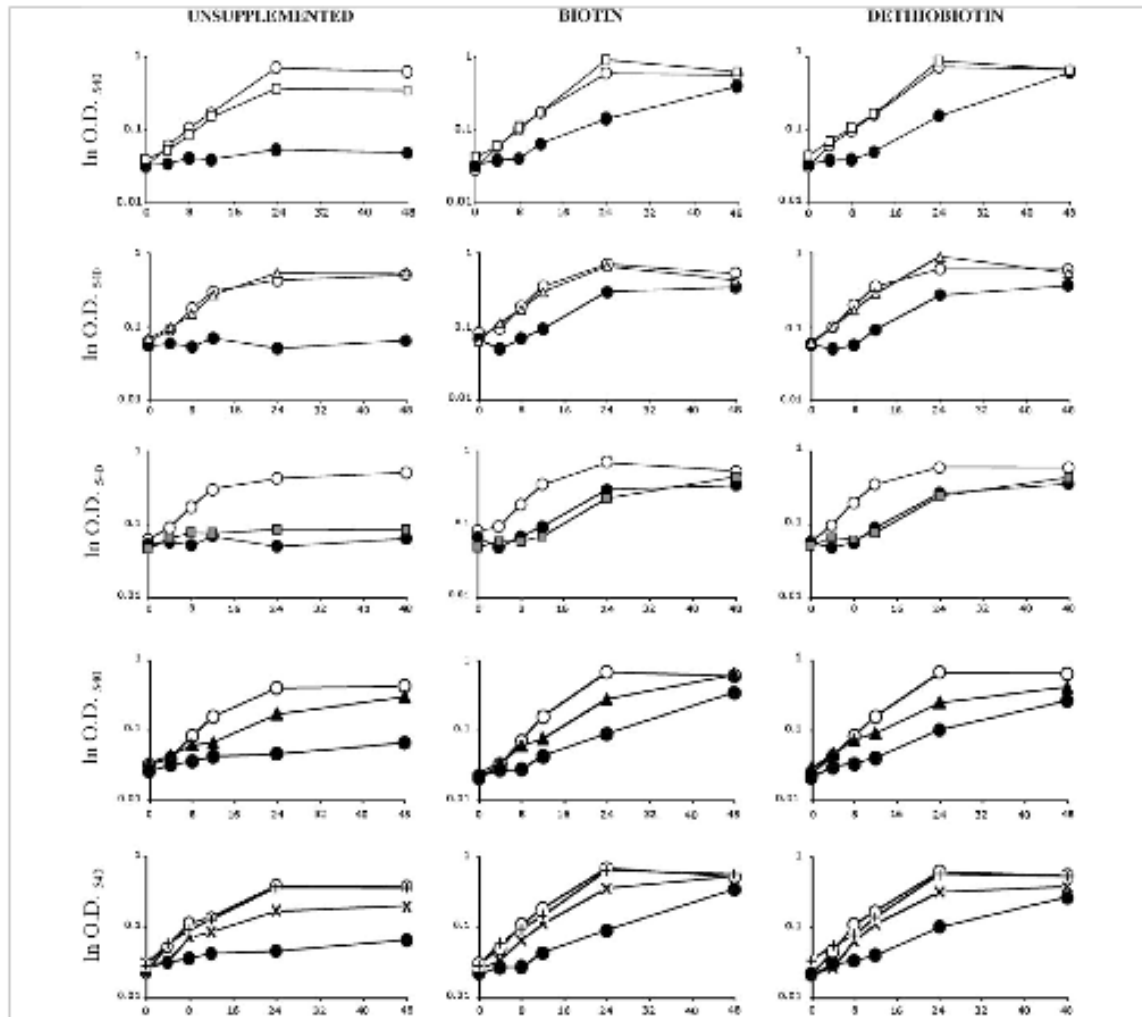


Fig. 2. Growth curves from complementation analysis during the 2nd subculture in minimal medium with or without biotin or dethiobiotin. Results are the mean for two independent experiments each assaying duplicate samples. Values for each point differed from the mean by less than 10%. CE3, open circles; CE3M, closed circles; CE3M/pKG10, open squares; CE3M/pKG11, open triangles; CE3M/pKG7, grey squares; CE3M/pKG9, closed triangles; CE3Y, X's; CE3Y/pKG9, crosses.

437 Strain CE3M complemented with pKG10 (contain- 449  
 438 ing *bioMNY*) showed equal to or greater than wild-type 450  
 439 biotin accumulation (Fig. 4) and grew as well as the 451  
 440 wild-type strain (Fig. 2A). Biotin accumulation by 452  
 441 CE3M/pKG11 (*bioNY*) was significantly higher than 453  
 442 that of the mutant, suggesting the possibility that 454  
 443 the role of *bioM* might be fulfilled by another ATPase 455  
 444 component. Introduction into CE3M of *bioM* alone (plas- 456  
 445 mid pKG7) slightly increased biotin accumulation in 457  
 446 the mutant at 4–8 h, but to a level lower than that ob- 458  
 447 served in complementation with pKG10 or pKG11, 459  
 448 indicating that *bioM* can function to some extent with 460

other permease components to facilitate biotin uptake. 449  
 The increased biotin accumulation in CE3M/pKG9 450  
 (*bioY*) is consistent with its good growth, relative to 451  
 CE3M, in MM containing biotin (Fig. 2D). This indicates 452  
 that the *R. etli* BioY plays a role in biotin transport 453  
 (see below) and provides the first experimental evidence 454  
 for the function of a *bioY* product, whose family mem- 455  
 bers are currently reported in the InterPro database as 456  
 being of “unknown function”. 457

These results show that biotin transport is increased 458  
 in the presence of a functional *bioMNY* operon. From 459  
 their sequence similarities, *bioM* and *bioN* likely en- 460

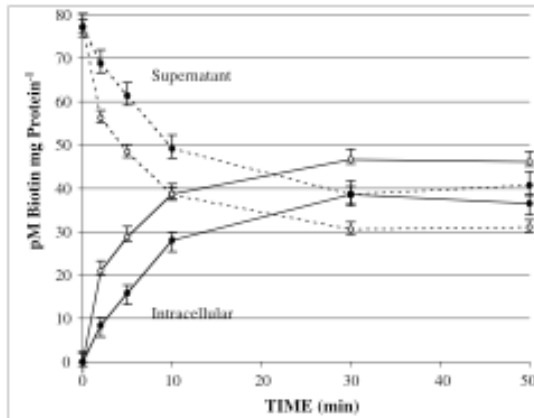


Fig. 3. Biotin uptake by resting cells of the *R. etli* wild-type (open circles) and *bioM* mutant (closed circles) taken from 24 h PY cultures. Assay mixtures contained 25.5 pM biotin containing  $2.8 \times 10^{-5}$  MBq d[8,9- $^3$ H]biotin. Continuous and broken lines show intracellular and supernatant biotin levels, respectively. Values are the average  $\pm$  standard error for four independent experiments.

461 code an ATPase and permease, respectively of an  
 462 ABC-type transporter which lacks a contiguously-en-  
 463 coded substrate-binding protein, as has been shown  
 464 in some other members of the family [30,32]. It is  
 465 possible that in the organisms lacking *bioMN* but con-  
 466 taining *bioY*, BioY could function as a permease  
 467 protein alone or with a different ATPase subunit.  
 468 The *R. etli* BioY has a putative signal peptide com-  
 469 prised of amino acids 1–29 with a possible cleavage

470 site between residues 29 and 30. Additionally, it has  
 471 at least five possible transmembrane segments pre-  
 472 dicted by computational methods (see Materials and  
 473 methods), indicating that it may function as a perme-  
 474 ase in biotin transport, in agreement with our trans-  
 475 port assay results.

476 Because *bioY* was able to partially complement the  
 477 growth (Fig. 2D) and biotin transport (Fig. 4) defects  
 478 of the *bioM* mutant, we constructed the double recombi-  
 479 nant strain CE3Y in which *bioY* was insertionally inac-  
 480 tivated (Fig. 1) to further investigate the role of this gene  
 481 in biotin transport. In MM, CE3Y grew more poorly than  
 482 the CE3 wild-type but better than the CE3M mutant,  
 483 despite the fact that it did not incorporate more  
 484 biotin than the latter strain (see below). Introduction  
 485 of pKG9 (containing the *R. etli* *bioY*), but not the vector  
 486 alone (pBBR1MCS-5), into CE3Y restored its growth in  
 487 MM (Fig. 2E and results not shown).

488 We analyzed the ability of strain CE3Y to accumu-  
 489 late  $^3$ H-biotin during growth in MM (Fig. 4). During  
 490 the first 12 h of growth the *bioY* mutant accumulated  
 491 significantly less biotin than the wild-type in a manner  
 492 similar to that of mutant CE3M. Introduction of plas-  
 493 mid pKG9 (containing *bioY*) restored biotin accumula-  
 494 tion in CE3Y to near wild-type levels. It is possible  
 495 that BioM and BioN in strain CE3Y associate with  
 496 a protein similar to BioY in order to allow better  
 497 growth and biotin transport, although no close homo-  
 498 logs to *bioY* exist in strain CE3. In any case, the  
 499 diminished capability of the *bioY* mutant to transport  
 500 biotin indicates a role for the gene product in biotin  
 501 transport.

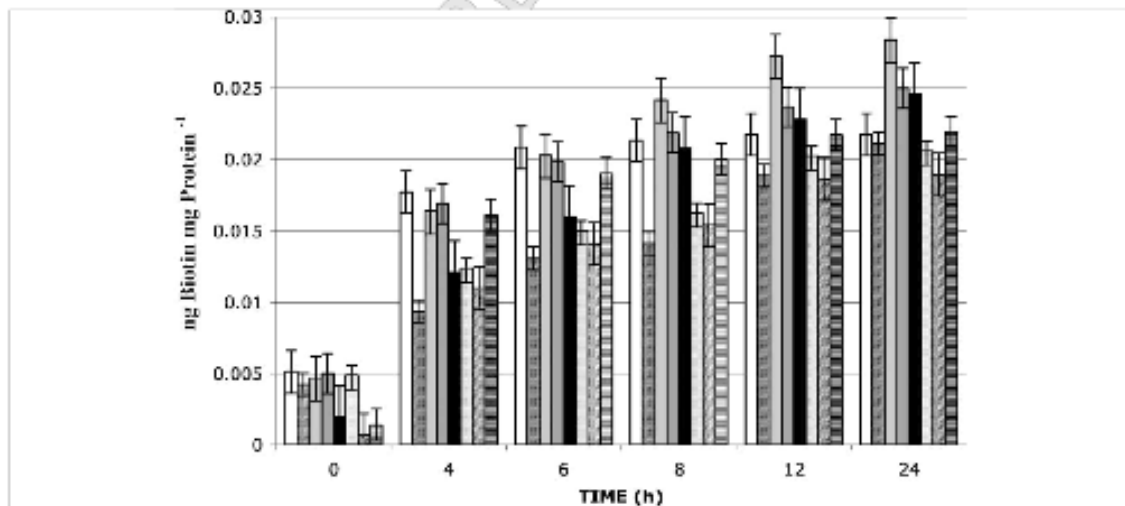


Fig. 4. Intracellular biotin incorporation by growing cells during growth in minimal medium supplemented with 0.532 nM total biotin (containing 0.041 MBq d[8,9- $^3$ H]biotin). Results are the mean  $\pm$  S.E. for two independent experiments, each with triplicate assays per sample. CE3, white bars; CE3M-vector, cross-hatched bars; CE3M/pKG10, light grey bars; CE3M/pKG11, dark grey bars; CE3M/pKG9, black bars; CE3M/pKG7, stippled bars; CE3Y-vector, thick cross-hatched bars; CE3Y/pKG9, horizontally lined bars.



502 3.4. Biotin represses *pbioM* transcription

503 To analyze the transcription of the *R. etli bioMNY*  
 504 operon, we constructed plasmid pKG4 (Table 1) in  
 505 which the promoter region of *bioM* (*pbioM*) is transcrip-  
 506 tionally fused to the *gusA* gene encoding  $\beta$ -glucuronidase (GUS). GUS expression was tested in the wild-  
 507 type strain CE3 background (strains CE3pM2 and  
 508 CE3pG) during growth in MM and in MM supple-  
 509 mented with biotin, dethiobiotin or thiamine. GUS  
 510 activity in CE3pG, used as a control, was always less  
 511 than 0.5 nmol PNP min<sup>-1</sup> OD<sub>540</sub><sup>-1</sup>. At all time points as-  
 512 sayed, GUS expression in CE3pM2 was significantly  
 513 higher in unsupplemented MM as compared to MM  
 514 containing any of the supplements, with the lowest  
 515 GUS expression occurring in the MM containing biotin  
 516 (20–40% of that occurring in MM; Fig. 5). Thus, the  
 517 expression of the *bioMNY* operon was markedly  
 518 reduced during growth in the presence of biotin as  
 519 would be expected for a high affinity biotin transport  
 520 system. Interestingly, expression was also diminished,  
 521 but less drastically, in cultures containing dethiobiotin  
 522 or thiamine. This repression may be an indirect effect  
 523 resulting from the conversion of the vitamer dethiobi-  
 524 otin into biotin, or the induction of de novo biotin  
 525 biosynthesis by thiamine. Thiamine supplementation  
 526 of *R. etli* cultures has previously been shown to maintain  
 527 biotin-dependent carboxylase enzyme activities and  
 528 holo-enzyme levels by apparently stimulating biotin  
 529 synthesis [16,18]. As *R. etli* does not encode a *bioB*  
 530 homolog, biotin synthesis from dethiobiotin would have  
 531 to be performed by an unknown reaction not involving  
 532 an orthodox biotin synthase.  
 533

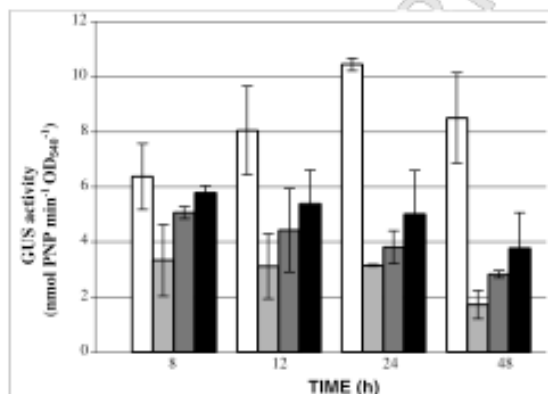


Fig. 5. *bioM* promoter:*gusA* fusion protein expression in *R. etli* strain CE3pM2. Cells were grown in MM (white bars), or MM with biotin (light grey bars), dethiobiotin (dark grey bars) or thiamine (black bars) and assayed for GUS activity at the times indicated. Values are the mean  $\pm$  S.E. for two independent experiments each using duplicate assays of duplicate cultures.

534 3.5. The *bioM* mutant is less competitive for nodulation

535 We analyzed the wild-type strain versus *bioM* mutant  
 536 CE3M in symbiosis with bean plants. No statistically  
 537 significant differences in acetylene reduction, nodule  
 538 number, or plant and nodule dry weights were apparent  
 539 between the two strains. We did observe, however, a  
 540 diminished capacity of strain CE3M to form nodules  
 541 when co-inoculated in a 1:1 mixture with the wild-type,  
 542 where the percentage of nodules formed by the wild-type  
 543 was 70% versus 30% for the *bioM* mutant. In additional  
 544 experiments using the procedure of Brom et al. [21] the  
 545 percentage of nodules formed by CE3 and CE3M were  
 546 84% and 16% respectively. Introducing pKG10 (con-  
 547 taining *bioMNY*) into CE3M, restored wild-type nodule  
 548 formation: in two independent competition assays using  
 549 a 1:1 mixture of strains CE3M/pKG10 and CE3M, 71%  
 550 and 73% of nodules were formed by the complemented  
 551 strain, versus 29% and 27% by mutant CE3M. These  
 552 findings strengthen the contention that uptake of  
 553 plant-derived biotin is important in the *Rhizobium*-le-  
 554 gume symbiosis [13].

## 555 4. Uncited reference

[31].

## 556 Acknowledgments

557 This work was partially supported by Grant 31711-N  
 558 from CONACyT. K.G.-N. thanks CONACyT (Grant  
 559 138526), DGEP-UNAM and DGAPA-UNAM (pro-  
 560 jects 202327 and 202363) for financial support. We  
 561 acknowledge P. Gaitán and E. López for the synthesis  
 562 of oligonucleotides. We thank G. Dávila, V. González,  
 563 R. Gómez, and P. Bustos for providing *R. etli* genome  
 564 sequence data prior to publication and S. Brom for  
 565 reviewing the manuscript.  
 566

## 567 References

- 568 [1] Allen, E.K. and Allen, O.N. (1950) Biochemical and symbiotic  
 569 properties of the rhizobia. *Bacteriol. Rev.* 14, 273–330.
- 570 [2] Dunn, M.F. (1998) Tricarboxylic acid cycle and anaplerotic  
 571 enzymes in rhizobia. *FEMS Microbiol. Rev.* 22, 105–123.
- 572 [3] Lodwig, E. and Poole, P. (2003) Metabolism of *Rhizobium*  
 573 bacteroids. *Crit. Rev. Plant Sci.* 22, 37–78.
- 574 [4] Guillén-Navarro, K., Encarnación, S. and Dunn, M.F. (2005)  
 575 Biotin biosynthesis, transport and utilization in rhizobia. *FEMS*  
 576 *Microbiol. Lett.* 246, 159–165.
- 577 [5] Schneider, G. and Lindquist, Y. (2001) Structural enzymology of  
 578 biotin biosynthesis. *FEBS Lett.* 495, 7–11.
- 579 [6] Streit, W. and Entcheva, P. (2003) Biotin in microbes, the genes  
 580 involved in its biosynthesis, its biochemical role and perspectives  
 581 for biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61,  
 582 21–31.

- 583 [7] Capela, D., Barloy-Hubler, F., Gouzy, J., Bothe, G., Ampe, F.,  
584 Batut, J., Boistard, P., Becker, A., Bountry, M., Cadieu, E.,  
585 Dréano, S., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Kahn, D., Kiss,  
586 E., Lalaurie, V., Masuy, D., Pohl, T., Porételle, D., Pühler, A.,  
587 Plurnelle, B., Ramsperger, U., Renard, C., Thébault, P.,  
588 Vandenbol, M., Weidner, S. and Galibert, F. (2001) Analysis  
589 of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium*  
590 *mellotii* strain 1021. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98,  
591 9877–9882.
- 592 [8] Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T.,  
593 Sasamoto, S., Watabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawa-  
594 shima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M.,  
595 Matsumoto, M., Matsumo, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S.,  
596 Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada,  
597 M. and Tabata, S. (2000) Complete genome structure of the  
598 nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. DNA  
599 Res. 7, 331–338.
- 600 [9] Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiyumi,  
601 T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Iriguchi, M.,  
602 Kawashima, K., Kohara, M., Matsumoto, M., Shimpo, S.,  
603 Tsuruoka, H., Wada, T., Yamada, M. and Tabata, S. (2002)  
604 Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium  
605 *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. DNA Res. 9, 189–  
606 197.
- 607 [10] Wood, D.W., Setubal, J.C., Kaul, R., Monks, D.E., Kitajima,  
608 J.P., Okura, V.K., Zhou, Y., Chen, L., Wood, G.E., Almeida Jr.,  
609 N.F., Woo, L., Chen, Y., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Karp, P.D.,  
610 Bovee, D.Sr., Chapman, P., Clendenning, J., Deatherage, G.,  
611 Gillet, W., Grant, C., Kutayavin, T., Levy, R., Li, M.J., McClelland,  
612 E., Palmieri, A., Raymond, C., Rouse, G., Saenphimma-  
613 chak, C., Wu, Z., Romero, P., Gordon, D., Zhang, S., Yoo, H.,  
614 Tao, Y., Biddle, P., Jung, M., Krespan, W., Perry, M., Gordon-  
615 Kamm, B., Liao, L., Kim, S., Hendrick, C., Zhao, Z.Y., Dolan,  
616 M., Chumley, F., Tingey, S.V., Tomb, J.F., Gordon, M.P., Olson,  
617 M.V. and Nester, E.W. (2001) The genome of the natural genetic  
618 engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. Science 294, 2317–2323.
- 619 [11] Sullivan, J., Brown, S., Yocum, R. and Ronson, C. (2001) The *bio*  
620 operon of the acquired symbiosis island of *Mesorhizobium* sp.  
621 strain R7A includes a novel gene involved in pimeloyl-CoA  
622 synthesis. Microbiol. 147, 1315–1322.
- 623 [12] Entcheva, P., Phillips, D. and Streit, W. (2002) Functional  
624 analysis of *Sinorhizobium mellotii* genes involved in biotin  
625 synthesis and transport. Appl. Environ. Microbiol. 68, 2843–  
626 2848.
- 627 [13] Streit, W.R., Joseph, C.M. and Phillips, D.A. (1996) Biotin and  
628 other water-soluble vitamins are key growth factors for alfalfa  
629 root colonization by *Rhizobium mellotii* 1021. Mol. Plant-Microbe  
630 Interact. 9, 330–338.
- 631 [14] Rodionov, D.A., Mironov, A. and Gelfand, M. (2002) Conserva-  
632 tion of the biotin regulon and the BirA regulatory signal in  
633 Eubacteria and Archaea. Genome Res. 12, 1507–1516.
- 634 [15] Gloeckler, R., Ohsawa, I., Speck, D., Ledoux, C., Bernard, S.,  
635 Zinsius, M., Villeval, D., Kisou, T., Kamogawa, K. and Lemoine,  
636 Y. (1990) Cloning and characterization of the *Bacillus sphaericus*  
637 genes controlling the bioconversion of pimelate into deshydrobiotin.  
638 Gene 87, 63–70.
- 639 [16] Encarnación, S., Dunn, M., Willms, K. and Mora, J. (1995)  
640 Fermentative and aerobic metabolism in *Rhizobium etli*. J.  
641 Bacteriol. 177, 3058–3066.
- 642 [17] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular  
643 Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor  
644 Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- 645 [18] Dunn, M.F., Encarnación, S., Araiza, G., Vargas, M.C., Dávalos,  
646 A., Peralta, H., Mora, Y. and Mora, J. (1996) Pyruvate  
647 carboxylase from *Rhizobium etli*: mutant characterization, nucle-  
648 otide sequence, and physiological role. J. Bacteriol. 178, 5960–  
649 5970.
- 650 [19] Dunn, M.F., Araiza, G. and Finan, T.M. (2001) Cloning and  
651 characterization of the pyruvate carboxylase from *Sinorhizobium*  
652 *mellotii* Rm1021. Arch. Microbiol. 176, 355–363.
- 653 [20] Wilson, K.J., Jefferson, R.A. and Hughes, S.G. (1992) The  
654 *Escherichia coli* *gus* operon: introduction and expression of the  
655 *gus* operon in *E. coli* and the occurrence and use of GUS in other  
656 bacteria. In: GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter  
657 of Gene Expression (Gallagher, S.R., Ed.), pp. 7–22. Academic  
658 Press, San Diego, CA.
- 659 [21] Brom, S., Garcia-de los Santos, A., Cervantes, L., Palacios, R.  
660 and Romero, D. (2000) In *Rhizobium etli* symbiotic plasmid  
661 transfer, nodulation competitiveness and cellular growth require  
662 interaction among different replicons. Plasmid 44, 34–43.
- 663 [22] Bray, G.A. (1960) A simple efficient liquid scintillator for  
664 counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. Anal.  
665 Biochem. 1, 279–285.
- 666 [23] Cronan Jr., J.E. (1988) Expression of the biotin biosynthetic  
667 operon of *Escherichia coli* is regulated by the rate of protein  
668 biotinylation. J. Biol. Chem. 263, 10332–10336.
- 669 [24] Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Meyers, E.W. and Lipman,  
670 D.J. (1990) Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215,  
671 403–410.
- 672 [25] Corpet, F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical  
673 clustering. Nucleic Acids Res. 16, 10881–10890.
- 674 [26] Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. and von Heijne, G. (1997)  
675 Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and  
676 prediction of their cleavage sites. Prot. Eng. 10, 1–6.
- 677 [27] Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. and Sonnhammer, E.L.  
678 (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden  
679 Markov model: application to complete genomes. J. Mol. Biol.  
680 305, 567–580.
- 681 [28] Pflüeteau, A. and Gaudry, M. (1985) Biotin uptake: influx, efflux  
682 and countertransport in *Escherichia coli* K12. Biochim. Biophys.  
683 Acta 816, 77–82.
- 684 [29] Schneider, E. and Walter, C. (1991) A chimeric nucleotide-  
685 binding protein, encoded by a *hisP-malK* hybrid gene, is  
686 functional in maltose transport in *Salmonella typhimurium*. Mol.  
687 Microbiol. 5, 1375–1383.
- 688 [30] Hekstra, D. and Tommassen, J. (1993) Functional exchangeability  
689 of the ABC proteins of the periplasmic binding protein-  
690 dependent transport systems Ugp and Mal of *Escherichia coli*. J.  
691 Bacteriol. 175, 6546–6552.
- 692 [31] Driessen, A.J.M., Rosen, B.P. and Konings, W.N. (2000) Diversity  
693 of transport mechanisms: common structural principles. TIBS  
694 25, 397–401.
- 695 [32] Tomii, K. and Kanehisa, M. (1998) A comparative analysis of  
696 ABC transporters in complete microbial genomes. Genome Res.  
697 8, 1048–1059.
- 698 [33] Noel, K.D., Sánchez, A., Fernández, L., Leemans, J. and  
699 Cevallos, M.A. (1984) *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants  
700 with transposon Tn5 insertions. J. Bacteriol. 158, 148–155.
- 701 [34] Meade, H.M., Long, S.R., Ruvkun, G.B., Brown, S.E. and  
702 Ausubel, F.M. (1982) Physical and genetic characterization of  
703 symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium mellotii* induced  
704 by transposon Tn5 mutagenesis. J. Bacteriol. 149, 114–122.
- 705 [35] Simon, R. (1984) High frequency mobilization of gram-negative  
706 bacterial replicons by the in vitro constructed Tn5-mob transposon.  
707 Mol. Gen. Genet. 196, 413–420.
- 708 [36] Huerta-Zepeda, A., Ortuño, L., Du Pont, G., Durán, S., Lloret,  
709 A., Merchant-Larios, H. and Calderón, J. (1997) Isolation and  
710 characterization of *Rhizobium etli* mutants altered in degradation  
711 of asparagine. J. Bacteriol. 179, 2068–2072.
- 712 [37] Marsh, J.L., Erfle, M. and Wykes, E.J. (1984) The pIC plasmid  
713 and phage vectors with versatile cloning sites for recombinant  
714 selection by insertional inactivation. Gene 32, 481–485.
- 715 [38] Figurski, D.H. and Helinski, D.R. (1979) Replication of an  
716 origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a



- 717 plasmid function provided in trans. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 729  
718 76, 1648–1652. 730
- 719 [39] Kokotek, W. and Lotz, W. (1991) Construction of a mobilizable 731  
720 cloning vector for site-directed mutagenesis of Gram-negative 732  
721 bacteria: application to *Rhizobium leguminosarum*. Gene 98, 7–13. 733
- 722 [40] Alexeyev, M.F., Shokolenko, I. and Croughan, T. (1995) 734  
723 Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements 735  
724 for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/ 736  
725 insertion mutagenesis. Gene 160, 63–67. 737
- 726 [41] Morales, V.M., Backman, A. and Bagdasarian, M. (1991) A series 738  
727 of wide-host-range low-copy-number vectors that allow direct 739  
728 screening for recombinants. Gene 97, 39–47. 740  
741
- [42] Kovach, M.E., Elzer, P., Hill, S., Robertson, G., Farris, M., 729  
Roop, M. and Peterson, K. (1995) Four new derivatives of the 730  
broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different 731  
antibiotic-resistance cassettes. Gene 166, 175–176. 732
- [43] Girard, L., Brom, S., Dávalos, A., López, O., Soberón, M. and 733  
Romero, D. (2000) Differential regulation of *fixN*-reiterated genes 734  
in *Rhizobium etli* by a novel *fixL*–*fixK* cascade. Mol. Plant- 735  
Microbe Interact. 13, 1283–1292. 736
- [44] Metcalf, W.W. and Wanner, B.L. (1993) Construction of new  $\beta$ - 737  
glucuronidase cassettes for making transcriptional fusions and 738  
their use with new methods for allele replacement. Gene 129, 17– 739  
25. 740  
741

UNCORRECTED PROOF

### 3. RESULTADOS ADICIONALES

#### 3.1 Búsqueda de *bioB* por PCR e hibridación

Las condiciones empleadas para la amplificación por PCR y los experimentos de hibridación de los resultados adicionales son las que se mencionan en la sección de métodos del artículo Guillén-Navarro *et al.*, 2005b, salvo por las temperaturas y tiempos de fusión y extensión de los PCRs que dependieron de las características de los oligonucleótidos y el tamaño de los productos esperados.

Como una estrategia para localizar *bioB* en *R. etli* CE3, se diseñaron oligonucleótidos a partir de secuencias conservadas internas a *bioB* de organismos Gram negativos, para tratar de amplificar por PCR algún homólogo de este gen. Para ello, inicialmente se utilizó la secuencia de los *bioB* pertenecientes a *E. coli*, *E. herbicola*, *S. marcesens* y *Methylobacillus flagelatus*, y posteriormente las secuencias de *M. loti* y *A. tumefaciens*. El PCR de estos oligonucleótidos usando como templado ADN genómico de *R. etli* CE3 no amplificó ningún producto. Por otra parte, se hizo un PCR con ADN genómico de *A. tumefaciens*, con el que se amplificó un fragmento del tamaño esperado (alrededor de 700 pb), demostrando que los oligonucleótidos si eran adecuados. Este producto se purificó por medio de minicolumnas Wizard (Promega) y se utilizó como sonda en la búsqueda de *bioB* tanto en ADN genómico como en el banco de cósmidos de *R. etli* (construido en pLAFR1, con fragmentos de la digestión parcial con *EcoRI* del genoma de *R. etli* CFN42; Huerta-Zepeda *et al.*, 1997) a través de hibridaciones tipo Southern, en condiciones de alta y baja severidad (62 y 42 °C). En ninguno de los experimentos se observó alguna señal que sugiriera la presencia de *bioB* en este organismo. Los resultados de las hibridaciones fueron confirmados al hacer una búsqueda de *bioB* en el genoma de *R. etli*, recientemente secuenciado en el Centro de Ciencias Genómicas (antes CIFN, UNAM). Esta secuencia se completó cuando la mayoría de los resultados presentados en este trabajo ya habían sido concluidos.

### 3.2 Búsqueda de genes *bio* por mutagénesis al azar

Adicionalmente a los experimentos descritos y con el fin de localizar a alguno de los genes involucrados en la biosíntesis de biotina se realizó la búsqueda de auxótrofos de esta vitamina por mutagénesis al azar con el trasposón miniTn5-LacZ1 (mTn5) (de Lorenzo *et al.*, 1990). Se sembraron 6500 colonias en MM sólido con succinato 10 mM y MM-succinato enriquecido con una concentración final de  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  de biotina.

Se seleccionaron aquellas colonias que presentaron un crecimiento pobre en ausencia de biotina y que crecieron normalmente en el medio suministrado con biotina y que tenían el marcador de la inserción de mTn5. Para confirmar si estas colonias presentaban un fenotipo de auxotrofia por biotina, se evaluó el crecimiento de estas colonias en medio líquido: MM-piruvato 10 mM suplementado con  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  de biotina y MM-piruvato sin biotina, con  $0.6 \text{ U l}^{-1}$  de avidina, que atrapa a la biotina libre en el medio e impide su uso. En estos experimentos se empleó un medio con piruvato como fuente de carbono, pues *R. etli* depende más de biotina para metabolizar piruvato (por medio de la piruvato carboxilasa), que en el caso de succinato. Además se hicieron ensayos de cultivos en caja con MM-piruvato con biotina y MM-piruvato con  $0.15 \text{ U l}^{-1}$  de avidina. No se logró aislar alguna mutante que presentara un fenotipo claro de auxotrofia de biotina.

### 3.3 Búsqueda de genes *bio* por complementación de mutantes

Una alternativa más que se llevó a cabo en la búsqueda de los genes *bio* en *R. etli*, fue el intento de complementar mutantes que tuvieran interrumpido alguno de los genes *bio*. Además del intento fallido de la complementación de mutantes de *E. coli* hecho previamente (Dunn, M. y Araíza, G., resultados no publicados), se trató de complementar las mutantes *bioA*<sup>-</sup> (Tn5-5) y *bioZ*<sup>-</sup> (Tn5-27) de *M. loti* R7A (Sullivan *et al.*, 2001), con el banco de cósmidos de *R. etli* ya mencionado. En estas mutantes el fenotipo de auxotrofia de biotina era débil, es

decir, que su crecimiento solo se diferenciaba ligeramente del de la silvestre, aunque con avidina la diferencia era más evidente; debido a esto, se evaluó su crecimiento en MM-piruvato (10 mM) con un gradiente de avidina: 0.05, 0.3, 0.6 y 1.2 U l<sup>-1</sup>. Se determinó que 0.6 U l<sup>-1</sup> de avidina era la concentración óptima para distinguir el fenotipo al comparar con la cepa silvestre (R7A) y por lo tanto se utilizó esta concentración para los ensayos de complementación.

Se encontró que a la mutante *bioA*<sup>-</sup> la complementaron dos de los cósmidos del banco de *R. etli*, que compartían dos bandas cuando fueron digeridos con *EcoRI*. A *bioZ*<sup>-</sup> la complementaron tres cósmidos más del banco, que no compartieron bandas con los que complementaron a *bioA*<sup>-</sup>, pero que compartían tres bandas entre sí. Estos resultados sugirieron la presencia de ambos genes en *R. etli* CE3.

La búsqueda hecha en la secuencia del genoma total de *R. etli*, indicó la presencia de un marco abierto de lectura (*orf*) en el plásmido p42f, con 69 y 65% de identidad con respecto a *bioA* de *A. tumefaciens* y *B. japonicum*, respectivamente, lo cual confirmó la presencia de *bioA* en *R. etli* CE3. Además se encontró otro *orf* en cromosoma, con baja similitud (24%) a *bioZ* de *M. loti*. En *S. meliloti*, a pesar de que tampoco tiene homólogos de los genes clásicos de síntesis de biotina, también tiene un homólogo de *bioA* que no complementa a la mutante *bioA* de *E. coli*, aún utilizando distintos promotores y un homólogo de *bioZ* (Entcheva *et al.*, 2002). Otros rhizobia como *B. japonicum* y *M. loti* tienen un *bioA* reiterado, mientras que *A. tumefaciens* tiene dos, adicionales al que presentan en el operón *bio*, los cuales están ubicados en *loci* diferentes (Guillén-Navarro *et al.*, 2005a).

### **3.4 Expresión de la fusión GUS con el promotor del *orf1***

En el artículo publicado, derivado de este proyecto (Guillén-Navarro *et al.*, 2005b) se presentan los resultados de la expresión de la fusión de la región promotora de *bioM* (*p<sub>bioM</sub>*) con *gusA* analizados en la clona CE3pM2. Con el fin de determinar si el *orf* (*orf1*) que se localiza en la posición opuesta al operón

*bioMNY* se transcribe (ver Fig. 1 de Guillén-Navarro *et al.*, 2005b), y si lo hace en las mismas condiciones que *pbioM::gusA*, se analizó la construcción que contiene el mismo promotor, pero en orientación inversa.

El fragmento *EcoRI-SmaI* de 1.4 kb derivado de pKG1 y que contiene a *pbioM*, se clonó en pBCSK (pKG1a, ver Guillén-Navarro *et al.*, 2005b). Este fragmento se clonó en el sitio *SpeI-ClaI* del plásmido pBBMCS53 (Girard *et al.*, 2000) que contiene el gen reportero *gusA*. De esta manera se obtuvo la construcción de la orientación invertida de *pbioM* con la fusión *gusA*, que se designó como pKG3. La orientación de este promotor en pKG3 se confirmó por medio del patrón de restricción. Se obtuvieron las transformantes de *R. etli* CE3 con pKG3, para dar lugar a la cepa CE3pM1.

Se analizó la expresión de la fusión GUS en CE3pM1 en las mismas condiciones de crecimiento que para CE3pM2 (ver Guillén-Navarro *et al.*, 2005b): el experimento se hizo con células del segundo subcultivo en MM y MM con biotina, detiobiotina o tiamina; se tomaron muestras a las 8, 12, 24 y 48 h de crecimiento. En todos los ensayos se determinó la actividad GUS en el control CE3pG, con el vector pBBMCS53, que fue menor a  $0.5 \text{ nmol PNP min}^{-1} \text{ D.O.}_{.540}^{-1}$  (Guillén-Navarro *et al.*, 2005b). No se observó alguna diferencia significativa de la expresión entre CE3pM1 y CE3pM2 (Tabla 1). Esto implica que el *orf1* se expresa en las mismas condiciones que el operón *bioMNY* y por lo tanto sugiere que debe tener algún papel en el metabolismo de biotina. Al igual que en la construcción de CE3pM2 (que contiene *pbioM*), la expresión en CE3pM1 (con pKG3) fue reprimida en presencia de biotina a niveles similares.

Tabla 1. Expresión de la fusión del promotor del *orf1::gusA* (CE3pM1) y de *pbioM::gusA* (CE3pM2). Las células provienen del segundo subcultivo en MM y MM con biotina, detiobiotina o tiamina, a diferentes tiempos de crecimiento. Promedio  $\pm$  desviación estándar de dos experimentos independientes, cada uno con ensayos por duplicado de cultivos por duplicado.

	Actividad GUS (nmol PNP min <sup>-1</sup> D.O. <sub>.540</sub> <sup>-1</sup> )			
	8 h	12 h	24 h	48 h
<b>MM</b>				
CE3pM1	6.82 $\pm$ 0.57	9.14 $\pm$ 1.72	11.67 $\pm$ 1.95	9.32 $\pm$ 2.77
CE3pM2	6.37 $\pm$ 1.21	8.05 $\pm$ 1.61	10.45 $\pm$ 0.23	8.51 $\pm$ 1.64
<b>MM biotina</b>				
CE3pM1	4.14 $\pm$ 0.16	4.09 $\pm$ 0.22	2.82 $\pm$ 1.42	2.35 $\pm$ 0.23
CE3pM2	3.33 $\pm$ 1.31	3.12 $\pm$ 1.18	3.15 $\pm$ 0.03	1.73 $\pm$ 0.52
<b>MM detiobiotina</b>				
CE3pM1	5.73 $\pm$ 0.73	5.25 $\pm$ 1.18	3.7 $\pm$ 0.4	3.03 $\pm$ 0.11
CE3pM2	5.06 $\pm$ 0.22	4.43 $\pm$ 1.52	3.81 $\pm$ 0.6	2.83 $\pm$ 0.13
<b>MM tiamina</b>				
CE3pM1	6.38 $\pm$ 1.09	6.0 $\pm$ 2.1	4.45 $\pm$ 2.8	3.13 $\pm$ 1.3
CE3pM2	5.79 $\pm$ 0.25	5.38 $\pm$ 1.23	5.01 $\pm$ 1.53	3.77 $\pm$ 1.3

### 3.5 Identificación de BPL en *R. etli* CE3

Paralelamente a la búsqueda de los genes *bio* en *R. etli*, se hizo también la búsqueda del gen que codifica al homólogo de la BPL empleando técnicas de hibridación y PCR. Como se mencionó anteriormente, la BPL es la holo-carboxilasa sintasa encargada de llevar a cabo la biotilación de las carboxilasas y en algunos organismos también regula la transcripción de genes de síntesis de biotina (para más información ver la sección 3 de la revisión Guillén-Navarro *et al.*, 2005a).

Con este objetivo se diseñaron oligonucleótidos a partir de secuencias internas conservadas de los genes que codifican a las BPL, por un lado de *S. meliloti*, *Paracoccus denitrificans* y *Rhodobacter capsulatus* y por otro lado de *M. loti* y *A. tumefaciens*. Con estos oligonucleótidos se amplificaron por PCR, (usando como templado ADN genómico de *R. etli* CE3), productos del tamaño

esperado: aproximadamente de 280 pb en el primer caso, y de 475 pb en el último.

Por otra parte se hicieron ensayos de hibridación en los que se usó como sonda un producto de PCR de *S. meliloti* 1021, de 850 pb que contenía completo al gen que codifica a la BPL, que es de 750 pb y otro de *A. tumefaciens*, de 720 pb, de la región interna. Las respectivas hibridaciones se hicieron en condiciones de alta severidad (62 °C) contra el ADN genómico de *R. etli* CE3 digerido con *EcoRI*. En ambos casos se observaron señales de aproximadamente 5 kb.

Estos datos sugieren la presencia de un gen que codifica a un homólogo de BPL en *R. etli* CE3 similar al de otras rizobiáceas de las que ya se tiene secuenciado el genoma (*S. meliloti*, *A. tumefaciens*, *M. loti*, *B. japonicum*). El análisis de la secuencia total del genoma de *R. etli*, confirma la presencia de un homólogo de BPL con 70 y 68% de identidad con respecto al BPL de *A. tumefaciens* y *S. meliloti*, respectivamente. Este carece de la región N-terminal característica de los BirA, por lo que probablemente no tiene función regulatoria, como el caso de las presentes en las otras rizobiáceas (Guillén-Navarro *et al.*, 2005a).

### **3.6 Ensayos de utilización de biotina *in vivo***

Para comparar la capacidad de usar biotina de la cepa silvestre con respecto a la mutante CE3M, se analizó la presencia de proteínas biotiniladas por medio de Western-blot. El ensayo se hizo con células del segundo subcultivo, cultivadas por 24 horas en MM-succinato (10mM). Las células fueron lavadas dos veces con buffer Tris-HCl (20 mM, pH 7) y 100 µg ml<sup>-1</sup> de cloranfenicol, y luego fueron resuspendidas en el mismo buffer a una D.O.<sub>540</sub> de aproximadamente 2.0. Se tomó una muestra de 10.8 ml de esta suspensión y se le agregó 1.2 ml de biotina o detiobiotina (para una concentración final de 0.1 µg ml<sup>-1</sup>), o el mismo buffer como control. Se tomaron muestras de 1 ml por duplicado, al tiempo 0, 10, 30 y 60 min. Se centrifugaron 1 min a máxima velocidad, se desechó el sobrenadante e inmediatamente se colocaron en N<sub>2</sub>

líquido, para posteriormente guardar las muestras a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , hasta que fueran procesadas. Se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976), para cargar la misma cantidad de cada muestra en geles de 10% de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio, para la separación de proteínas. Los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa por medio de un electroblotter Millipore Milliblot Graphyte tipo II, de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Las proteínas biotiniladas fueron detectadas con estreptoavidina-HRP como se describe en Dunn *et al.*, 1996. La figura 4 es representativa de todos los resultados.

En los ensayos se observa que la proteína biotinilada predominante es de aproximadamente 120 kDa que corresponde a PYC. No se logran detectar las bandas que corresponden a las proteínas de PCC (de aproximadamente 51 kDa) y otra de 14 kDa (que parece corresponder a la subunidad BCCP –‘biotin carboxyl carrier protein’ - de ACC), a excepción del ensayo con biotina a los 60 min. Este patrón se presenta comúnmente en el extracto proteico de *R. etli* (Dunn *et al.*, 1996, 2002).

Se advierte que la cantidad de proteínas biotiniladas se intensifica con el tiempo, a partir de la adición de biotina o detiobiotina (Fig. 4); lo que indica que las células tienen la capacidad de convertir la detiobiotina en biotina, con la que puede biotinar a las proteínas. Esta sugerencia se refuerza con el hecho de que con detiobiotina las células de CE3M (Fig. 4) y de la cepa silvestre tienen una cantidad de proteínas biotiniladas ligeramente mayor que las del control (con buffer). No se percibe una diferencia clara, en las tres condiciones, entre la intensidad de proteínas biotiniladas de la cepa CE3M comparados con la cepa silvestre.

Los resultados de éste experimento demuestran que la interrupción del operón *bioMNY* en *R. etli* CE3M no afecta la reacción holo-carboxilasa sintasa del homólogo de BPL. Por lo que se sugiere que tanto en CE3 como en la mutante CE3M se está llevando a cabo la biotinilación de las carboxilasas. De esta manera, es muy probable que el homólogo de BPL detectado en *R. etli*, sea



el que lleve a cabo ésta función, sin embargo, habría que hacer una mutante para confirmarlo.

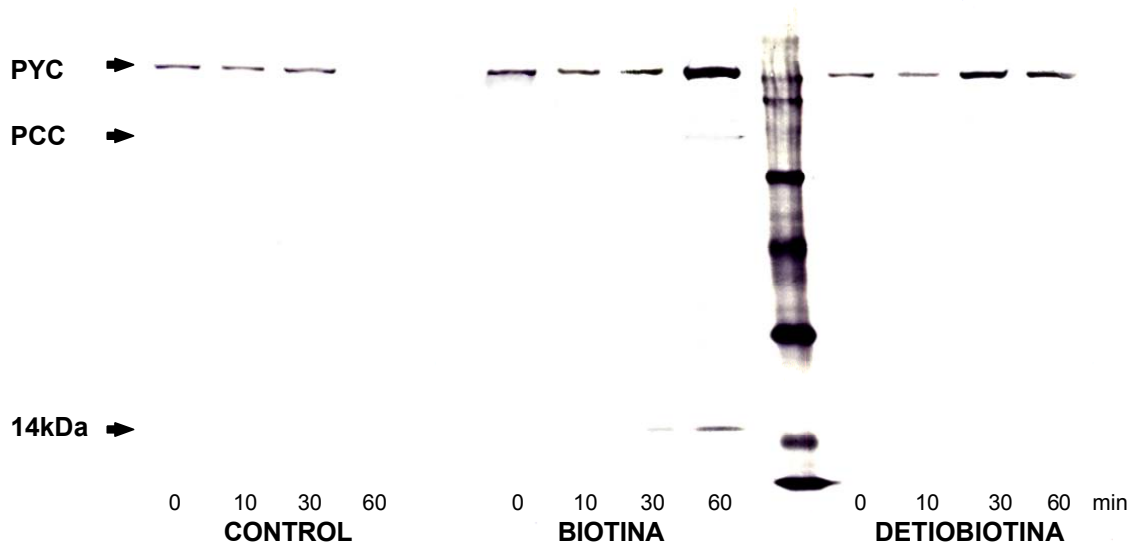


Figura 4. Biotinilación *in vivo* de células de 24 h, del segundo subcultivo de CE3M. Ensayo con pulsos de biotina, detiobiotina ( $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) o con buffer Tris-HCl (20 mM, pH 7), usado como control. Los carriles fueron cargadas con  $9 \mu\text{g}$  de proteína total.

### 3.7 Búsqueda de genes *bio* en otros microorganismos

Para conocer la distribución de los genes *bio* en los microorganismos, se hizo una búsqueda de la presencia de homólogos de los genes clásicos (*bioB*, *bioD*, *bioF* y *bioA*) y de *bioM*, *bioN* y *bioY* en 159 genomas de organismos secuenciados; de los cuales 37 estaban incompletos al momento del análisis. Esto se realizó utilizando las bases de datos GenBank y KEGG (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/MICROBES/Complete.html> y <http://www.genome.ad.jp/kegg/kegg2.html>, respectivamente), además se tomaron en cuenta datos del artículo de Rodionov *et al.* (2002). Los resultados se muestran en la Tabla 2, donde se ve que el 28% de los organismos secuenciados totalmente, codifican solo *bioY* o este y uno o dos de los genes de

la vía clásica (*bioB*, *bioD*, *bioF* o *bioA*). De este grupo casi 56 % corresponde a los que solo presentan a *bioY*. Por otra parte, el 39 % de los genomas completos que codifican *bioB*, *bioD*, *bioF* y *bioA*, no tienen algún homólogo de *bioY*. De esta manera, el 67 % de los genomas totalmente secuenciados analizados aquí, son “excluyentes” de *bioY* contra *bioB*, *bioD*, *bioF* y *bioA*.

Por otra parte, el 18 % del total de genomas analizados (completos e incompletos) presentan los cuatro genes clásicos *bioF*, *A*, *D* y *B* además de *bioY*. Esto podría sugerir que estos organismos, además de que cuentan con el transportador BioY, posiblemente llevan a cabo la síntesis de biotina, lo cual podría conferirles cierta ventaja frente a otros organismos competidores. Como podría ser el caso de *A. tumefaciens* o *M. loti* (ver Tabla 2) al colonizar a su hospedero.

Por otro lado, también se hizo una búsqueda de homólogos de *bioM* y *bioN*, que a diferencia de *bioY* se encuentran poco distribuidos (Rodionov *et al.*, 2002). En este análisis solo el 14 % de los genomas totalmente secuenciados los presentan. Resulta interesante observar que, con muy pocas excepciones, aquellos genomas en donde se encuentra algún homólogo de *bioM* y/o *bioN*, también presentan un homólogo de *bioY* (Tabla 2). Sin embargo no se hizo un análisis para determinar la ubicación relativa entre estos homólogos, es decir, si están en un operón o por lo menos cercanos entre si.

Es importante observar que en arqueas predomina la presencia de *bioY* sobre los genes clásicos de la biosíntesis de biotina. En estos organismos la biotina no es una vitamina indispensable para la síntesis de membrana pues está mayormente compuesta por isoprenoides y no por ácidos grasos como en las bacterias (Itoh *et al.*, 2001). Como se sabe, la primera etapa para la síntesis de ácidos grasos es efectuada por acetil CoA-carboxilasa, que depende de biotina para su actividad. A pesar de ello, la biotina es también esencial en estos organismos pues participa en otras funciones importantes (Menéndez *et al.*, 1999). El hecho de que en la mayoría de los organismos analizados, se encuentra *bioY* y no los genes de síntesis de biotina, indica que la obtienen principalmente de fuentes exógenas.

Tabla 2. Distribución de genes *bio* en eubacteria y arquea.

Genoma	<i>bioM</i>	<i>bioN</i>	<i>bioY</i>	<i>bioB</i>	<i>bioD</i>	<i>bioF</i>	<i>bioA</i>
<b>Alfa-Proteobacteria</b>							
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>			+	+	+	+	+
<i>Brucella melitensis</i>			+	+	+	+	+
<i>Brucella suis</i>			+	+	+	+	+
<i>Caulobacter crescentus</i>	*			+	+	+	+
<i>Novosphingobium aromaticivorans</i> #	?	?	?	+	+	?	+
<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> #	?	?	?	+	+	+	+
<i>Mesorhizobium loti</i>			+	+	+	+	+
<i>Rhizobium etli</i>	*	+	+				+
<i>Rhodobacter capsulatus</i>			+	+	+	+	+
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	~+	~+	+	+		+	+
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>			+	+	+	+	+
<i>Rhodospirillum rubrum</i> #	+	+	+	?	?	?	+
<i>Rickettsia conorii</i>	*		+				
<i>Rickettsia prowazekii</i>	*		+				
<i>Rickettsia sibirica</i> #	?	?	+	?	?	?	?
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	*	+	+			~+	+
<b>Beta-Proteobacteria</b>							
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bordetella parapertussis</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bordetella pertussis</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Burkholderia fungorum</i> #	?	?	?	+	+	+	+
<i>Burkholderia pseudomallei</i> #	?	?	?	+	+	+	+
<i>Chromobacterium violaceum</i>	*			+	+	+	+
<i>Nitrosomonas europea</i>	*			+	+	+	+
<i>Neisseria meningitidis</i>	*			+	+	+	+
<i>Methylobacillus flagelatus</i> #	?	?	?	+	+	+	+
<i>Ralstonia solanacearum</i>	*			+	+	+	+
<i>Ralstonia eutropha</i> #	?	?	?	+	+	+	+

# Secuencia incompleta.

? Se desconoce si tiene algún homólogo en el resto del genoma.

+ Homólogo presente en el genoma.

~+ Existe un homólogo, pero con bajo porcentaje de identidad (entre 24-30%).

\* Presenta exclusión de *bioY* con respecto a la vía clásica (incompleta con uno, dos o ninguno de los genes clásicos *bioF*, *bioA*, *bioD* o *bioB*).

...( Tabla 2, continuación)

Genoma		<i>bioM</i>	<i>bioN</i>	<i>bioY</i>	<i>bioB</i>	<i>bioD</i>	<i>bioF</i>	<i>bioA</i>
<b>Gamma-Proteobacteria</b>								
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> #	*	?	?	?	+	+	+	+
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> #		?	?	?	?	+	?	?
<i>Azotobacter vinelandii</i> #		?	?	?	+	+	+	+
<i>Buchnera</i> sp.	*				+	+		+
<i>Buchnera aphidicola</i>	*				+	+	+	+
<i>Coxiella burnetii</i>	*				+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	*				+	+	+	+
<i>Francisella tularensis</i> #		?	?	?	+	+	+	+
<i>Haemophilus ducreyi</i>	*				+	+	+	+
<i>Haemophilus influenzae</i>	*				+	+	+	+
<i>Haemophilus somnus</i> #		?	?	?	+	?	?	?
<i>Klebsiella pneumoniae</i> #		?	?	?	+	+	+	+
<i>Legionella pneumophila</i> #		?	?	?	+	+	+	+
<i>Microbulbifer degradans</i> #		?	?	?	+	+	+	+
<i>Pasteurella multocida</i>	*				+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	*				+	+	+	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	*				+	+	+	+
<i>Pseudomonas putida</i>	*				+	+	+	+
<i>Pseudomonas syringae</i>	*				+	+	+	+
<i>Salmonella enterica</i>	*				+	+	+	+
<i>Salmonella typhi</i>	*				+	+	+	+
<i>Salmonella typhimurium</i>	*	+			+	+	+	+
<i>Salmonella tify</i>	*				+	+	+	+
<i>Shewanella oneidensis</i>	*				+	+	+	+
<i>Shewanella putrefaciens</i>	*				+	+	+	+
<i>Shigella flexneri</i>	*				+	+	+	+
<i>Thermochromatium tepidum</i> #		?	?	?	+	?	+	+
<i>Vibrio cholerae</i>	*				+	+	+	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	*				+	+	+	+
<i>Vibrio vulnificus</i>	*				+	+	+	+
<i>Wigglesworthia glossinidia</i>	*				+	+	+	+
<i>Wigglesworthia brevipalpis</i>	*				+	+	+	+
<i>Xantomonas axonopodis</i>	*				+	+	+	+
<i>Xantomonas campestris</i>	*				+	+	+	+
<i>Xilella fastidiosa</i>	*				+	+	+	+
<i>Yersinia pestis</i>	*				+	+	+	+
<b>Delta/Epsilon-Prot.</b>								
<i>Campylobacter jejuni</i>	*				+	+	+	+
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> #		?	?	+	+	+	?	+

...( Tabla 2, continuación)

Genoma	<i>bioM</i>	<i>bioN</i>	<i>bioY</i>	<i>bioB</i>	<i>bioD</i>	<i>bioF</i>	<i>bioA</i>
<i>Helicobacter hepaticus</i>	*			+	+	+	+
<i>Helicobacter pylori</i>	*			+	+	+	+
<i>Geobacter metallireducens</i> #		+	?	?	+	+	+
<i>Ralstonia metallidurans</i> #		?	?	?	+	+	+
<i>Wolinella succinogenes</i>	*			+	+	+	+
<b>Bacilli</b>							
<i>Bacillus anthracis</i>		+	+	+	+	~+	+
<i>Bacillus cereus</i>		+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	*	+	~+		+	+	+
<i>Bacillus sphaericus</i>				+	+	+	+
<i>Bacillus halodurans</i>		+	~+	+	+	+	+
<i>Bacillus stearothermophilus</i>				+	+	+	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	*	+	+	+			
<i>Enterococcus faecium</i> #		?	+	?	?	+	?
<i>Kurthia sp.</i> #		?	?	+	+	+	+
<i>Lactococcus lactis</i>	*		~+	+			
<i>Lactobacillus plantarum</i>	*	+	+	+			
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> #		+	+	+	?	+	?
<i>Listeria innocua</i>	*	+	+	+			
<i>Listeria monocytogenes</i>	*	~+	+	+			
<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	*	~+	~+	+		+	+
<i>Oenococcus oeni</i> #		+	+	+	?	?	?
<i>Staphylococcus aureus</i>			~+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>			~+	+	+	+	+
<i>Streptococcus agalactiae</i>	*		~+	+	+		
<i>Streptococcus equi</i> #		?	?	+	?	?	?
<i>Streptococcus mutans</i>	*		~+	+			
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	*	+	~+	+			
<i>Streptococcus pyogenes</i>	*		~+	+			
<b>Clostridia</b>							
<i>Clostridium acetobutylicum</i>		+	~+	+	+		+
<i>Clostridium botulinum</i> #		?	?	+	+	?	?
<i>Clostridium difficile</i> #		?	?	+	+	?	?
<i>Clostridium perfringens</i>	*	~+	~+	+	+		
<i>Clostridium tetani</i>	*	~+	+	+	+		
<i>Heliobacillus mobilis</i> #		?	?	+	?	?	+
<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>	*	+	+	+	+	+	

...( Tabla 2, continuación)

Genoma		<i>bioM</i>	<i>bioN</i>	<i>bioY</i>	<i>bioB</i>	<i>bioD</i>	<i>bioF</i>	<i>bioA</i>
<b>Actinobacteriae</b>								
<i>Bifidobacterium longum</i>	*	+		+				
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> #		+	?	+	+	+	+	+
<i>Corynebacterium efficiens</i>		+		+	+	+		+
<i>Corynebacterium glutamicum</i>		+		~+	+	+	+	+
<i>Mycobacterium bovis</i>	*				+	+	+	+
<i>Mycobacterium leprae</i>	*				+	+	+	+
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	*				+	+	+	+
<i>Streptomyces avermitilis</i>				+	+	+	+	+
<i>Streptomyces coelicolor</i>		+		+	+	+	+	+
<i>Thermomonospora fusca</i> #		?	?	+	?	?	?	+
<i>Tropheryma whipplei</i>	*	+		+				
<b>CFB/Green sulfur bacteria</b>								
<i>Bacteroides fragilis</i> #		?	?	?	?	+	+	+
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	*				+	+	+	+
<i>Chlorobium tepidum</i>	*				+	+	+	+
<i>Cytophaga hutchinsonii</i> #		?	?	?	+	+	+	+
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	*				+	+	+	+
<b>Cianobacteria</b>								
<i>Gloeobacter violaceus</i>							+	
<i>Nostoc sp.</i>				+	+	+	+	+
<i>Prochlorococcus marinus</i>				+	+	+	+	+
<i>Synechococcus sp.</i>				+	+	+	+	+
<i>Synechocystis sp.</i>				+	+	+	+	+
<i>Thermosynechococcus elongatus</i>				+	+	+	+	+
<i>Trichodesmium erythraeum</i> #		~+	?	+	?	?	+	?
<b>Clamydiae</b>								
<i>Chlamydia muridarum</i>	*			+			+	
<i>Chlamydia trachomatis</i>	*			+			+	~+
<i>Chlamydophila caviae</i>	*			+			+	
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	*				+	+	+	+
<b>Otros</b>								
<i>Aquifex aeolicus</i>	*				+	+	+	+
<i>Chloroflexus aurantiacus</i> #		?	?	+	?	?	?	?
<i>Deinococcus radiodurans</i>	*	+	+	+			+	

...( Tabla 2, continuación)

Genoma	<i>bioM</i>	<i>bioN</i>	<i>bioY</i>	<i>bioB</i>	<i>bioD</i>	<i>bioF</i>	<i>bioA</i>
	+	+	+	+	+	+	+
<i>Fusobacterium nucleatum</i>							
<i>Magnetococcus</i> sp. #	?	?	?	+	+	+	+
<i>Pirellula</i> sp.	*			+	+	+	+
<i>Rhodopirellula baltica</i>	*			+	+	+	+
<i>Thermotoga maritima</i>	*		+	+			
<i>Thermus thermophilus</i> #	*	?	?	+	+		
<b>Spirochaetales</b>							
<i>Borrelia burgdorferi</i>							
<i>Leptospira interrogans</i>	*			+	+	+	+
<i>Treponema pallidum</i>	*		+				
<b>Mollicutes</b>							
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>		+					
<i>Mycoplasma genitalium</i>		+					
<i>Mycoplasma penetrans</i>	+	+					
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	~+						
<i>Mycoplasma pulmonaris</i>							
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	+						
<b>Archaea</b>							
<i>Aeropyrum pernix</i>							
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	*		+				
<i>Halobacterium</i> sp.	*		+				
<i>Methanothermobacter</i> <i>thermautotrophicus</i>	*	~+	+				
<i>Methanococcus jannaschii</i>	*			+	+	+	+
<i>Methanosarcina barkeri</i> #		?	+	+	?	?	?
<i>Methanosarcina acetivorans</i>	*		+	+			
<i>Methanosarcina mazei</i>	*		+				
<i>Methanopyrus kandleri</i>		+		+			
<i>Pyrobaculum aerophilum</i>							
<i>Pyrococcus abyssi</i>	*		+			+	
<i>Pyrococcus furiosus</i>	*	~+	+			+	
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	*		+			~+	
<i>Sulfolobus solfataricus</i>				+			
<i>Sulfolobus tokodaii</i>				~+			
<i>Thermoplasma acidophilum</i>						~+	
<i>Thermoplasma volcanicum</i>						~+	

## DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

La vía de síntesis de biotina parece ser común en todos los organismos que tienen codificado en su genoma los genes *bio* clásicos (*bioA*, *bioF*, *bioD* y *bioB*). Aunque en este proyecto se determinó que *R. etli* no contiene estos genes, a excepción de un homólogo de *bioA*, (como en el caso de *S. meliloti*) existen evidencias de que no es un auxótrofo de biotina, (ver sección 2 de la revisión Guillén-Navarro *et al.*, 2005a). Adicional a lo que se expresa en la revisión, se sabe que tanto *S. meliloti* como *R. etli* son capaces de utilizar detiobiotina para su crecimiento (Entcheva *et al.*, 2002; Guillén-Navarro *et al.*, 2005b). A esto se suma el hecho de que en el Western-blot del ensayo con detiobiotina (Fig. 4), *R. etli* presenta una mayor concentración de proteínas biotiniladas al que muestra el ensayo sin suplementos, lo que sugiere que tiene la capacidad de utilizar detiobiotina para sintetizar biotina. Se ha reportado que *S. meliloti* GR4B es capaz de producir pequeñas cantidades de biotina (alrededor de  $0.1 \text{ ng ml}^{-1}$ ) en medio definido, bajo ciertas condiciones de cultivo (Sierra *et al.*, 1999). Otro caso es *Lactobacillus plantarum*, que a pesar de que en su genoma tampoco se encuentra algún homólogo a los genes *bio*, puede sintetizar biotina cuando se le suministra detiobiotina en cantidades relativamente altas (al menos  $1 \mu\text{M}$ ; Bowman y DeMoll, 1993).

Esto sugiere que en *R. etli* y *S. meliloti* puede existir una vía alternativa de síntesis de biotina, por lo menos en el último paso de la ruta, por un mecanismo que podría ser diferente a lo conocido hasta ahora. Dada la gran complejidad de la reacción de síntesis de biotina a partir de detiobiotina, es muy probable que el mecanismo alternativo se lleve a cabo por un complejo enzimático. Dicho complejo tendría que involucrar al menos un donador de azufre, una cinasa y un aceptor de electrones que podría ser una flavodoxina, como en el caso de la reacción llevada a cabo por BioB.

Por otra parte, es un hecho que en *R. etli* la biotina juega un papel importante en el proceso de infección de su hospedero. Así que,



independientemente de la posible síntesis de biotina en este organismo, en el presente trabajo se demostró que en el proceso infeccioso de esta bacteria, se requiere un transporte de biotina de alta afinidad proporcionado por el sistema de transporte codificado en el operón *bioMNY*. Como se observó en los distintos experimentos de transporte, la biotina puede ser captada por otros medios, pero a concentraciones relativamente altas. Es probable que pueda pasar por difusión, como se ha observado en *E. coli* (Piffeteau y Gaudry, 1985), o bien por otros transportadores con menor especificidad por el sustrato. Sin embargo, es posible que cuando la bacteria entra al proceso infeccioso, la biotina disponible esté en niveles muy bajos, como se deduce de los ensayos de competencia. Como se sabe, la planta le proporciona a la bacteria varios compuestos, entre los que está la biotina; sin embargo habría que analizar una cinética de nodulación, para ver en qué momento se da esta baja disponibilidad para la bacteria.

Los resultados de los ensayos de la transcripción con el promotor *p<sub>bioM</sub>* indican que la mayor expresión del operón *bioMNY* se da en el segundo subcultivo en MM. Esto sugiere que se requiere en el metabolismo fermentativo, que como ya se dijo, es similar al que presenta el bacteroide. Este dato es acorde también con lo observado en los ensayos de competencia, donde la mutante CE3M es menos competitiva, puesto que requiere captar biotina a muy baja concentración y como no puede expresar el operón *bioMNY*, se ve más limitada en comparación con la cepa silvestre, que si puede hacerlo.

Por otro lado, es claro que el operón *bioMNY* es reprimido en presencia de biotina; se sabe que la regulación por biotina de algunos operones, asociados con la síntesis de esta vitamina, involucra a una BPL bifuncional llamada BirA. Estas proteínas tienen en su región N-terminal, un motivo hélice-vuelta-hélice ('HTH'), que se pega en el promotor y reprime su transcripción. Sin embargo, el BPL de *R. etli* carece de esta región N-terminal, como es el caso de otras rizobiáceas. Esto indica que el promotor *p<sub>bioM</sub>* debe ser regulado por otro mecanismo; no obstante, el análisis de la secuencia de este promotor no reveló

la presencia de algún motivo regulatorio conocido, por lo que habrá que estudiar a detalle cómo se lleva a cabo su regulación.

Resulta interesante que la fusión del promotor del *orf1::gusA*, también tiene niveles de expresión similares al de la fusión *p<sub>bioM</sub>::gusA*, bajo las mismas condiciones. Esto sugiere que el *orf1* podría tener alguna participación en el metabolismo de biotina, quizás en el transporte. Es importante señalar que en *A. tumefaciens* se encuentra un homólogo del este *orf* en la misma posición relativa que en *S. meliloti* y que en *R. etli* (Guillén-Navarro *et al.*, 2005a). Aunque estos *orfs* pertenecen a una familia de proteínas bacterianas con función desconocida (DUF1006; InterPro IPR009351), se puede sugerir que tienen un papel específico en estas rhizobiáceas, probablemente en la etapa de colonización, como ocurre con el operón *bioMNY* en *R. etli*. Sería interesante analizar el fenotipo de una mutante en este *orf* para tratar de definir su función.

La función de cada uno de los componentes del operón *bioMNY* en *R. etli* parece típica de un transportador tipo ABC, donde BioM es la ATPasa y BioN la permeasa. En este contexto se puede pensar que BioY actúa como otra subunidad del TMD junto con BioN. No obstante, al hacer el estudio de la distribución los genes que los codifican, se observó que tanto *bioM* como *bioN* están poco distribuidos en relación con *bioY*, entre los microorganismos contemplados. Un análisis del árbol filogenético de *bioY* (Rodionov *et al.*, 2002) muestra distintas ramas de la diversidad de este gen. De manera interesante, se puede observar que dentro de cada rama se encuentran agrupados los *bioY* que convergen en operones con distintos genes. Entre ellos están los operones de genes de síntesis de biotina, el de genes homólogos a *bioMN*, o los del operón *yhfS-yhfT* que son homólogos a ligasas de ácidos grasos-CoA de cadena larga y acetiltransferasas de acetil-CoA, entre otros involucrados en metabolismo. Así también existe una rama donde se agrupan los *bioY* que no se encuentran en operones. Curiosamente, los *bioY* de *A. tumefaciens* y *S. meliloti* se encuentran muy cercanos en la rama donde se encuentran los que aparecen con *bioMN*.

Dentro de este contexto se puede suponer que en muchos organismos, BioY actúa como un transportador de biotina, independientemente de otros

componentes. El hecho de que haya convergido con *bioMN* podría representar quizás una ventaja evolutiva, en organismos donde es probable que se haya hecho más eficiente el transporte de biotina. Por otra parte, es posible que el sistema *bioMN* haya surgido a partir de un transportador ABC que evolucionó, especializándose en el transporte de biotina. Esta sugerencia se refuerza con el hecho de que es funcional aún en ausencia de *bioY*, como se vio en los ensayos de transporte de la mutante *R. etli* CE3Y.

El hecho de que rizobias como *A. tumefaciens*, *B. japonicum* y *M. loti* cuenten con *bioY* además de los de síntesis de biotina, podría asegurarles un adecuado suministro de esta vitamina. En estos casos, es posible que ambos sistemas sean activos bajo distintas condiciones, según el estado metabólico de la bacteria, lo que les puede dar alguna ventaja cuando compiten por el hospedero. Sin embargo esto tiene que ser demostrado experimentalmente, lo que podría darnos un mejor panorama del papel de la biotina en el metabolismo de las rizobiáceas.

Dentro de este entorno, sería muy interesante enfocar la continuidad de este trabajo hacia un análisis detallado de la regulación de la expresión del operón *bioMNY*, así como la búsqueda de los genes alternativos involucrados en la síntesis de biotina en *R. etli*. De este modo se podría confirmar, de manera contundente, que *R. etli* efectivamente es capaz de llevar a cabo la síntesis de biotina. Además, esto conduciría a encontrar las respuestas a las preguntas: ¿Bajo qué condiciones se induce la síntesis de biotina en *R. etli*?, ¿Existe una regulación de la expresión de los genes de la síntesis de biotina?, ¿Está relacionada con la expresión del operón *bioMNY*?, ¿Quiénes son los reguladores y cómo se lleva a cabo la regulación tanto de los genes de síntesis, como del operón *bioMNY*?, ¿Qué relación tiene esto con el proceso simbiótico?.

## CONCLUSIONES

*R. etli* CE3 no presenta los genes clásicos *bioF*, *bioD* y *bioB*, aunque posee un homólogo de *bioA* que parece ser funcional.

Los genes *bioM*, *bioN* y *bioY* se encuentran agrupados en un solo operón (*bioMNY*).

BioM y BioN son probablemente los componentes ATPasa y permeasa, respectivamente, del sistema de transporte tipo ABC *bioMN* relacionado con el transporte de biotina.

BioY está involucrado en el transporte de biotina, posiblemente como permeasa.

La biotina ejerce regulación negativa en la expresión de la fusión de GUS con *pbioM* en ambas orientaciones del promotor. Por lo tanto esta región contiene dos promotores divergentes dependientes de biotina.

Las mutantes *R. etli* CE3M y CE3Y tienen menor capacidad para captar biotina.

La mutante *R. etli* CE3M presenta una menor capacidad en la formación de nódulos en frijol, en competencia con la cepa silvestre.

En *R. etli* CE3 existe un homólogo de las BPLs que carece de la región N-terminal de regulación, característica de los BirA.

La actividad de holo-carboxilasa sintasa no está afectada en la mutante CE3M.

## REFERENCIAS

**Akatsuka, H.;** Kawai, E.; Imai, Y.; Sakurai, N. y Omori, K. 2003. The *Serratia marcescens bioH* gene encodes an esterase. *Gene* 302:185-192.

**Bower, S.;** Perkins, J.; Yocum, R.; Serror, P.; Sorokin, A.; Rahaim, P.; Howitt, C.; Prasad, N.; Ehrlich, S. y Pero, J. 1995. Cloning and characterization of the *Bacillus subtilis birA* gene encoding a repressor of the biotin operon. *J. Bacteriol.* 178:2572-2575.

**Bower, S.;** Perkins, J.; Yocum, R.; Howitt, C.; Rahaim, P. y Pero, J. 1996. Cloning, sequencing, and characterization of the *Bacillus subtilis* biotin biosynthetic operon. *J. Bacteriol.* 178:4122-4130.

**Bowman, W. C. y DeMoll, E.** 1993. Biosynthesis of biotin from dethiobiotin by the biotin auxotroph *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 175:7702-7704.

**Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

**Campbell, A.;** del Campillo-Campbell, A. y Chang, R. 1972. A mutant of *Escherichia coli* that requires high concentration of biotin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 69:676-680.

**Campbell, A.;** Chang, R.; Barker, D. y Ketner, G. 1980. Biotin regulatory (*bir*) mutations of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 142:1025-1028.

**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- $\beta$ -hydroxybutirate. *J. Bacteriol.* 178:1646-1654.

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

**de Lorenzo, V.;** Herrero, M.; Jakubzik, U. y Timmis, K. 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in Gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* 172:6568-6572.

**de Hertogh, A.;** Mayeux, P. y Evans, H. 1964. The relationship of cobalt requirement to propionate metabolism in *Rhizobium*. *J. Biol. Chem.* 239:2446-2453.

**Djordjevic, M. A.** 2004. *Sinorhizobium meliloti* metabolism in the root nodule: A proteomic perspective. *Proteomics* 4:1859-1872.

**Driessen, A. J.;** Rosen, B. P. y Konings W. N. 2000. Diversity of transport mechanisms: common structural principles. *Trends Biochem. Sci.* 25:397-401.

**Dunn**, M. F.; Encarnación, S.; Araíza, G.; Vargas, M.C., Dávalos, A.; Peralta, H.; Mora, Y. y Mora, J. 1996. Pyruvate carboxylase from *Rhizobium etli*: Mutant characterization, nucleotide sequence, and physiological role. *J. Bacteriol.* 178: 5960-5970.

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

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

**Dunn**, M.F., Araíza, G., Encarnación, S., Finan, T.M. y Mora, J. 2002. Characteristics and metabolic roles of biotin-dependent enzymes in rhizobia. pp. 158–162. En: Finan, T., O'Brian, M.R., Layzell, D.B., Vessey, J.K. and Newton, W. (Eds.), Nitrogen Fixation: Global Perspectives. CABI, Wallingford, Oxon, UK.

**Dunn**, M. F., Araíza, G. y Mora, J. 2004. Biochemical characterization of a *Rhizobium etli* monovalent cation-stimulated acyl-coenzyme A carboxylase with a high substrate specificity constant for propionyl-coenzyme A. *Microbiology* 150:399-406.

**Eisenberg**, M.; Mee, B.; Prakash, O. y Eisenberg, M. 1975. Properties of  $\square$ -Dehidrobiotin-resistant mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 122:66-72.

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

**Encarnación**, S.; Guzmán, Y.; Dunn, M.; Hernández, M.; Vargas, MC. y Mora, J. 2003. Proteome analysis of aerobic and fermentative metabolism in *Rhizobium etli* CE3. *Proteomics* 3:1077-1085.

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

**Fath**, M. J. y Kolter, R. 1993. ABC transporters: Bacterial exporters. *Microb. Rev.* 57:995-1017.

**Girard**, L.; Brom, S.; Dávalos, A.; López, O.; Soberón, M. y Romero, D. 2000. Differential regulation of *fixN*-reiterated genes in *Rhizobium etli* by a novel *fixL*-*fixK* cascade. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13:1283-1292.

**Gloeckler**, R.; Ohsawa, I.; Speck, D.; Ledoux, C.; Bernard, S.; Zinsius, M.; Villeval, D.; Kisou, T.; Kamogawa, K. y Lemoine, Y. 1990. Cloning and characterization of the *Bacillus sphaericus* genes controlling the bioconversion of pimelate into dethiobiotin. *Gene* 87:63-70.

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

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

**Heidger**, M. A. 1994. Structure, function and evolution of solute transporters in prokaryotes and eukaryotes. *J. Exp. Biol.* 196:15-49.

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

**Higgins**, C. F. y Linton, K. 2004. The ATP switch model for ABC transporters. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11:918-926.

**Huerta-Zepeda**, A.; Ortuño. L.; Du Pont, G.; Durán, S.; Lloret, A.; Merchant-Larios, H. y Calderón, J. 1997. Isolation and characterization of *Rhizobium etli* mutants altered in degradation of asparagine. *J. Bacteriol.* 179:2068-2072.

**Ifuku**, O.; Miyaoka, H.; Koga, N.; Kishimoto, J.; Haze, S.; Wachi, Y. y Kajiwara, M. 1994. Origin of carbon atoms of biotin. <sup>13</sup>C-NMR studies on biotin biosynthesis in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 220:585-591.

**Itoh**, Y.; Sugai, A.; Uda, I. e Itoh, T. 2001. The evolution of lipids. *Adv. Space Res.* 28:719-724.

**Jones**, P. M. y George, A. M. 2004. The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cell. Mol. Life Sci.* 61:682-699.

**León-Del-Río**, A. 2005. Biotin-dependent regulation of gene expression in human cells. *J. Nutr. Biochem.* 16:432-434.

**Lodwig**, E. y Poole, P. 2003. Metabolism of *Rhizobium* bacteroids. *Crit. Rev. Plant Sci.* 22:37-78.

**Melville**, D.; Moyer, A. W.; Hofmann, K. y du Vigneaud, V. 1942. The structure of biotin: The formation of thiophenevaleric acid from biotin. *J. Biol. Chem.* 146:487-492.

**Menendez**, C. Bauer, Z.; Huber, H.; Gad'on, N.; Stetter, K. O. y Fuchs, G. 1999. Presence of acetyl coenzyme A (CoA) carboxylase and propionyl-CoA carboxylase in autotrophic Crenarqueota and indication for operation of a 3-hydroxypropionate cycle on autotrophic carbon fixation. *J. Bacteriol.* 181:1088-1098.

**Nelson**, D. L. y Cox, M. 2005. Chapter 11: Biological membranes and transport. pp. 369-420. En: Freeman, W. H. y Co. (Eds.), Lehninger, Principles of Biochemistry. 4a. Ed. Nueva York, Estados Unidos.

**Otsuka**, A. J.; Buoncristiani, M. R.; Howard, P.; Flamm, J.; Hohnson, C.; Yamamoto, R.; Uchida, K.; Cook, C.; Ruppert, J. y Matsuzaki, J. 1988. The *Escherichia coli* biotin

biosynthetic enzyme sequences predicted from the nucleotide sequence of the *bio* operon. *J. Biol. Chem.* 263:19577-19585.

**Piffeteau**, A. y Gaudry, M. 1985. Biotin uptake: influx, efflux and countertransport in *Escherichia coli* K12. *Biochim. Biophys. Acta* 816:77-82.

**Ploux**, O.; Soularue, P.; Marquet, A.; Gloeckler, R. y Lemoine, Y. 1992. Investigation of the first step of biotin biosynthesis in *Bacillus sphaericus*. Purification and characterization of the pimeloyl-CoA synthase, and uptake of pimelate. *Biochem. J.* 287:685-690.

**Ploux**, O.; Breyne, O.; Carillon, S. y Marquet, A. 1999. Slow-binding and competitive inhibition of 8-amino-7-oxopelargonate synthase, a piridoxal-5'-phosphate-dependent enzyme involved in biotin biosynthesis, by substrate and intermediate analogs. Kinetic and binding studies. *Eur. J. Biochem.* 259:63-70.

**Rodionov**, D. A.; Mironov, A.; Gelfand, M. 2002. Conservation of the biotin regulon and the BirA regulatory signal in Eubacteria and Archaea. *Genome Res.* 12:1507-1506.

**Rodriguez-Melendez**, R. y Zempleni, J. 2003. Regulation of gene expression by biotin (Review). *J. Nutr. Biochem.* 14:680-690.

**Sakurai**, N.; Akatsuka, H.; Kawai, E.; Imai, Y. y Komatsubara, S. 1996. Complete sequence and organization of the *Serratia marcescens* biotin operon. *Microbiology* 142:3295-3303.

**Saier**, M.H., Jr. 2000a. A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microb. Mol. Biol.* 64:354-411.

**Saier**, M.H., Jr. 2000b. Vectorial metabolism and the evolution of transport systems. *J. Bact.* 182:5029-5035.

**Sanishvili**, R; Yakunin, A.; Laskowski, R.; Skarina, T.; Evdokimova, E.; Doherty-Kirby, A.; Lajoie, G.; Thornton, J.; Arrowsmith, C.; Savchenko, A.; Joachimiak, A. y Edwards, A. 2003. Integrating structure, bioinformatics, and enzymology to discover function. BioH, a new carboxyl esterase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 278:26039-26045.

**Sanyal**, I.; Cohen, G. y Flint, D. H. 1994a. Biotin synthase: Purification, characterization as a [2Fe-2S] cluster protein, and *in vitro* activity of the *Escherichia coli* *bioB* gene product. *Biochemistry* 33:3625-3631.

**Sanyal**, I.; Lee, S. y Flint, D. 1994b. Biosynthesis of pimeloyl-CoA, a biotin precursor in *Escherichia coli*, follows a modified fatty acid synthesis pathway: <sup>13</sup>C-labeling studies. *J. Am. Chem. Soc.* 116:2637-2638.

**Schmitt**, L. y Tampé, R. 2002. Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12:754-760.



**Schneider**, G. y Lindqvist, Y. 2001. Structural enzymology of biotin biosynthesis. *FEBS Lett.* 495:7-11.

**Sierra**, S.; Rodelas, B., Martínez-Toledo, M., Pozo, C. y González-López, J. 1999. Production of B-group vitamins by two *Rhizobium* strains in chemically defined media. *J. Appl. Microb.* 86:851-858.

**Stok**, J. y de Voss, J. 2000. Expression, purification, and characterization of BioI: A carbon-carbon bond cleaving cytochrome P450 involved in biotin biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 384:351-360.

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

**Streit**, W. R. y Entcheva, P. 2003. Biotin in microbes, the genes involved in its biosynthesis, its biochemical role and perspectives for biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61:21-31.

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

**Tomii**, K. y Kanehisa, M. 1998. A comparative analysis of ABC transporters in complete microbial genomes. *Genome Res.* 8:1048-1059.

**Tse Sum Bui**, B.; Benda, R.; Schünemann, V.; Florentin, D.; Trautwein, A. y Marquet, A. 2003. Fate of the  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$  cluster of *Escherichia coli* biotin synthase during reaction: A Mössbauer characterization. *Biochemistry* 42:8791-8798.

**Ugulava**, N.; Sacanell, C. J. y Jarrett, J. 2001. Spectroscopic changes during a single turnover of biotin synthase: Destruction of a  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$  cluster accompanies sulfur insertion. *Biochemistry* 40:8352-8358.

**van der Heide**, T. y Poolman, B. 2002. ABC transporters: one, two or four extracytoplasmic substrate-binding sites?. *EMBO Reports* 3:938-943.

**West**, P. y Wilson, P. 1940. Biotin as a growth stimulant for the root nodule bacteria. *Enzymol.* 8:152-162.

**Wu**, C.-H.; Chen, H.-Y. y Shiuan, D. 1996. Isolation and characterization of the *Erwinia herbicola* *bio* operon and the sequences of the *bioA* and *bioB* genes. *Gene* 174:251-258.

**Young**, J., Kuykendall, L., Martínez-Romero, E.; Kerr, A. y Sawada, H. 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the

inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al.* 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* 51:89-103.

## Abreviaturas

ABC	'ATP-binding cassette'
ACC	Acetil-CoA carboxilasa
ACP	Proteína acarreadora de acilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
BCCP	'Biotin carboxyl carrier protein'
BPL	'Biotin-protein ligase'; holocarboxilasa sintasa
CoA	Coenzima A
DAPA	Ácido 7,8-diaminopelargónico
GUS	$\beta$ -Glucuronidasa
KAPA	Ácido 7-ceto-8-aminopelargónico
MM	Medio mínimo
NBD	Dominio de unión del nucleótido
ODH	Oxoglutarato deshidrogenasa
<i>orf</i>	Marco abierto de lectura
<i>pbioM</i>	Región promotora de <i>bioM</i>
PBP	'Periplasmic-binding protein'
PCC	Propionil-CoA carboxilasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PHB	Poli- $\beta$ -hidroxibutirato
PNP	<i>p</i> -nitrofenol
PYC	Piruvato carboxilasa
SAM	S-adenosil metionina
SBP	Proteína de pegado del sustrato
TC	'Transport classification'
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
TMD	Dominio transmembranal