

2
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO

DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

**REGULACION DE LAS OXIDASAS TERMINALES ALTERNAS
CITOCROMO *o* Y CITOCROMO *d*
Y SU RELACION CON LA FIJACION DE NITROGENO
EN *Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli***

TESIS

**DONADO POR D. G. B. - B. C.
QUE PARA OBTENER**

EL GRADO DE

LICENCIADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

PRESENTA

JORGE MEMBRILLO HERNANDEZ

Cd. Universitaria 1991.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

INTRODUCCION

DAVID KEILIN.

Quiero comenzar esta introducción haciendo un breve homenaje a David Keilin quien en 1920 realizó experimentos cruciales sobre la naturaleza química de la respiración en células animales y de microorganismos y cuyas meticolosas observaciones continúan inspirando investigadores y estimulando nuevo trabajo en este campo.

Entre 1919 y 1925, durante su estancia en el Instituto Molteno en Cambridge Inglaterra, David Keilin estudiaba a la mosca *Gasterophilus intestinalis*, cuya larva vive como parásito en el estómago del caballo; Keilin realizó estudios espectrofotométricos (claro que con las limitaciones del momento) de tejidos de mosca adulta y observó un patrón de cuatro bandas. El mismo patrón lo encontró en larvas, orugas y moscas jóvenes; Keilin llamó a estos pigmentos "Citocromos".

Entonces ocurrió uno de los casos de la ciencia en que accidentalmente se logra un descubrimiento importante. Keilin había tratado de cultivar larvas de *Gasterophilus* en su laboratorio e intentó alimentarlas con levaduras o con *Bacillus subtilis*. Por curiosidad, examinó pastas de estas células microbianas con su

espectrofotómetro y sorprendido observó el mismo patrón de cuatro bandas que no podían deberse a la hemoglobina. Un día examinó levaduras frescas y observó que no presentaban el patrón de cuatro bandas; antes de que pudiera remover la muestra del microscopio, las bandas aparecieron. Las bandas desaparecían si se agitaba la suspensión de células. Keilin ahora no tenía dudas de que los citocromos estaban distribuidos en todos los organismos aeróbicos desde las bacterias a los mamíferos y que eran pigmentos de tipo hemo, respiratorios, intracelulares y diferentes de la hemoglobina (78).

Estos experimentos son la raíz de la investigación sobre la respiración en microorganismos. Nuestro trabajo de investigación se centra en la importancia de la respiración durante el proceso de fijación de nitrógeno. El modelo que escogimos para desarrollarla fue el de la simbiosis entre la planta frijol (*Phaseolus vulgaris*) y la bacteria *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli*.

SISTEMA RESPIRATORIO: Respiración Bacteriana.

Se le conoce a la respiración bacteriana como la transferencia termodinámicamente espontánea de equivalentes reductores a partir de un reductor a un oxidante a través de una serie de componentes redox unidos predominantemente a membrana citoplasmática. Este proceso está acompañado de un cambio en energía libre, el cual depende de la diferencia de potencial del par redox (81,82).

La transferencia de electrones de alta energía por los complejos respiratorios está acoplada a la translocación vectorial de protones al lado externo de la membrana. Esto da como resultado un potencial electroquímico de protones que puede ser utilizado para la síntesis de ATP (82).

Componentes de las cadenas respiratorias bacterianas.

La cadena de transporte de electrones bacteriana está constituida por diferentes componentes que asemejan a la cadena respiratoria mitocondrial (83,84). Estas incluyen a las deshidrogenasas del malato, del succinato y del NADH, proteínas hierro-azufre, quinonas y citocromos del tipo a, b, c, y d.

A continuación describiré brevemente los componentes de las cadenas respiratorias bacterianas:

FLAVOPROTEINAS. Las más comunes son las que oxidan malato, lactato, glicerol-3-fosfato y dihidro-orato. Todas contienen FMN (flavín-adenín-mononucleótido) excepto la lactato deshidrogenasa que contiene FAD (flavín-adenín-dinucleótido). Estas proteínas tienen al menos una subunidad que está localizada del lado citoplásmico de la membrana, a la cual están acoplados fosfolípidos específicos. (82).

NADH deshidrogenasa. Este sistema fue conocido inicialmente con el nombre de Complejo I; cataliza la transferencia de equivalentes reductores desde el NADH (nicotín-adenín-dinucleótido en su forma reducida) hasta la ubiquinona o menaquinona, siendo la vía de entrada de electrones más importante para casi cualquier sistema respiratorio. La proteína contiene flavina unida no covalentemente (FMN o FAD) y más de cuatro centros Hierro-Azufre (82).

Succinato deshidrogenasa. Esta enzima cataliza la reacción de oxidación del succinato a fumarato y transfiere equivalentes reductores preferentemente a la ubiquinona. El alto potencial redox del par fumarato-succinato (30mv) hace insignificante la contribución de esta enzima en la conservación de energía, lo que impide el bombeo de protones (82).

QUINONAS. Las quinonas más comunes en los sistemas transportadoras de electrones bacterianos son la Ubiquinona (UQ) y la Megaquinona (MQ), las cuales están formadas por núcleos de 1, 4-benzoquinonas o naftoquinonas unidos a largas cadenas de poliisoprenos. La forma reducida de las quinonas acepta dos hidrógenos para formar los quinoles respectivos, los cuales se forman vía los intermediarios semiquinona, y esto a su vez pueden ionizarse para formar el anión QH⁻.

La ubiquinona es componente redox de las bacterias gram-negativas mientras que la megaquinona parece ser casi exclusiva de las bacterias gram-positivas; sin

embargo, las bacterias facultativas como las enterobacterias (por ejemplo *E.coli*) contienen ambas quinonas. La UQ es la quinona principal durante la respiración aerobia o con nitrato como aceptor, mientras que la MQ de potencial redox más negativo, esta involucrada en la transferencia de electrones en el sistema del fumarato (82).

Citocromo $a+a_3$. Esta oxidasa es la más parecida a la oxidasa mitocondrial. Se distingue de ésta porque tiene menos subunidades que la mitocondrial y por estar asociada a los citocromo c o c_1 (85) Esta oxidasa esta presente en la mayoría de los grupos bacterianos (38). El citocromo $a+a_3$ es reemplazado por citocromo o cuando las bacterias se cultivan en bajas tensiones de oxígeno. (39,87) La absorción característica de los grupos hemos tipo a da una absorción de 424 y 602 nanómetros para la enzima oxidada y de 445 y 605nm para la enzima reducida (85). Como en el caso de la enzima mitocondrial el citocromo $a+a_3$ los dos grupos hemos se distinguen por sus propiedades de unir ligandos. Citocromo a_3 une, en su forma reducida CO, CN y otros ligandos. El citocromo a no une estos ligandos (40). El citocromo $a+a_3$ contiene 2 ó 3 átomos de cobre que son importantes para la reducción del oxígeno (84). La enzima tiene una Km por el oxígeno de 4 a 8 μ M (39) por lo que se distingue como la oxidasa terminal con menor afinidad por el oxígeno.

El citocromo $a+a_3$ funciona como una bomba de protones (85). esto ha sido demostrado con la enzima purificada y reconstituida en vesículas membranales de tres diferentes especies bacterianas (88, 89, 90).

Se ha distinguido en la bacteria *Acetobacter pasteurianus* una banda de absorción a 589 nm (91) que era lo suficientemente lejana a la de citocromo a+a, lo que permitió distinguir estas dos oxidasas (85). Esta banda de absorción se encontró en *E. coli* y *Rhizobium sp.* en los que se demostró que el hemo que contiene este citocromo es de tipo b que pudiera ser una hidroperoxidasa (82), a este citocromo se le llama citocromo a.

Citocromo o. El citocromo o es la oxidasa terminal más representada en diferentes especies de bacterias (39). Este citocromo está formado por 2 o 4 subunidades dependiendo de la especie. El hemo que posee es de tipo b y se ha reportado que puede ser encontrado unido a otro grupo hemo b o a otro grupo hemo c (85). Se ha sugerido la participación de este citocromo tanto en la cadena de transporte de electrones aeróbica como en la cadena de transporte de electrones de bajo nivel de oxígeno, dependiendo si oxida citocromos tipo b o c.

El citocromo o tiene una absorción característica de citocromo de tipo b con picos a 430 nm y 560 nm, por lo que además de su identificación espectrofotométrica es necesario identificarlo por su capacidad de reaccionar con CO (85). Los espectros de preparaciones reducidas más CO, muestran señales típicas con un pico a 417 nm y valles a 430 nm y a 560 nm.

Se han reportado los valores de la Km por oxígeno del citocromo o en diversas bacterias: de 1.8 a 6.5 μ M (85). El citocromo o no cataliza una traslocación vectorial de protones, sino que genera un gradiente de pH a través de reacciones que consumen y liberan H⁺ en ambos lados de la membrana plasmática (86). Sin embargo hay un reporte (92) en el que se propone que este citocromo funcione como bomba de protones en *Rhodopseudomonas capsulata*.

Citocromo d. El citocromo d se puede encontrar entre bacterias gram-negativas heterotróficas. El citocromo d generalmente se encuentra asociado al citocromo o como oxidasa alterna (82). Se ha reportado que el citocromo d se expresa en condiciones de limitación de oxígeno, sin embargo no es la única condición de expresión; también se expresa en la fase estacionaria de crecimiento, en presencia de cianuro y en condiciones de limitación de cobre (48).

El complejo enzimático que se ha analizado fue el purificado de *E. coli* y de *Photobacterium phosphoreum* (93), y en ambos se observó la misma constitución de dos subunidades de diferente peso molecular. El hemo d es capaz de unir CO (50, 51, 93). La oxidación de quinol por citocromo d se inhibe con concentraciones de cianuro y azida mucho mayores que las requeridas para inhibir la oxidación de quinol por citocromo o (50, 93). El citocromo d presenta una Km por el oxígeno que va de 0.02 a 0.39 μ M, lo que distingue a este citocromo como la oxidasa bacteriana con mayor afinidad por el oxígeno.

REGULACION DE LA EXPRESION DE CITOCROMOS EN BACTERIAS.

Los estudios de regulación de la expresión de genes que codifiquen para enzimas relacionadas al transporte de electrones en bacterias se ha realizado en su mayoría en la enterobacteria *Escherichia coli* por lo que me referiré a ella, aunque debo aclarar que su sistema respiratorio es diferente al de muchas bacterias, su cadena respiratoria carece del citocromo aa, y tiene dos terminales oxidasas: citocromo o y citocromo d. Además *E. coli* es una bacteria facultativa, es decir puede obtener energía en aerobiosis como en anaerobiosis, ya sea por respiración o por fermentación.

Sin embargo se han encontrado proteínas homologas involucradas en la regulación de la respiración de *E. coli* en otras bacterias, así que considero de gran importancia mencionar su sistemas de regulación.

Existen dos clases de respiración: respiración aerobia y respiración anaerobia. La primera involucra a vías metabólicas de transporte de electrones en las cuales la energía es generada por el acoplamiento de la oxidación de un sustrato a la reducción de oxígeno. La segunda utiliza otros aceptores de electrones diferentes del oxígeno como el nitrato, nitrito, fumarato, dimetilsulfóxido, etc. El proceso fermentativo incluye una serie de aceptores de electrones endógenos, generando energía principalmente por la fosforilación de sustratos. El intercambio de una manera de producir energía a otro (respiración aerobia, respiración anaerobia y fermentación) lleva consigo la represión de

algunas enzimas y el encendido de otras. Existen mecanismos globales de regulación que aseguran que se use el proceso que provea más energía dependiendo del medio en el que se encuentre la bacteria. Existe una decreciente preferencia por el último aceptor de electrones: oxígeno, nitrato, fumarato, aceptores endógenos (74).

Así durante crecimiento aeróbico, los sustratos serán totalmente oxidados a CO_2 mediante el ciclo de Krebs y la abundancia de energía es generado por la oxidación de coenzimas reducidas en la cadena respiratoria utilizando citocromo *o* oxidasa (codificada por el operón *cyoABCD*) como terminal oxidasa (74). Cuando el oxígeno se vuelve limitante esta oxidasa es reemplazada por el producto del operón *cydAB* (74), citocromo *d* oxidasa, la cual como mencioné antes, tiene una mayor afinidad por el oxígeno (74) (Fig 1).

En ausencia de oxígeno son inducidas vías alternativas involucrando sustratos fermentables. El ciclo de Krebs es convertido en una forma no cíclica por la represión de la enzima 2-oxoglutarato deshidrogenasa y la utilización de fumarato reductasa y Piruvato formatoliasa (formato acetiltransferasa) en lugar de succinato deshidrogenasa y piruvato deshidrogenasa respectivamente (31). La mayoría de los sustratos son convertidos a acetato, etanol, H_2 y CO_2 , poco succinato, formato y lactato (Fig.1).

Fue hasta 1988 cuando se identificaron dos reguladores transcripcionales de la expresión genética regulada por oxígeno (31, 24); Estos descubrimientos se dieron estudiando la interconversión de succinato y fumarato (24). *ArcA*, que fue descrito porque mutaciones en este sistema dan como resultado la expresión constitutiva de la

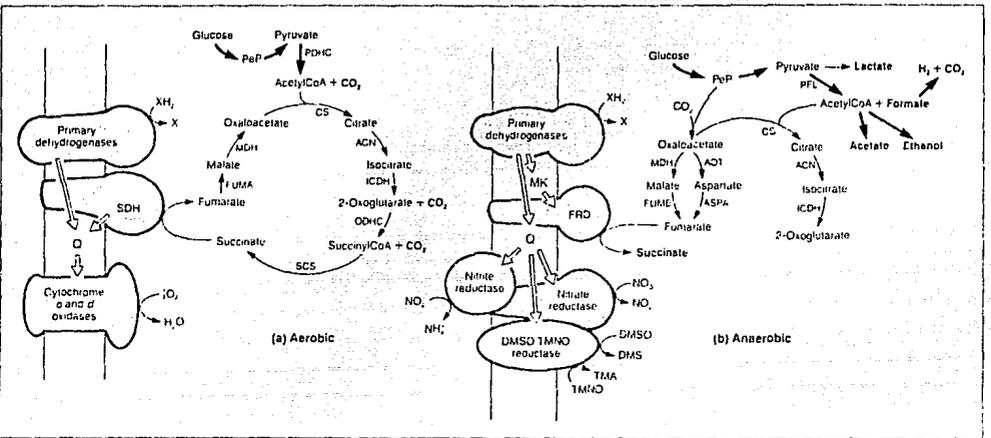


FIGURA 1. Sistemas Respiratorios y metabolismo de carbono en *E. coli* bajo condiciones a)Aerobicas b)anaerobicas.

Succinato deshidrogenasa y otras funciones de aerobiosis bajo condiciones anaerobias. Fue llamado **ArcA** por ser deficiente en "Aerobic respiration control" (31). **FNR** que fue descrito porque mutantes en este sistema son incapaces de inducir a las enzimas fumarato reductasa y nitrato reductasa en condiciones anaerobias. Se le llamó **FNR** por ser deficientes en "Fumarate and Nitrate Reduction" (31).

SISTEMA ARC. Mutaciones en los genes de *E. coli* *arcA* y *arcB* provocan un incremento en la expresión de funciones aerobias, una represión en la expresión de funciones anaerobias y en la expresión de la terminal oxidasa \bar{d} cuando se cultiva la bacteria en bajas tensiones de oxígeno.

El mapeo genético del gene *arcA* ha llevado a la conclusión de que es idéntico a los genes *dye*, *strA*, y *cpxC* reportados anteriormente, cuya función es conferir resistencia a azul de toluidina, controlar la expresión del factor F (pili), y otras funciones esenciales para el proceso de conjugación.

La predicción de la estructura del producto del gene *arcB*, ArcB, ha llevado a la suposición de que ArcB sea una proteína asociada a membrana que funcione como sensor de señales; por otro se especula que el producto del gene *arcA*, ArcA, sea un regulador citoplásmico con dominios de unión a DNA (26). Existe hoy en día un modelo en el que se sugiere que ArcB es una proteína histidín-cinasa que se autofosforila en respuesta a la limitación de oxígeno y entonces transmite la señal a ArcA fosforilándola convirtiéndose así en su forma "activa" (Fig 2). Se ha propuesto que la proteína ArcB responde al estado de oxidación-reducción que le proporciona

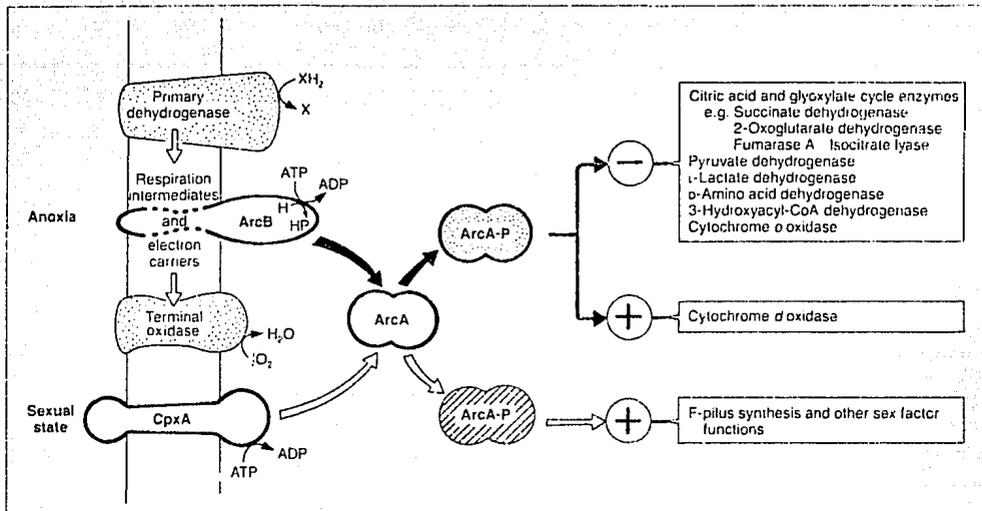


FIGURA 2. Representación esquemática del sistema ArcA-ArcB involucrado en el control de la regulación de la respiración aeróbica en *E. coli*.

algun componente de la cadena respiratoria, sin embargo dicho componente no ha sido determinado (74).

ArcA responde a las señales de otro sensor transmembranal, CpxA. Este parece detectar oportunidades de apareamiento y nuevamente, por señalización a través de fosforilación se activa ArcA y se convierte en un activador de genes sexuales incluyendo los concernientes de la síntesis del pili.

Así ArcA puede funcionar tanto como activador como represor en respuesta a señales provenientes de diferentes sensores. No se ha determinado hasta la fecha si existe una región consenso de unión de ArcA a DNA.

SISTEMA FNR. El producto del gene *fnr*, FNR esta involucrado en la activación y represión anaeróbica de un grupo de enzimas. (Figura 3).

La secuencia del gene *fnr* se asemeja al gene del receptor de AMPc (CRP) llamado también proteína activadora de funciones catabólicas (CAP) (31). Se sugiere que en respuesta a la anoxia, FNR se transforma por un cambio conformacional en un activador o represor transcripcional que reconoce secuencias específicas en los promotores. De la secuencia polipeptídica se predice que la proteína FNR contiene un dominio de unión a DNA con un motivo "hélice-vuelta-hélice". Difiere de la proteína CRP en que FNR es monomérica, posee un segmento amino-terminal rico en cisteína y en su unión equimolar al Hierro (94).

Por el momento no ha sido identificada la señal a la que responde la proteína FNR. Se ha sugerido que los residuos de cisteína participan en la unión del hierro y que la interconversión a las conformaciones "aeróbicas" o "anaeróbicas" depende del sitio de reducción del hierro. (Figura 3) (26, 31).

Por experimentos tipo "footprinting" se ha establecido una secuencia consenso de unión de la proteína FNR a DNA (55) Esta secuencia es de aproximadamente 20 pares de bases de largo y contiene una repetición invertida de 5 pares de bases (55):

nTTGATnnnnATCAAn

Esto es típico de secuencias reconocidas por proteínas diméricas que contienen el motivo "hélice-vuelta-hélice" y la secuencia de la repetición invertida se asemeja a la reportada para la proteína CRP:

TGTGAnnnnnTCACA

Proteínas homólogas a FNR han sido descritas (31, 93). Es muy importante mencionar el caso de FixK y FnrN de *Rhizobium meliloti*, ambas proteínas reconocen la misma secuencia que FNR pero la señal fisiológica a la cual responden no es conocida. Los residuos de cisteínas en el amino terminal de FNR es conservado parcialmente en FnrN pero esta ausente en FixK.

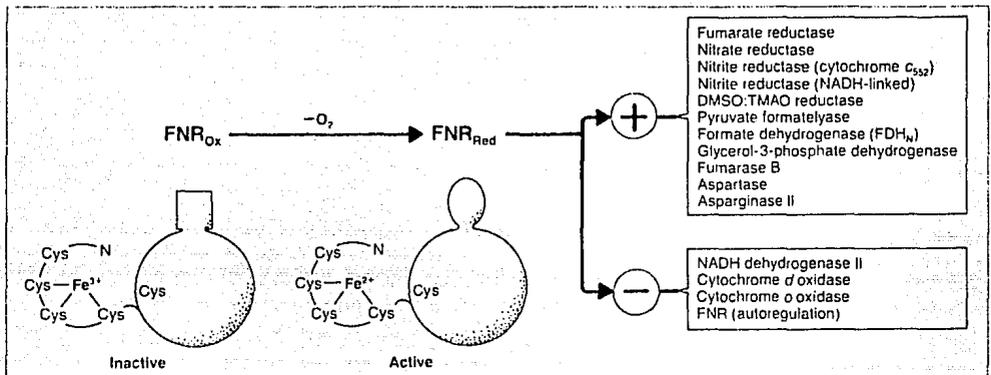


FIGURA 3. Representación especulativa de conversión anaeróbica de FNR en su estado activo capaz de unirse a DNA, las funciones que son (+) activadas o (-) reprimidas están representadas.

REGULACION DE LA EXPRESION DE CITOCROMOS OXIDASAS TERMINALES.

E. coli produce dos tipos de oxidasas terminales durante el crecimiento aeróbico: citocromo o y citocromo d, la diferencia entre ellas es su afinidad por oxígeno, mientras el citocromo o tiene una afinidad baja ($K_m=0.2\mu\text{M}$), el citocromo d tiene una alta afinidad por el oxígeno ($K_m=0.024\mu\text{M}$).

La expresión de la terminal oxidasa o se da en condiciones de crecimiento exponencial y no es expresado durante crecimiento anaeróbico. En contraste, el citocromo d se expresa en condiciones anaerobias y en fase estacionaria del crecimiento (96). Experimentos utilizando fusiones genéticas mostraron que los operones *cyoABCD* y *cydAB* están bajo el control del sistema ArcA-FNR (31). El operón *cyoABCD* es reprimido durante crecimiento anaeróbico y su represión máxima requiere la presencia de FNR y ArcA. El operón *cydAB* es inducible anaeróbicamente y se hiperinduce en mutantes FNR. Esto sugiere que FNR reprime la expresión de *cydAB* en condiciones anaerobias, lo cual correlaciona con el hecho de que exista un sitio de unión a FNR en el promotor del operón *cydAB* (31). La hiperinducibilidad del operón *cydAB* en ausencia de FNR sugiere que otra proteína pueda estar actuando como activador positivo sobre el promotor *cydAB*. Se ha propuesto (15) que sea ArcA ya que la inducción anaerobica de *cydAB* se reduce considerablemente en mutantes ArcA; Por lo tanto se ha propuesto que el operón *cydAB* es activado por ArcA en condiciones microaerofilicas y reprimido por FNR en condiciones anaerobias, así este control dual permite al citocromo d oxidasa ser sintetizado al máximo durante condiciones de limitación de oxígeno en contraste a condiciones aerobicas o de total

anaerobiosis.

Datos recientes sin embargo sugieren que FNR funcione tanto como inductor como represor de la expresión del operón *cydAB* (21).

***Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*.**

Rhizobium leguminosarum bv. *phaseoli* se encuentra clasificada dentro de las bacterias gram negativas, además pertenece a un reducido grupo de microorganismos que son capaces de reducir el nitrógeno atmosférico, proceso conocido como fijación de nitrógeno. Esta bacteria tiene su habitat en el suelo y es capaz de realizar una asociación simbiótica con las raíces de *Phaseolus vulgaris* L.

Dentro de esta asociación simbiótica se forma una estructura llamada nódulo, formado por tejidos de la planta que es donde se lleva a cabo la fijación de nitrógeno. Durante el desarrollo de este órgano, la bacteria sufren un proceso de diferenciación a nivel fisiológico y metabólico; a la forma diferenciada de la bacteria se le conoce como bacteroide y es ésta la que lleva a cabo la reducción del nitrógeno atmosférico. El proceso de fijación de nitrógeno se realiza bajo condiciones de bajo nivel de oxígeno, puesto que la enzima que cataliza la reacción de reducción, la Nitrogenasa, es sensible al oxígeno (80).

La fijación de nitrógeno en el bacteroide se ve limitada por la disponibilidad de esqueletos de carbono. La planta debe proveer a la bacteria diferenciada, el poder energético y reductor necesario para este proceso, así como la planta requiere de carbono y poder energético para poder asimilar el amonio el cual es el producto de la fijación de nitrógeno (97, 98).

Como se puede observar, existe una estrecha relación entre el consumo de oxígeno, el poder reductor, la disponibilidad de carbono y la fijación de nitrógeno.

Disponibilidad de esqueletos de carbono

En *Bradyrhizobium japonicum*, se encontró que el succinato incrementaba la respiración en mayor cantidad que la debida a la glucosa (100). Hay evidencia acerca de la participación del glutamato en la respiración de *B. japonicum* (101). De esta forma se sabe que son los ácidos orgánicos, más que los carbohidratos la fuente de energía preferencial de los bacteroides. Actualmente se conoce que son también la fuente de energía utilizada para llevar a cabo la fijación de nitrógeno (102,103).

Estudios genéticos.

El Estudio de mutantes en el transporte y metabolismo de carbono ha proporcionado información de los requerimientos de éste durante la simbiosis. El succinato, el fumarato y el malato son trasportados por el mismo sistema, tanto en

bacteroides como en células en cultivo de *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* y *Bradyrhizobium japonicum*. Las mutantes en la captación de Succinato son incapaces de asimilar otros ácidos dicarboxílicos y no fijan nitrógeno (104,105)

Las mutantes de *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* deficientes en la enzima Hexocinasa, en la asimilación de fructuosa y en la piruvato carboxilasa son capaces de realizar una simbiosis efectiva con la planta de trébol. Esto sugiere fuertemente que ni la glucosa o la sacarosa son requeridas para la fijación de nitrógeno en los bacteroides de estas cepas.

Estudios posteriores (13), demostraron que los ácidos dicarboxílicos son requeridos para la formación efectiva de nódulos ya que mutantes de *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* defectivas en el transporte de succinato o fumarato lleva como consecuencia la formación de nódulos inefectivos.

TRANSPORTE DE ELECTRONES EN Rhizobium

El sistema de transporte de electrones de las rizobiáceas ha sido estudiado extensivamente en *Bradyrhizobium japonicum* y en *Bradyrhizobium* *sp.* Estos estudios han demostrado diferencias significativas en la composición y organización del sistema respiratorio de los bacteroides y el de las células en vida libre. El tipo de citocromos y de deshidrogenasas son básicamente diferentes en el bacteroide (63). Sin embargo, las diferencias parecen ser fundamentalmente en el tipo de oxidasa que se encuentra

en cada forma diferenciada de la bacteria. *Rhizobium* puede crecer en vida libre en diferentes condiciones: aeróbicamente, microaerofílicamente con 2% de oxígeno, y quimiolitotróficamente con H_2 y CO_2 como fuente de energía y de carbono respectivamente. En cada condición existe expresión diferencial del sistema respiratorio (59).

B. japonicum en vida libre contiene citocromos intermedios de tipo b y c, y como oxidasas terminales a los citocromos a+a₃ y o. Los citocromos a+a₃ y o forman un complejo con monóxido de carbono en una atmósfera $CO-O_2$ 95:5 (v/v), sin embargo la respiración no se inhibe completamente bajo estas condiciones, por lo que parece ser que existe al menos otro componente que se expresa en vida libre y que actúa como oxidasa terminal (64). La expresión de oxidasas múltiples es común en las bacterias, lo que permite a estos organismos sobrevivir en un amplio rango de concentraciones de oxígeno.

Se ha descrito que los citocromos c y a+a₃ forman parte de una misma rama del sistema de transporte de electrones, mientras que el citocromo o forma parte de otro ramal el cual no oxida citocromo c. Mutantes de *B. japonicum* que carecen de citocromo c y a+a₃, tiene propiedades respiratorias idénticas que la mutante que solo carece de citocromo a+a₃, (8).

El sistema de transporte de electrones de *R. leguminosarum* bv. *trifoli* en vida libre es similar al de *B. japonicum*, ya que ambas bacterias poseen el punto de ramificación del sistema respiratorio a nivel de citocromo b, en donde los citocromos de

c y a+a, forman una rama separada de citocromo o (66).

R. leguminosarum *bv. trifolii*, *R. leguminosarum* *bv. viciae* y *R. leguminosarum* *bv. phaseoli* expresan el citocromo d bajo condiciones de aereación restringida (17), aunque su función como oxidasa no ha sido bien establecida.

El NADH es el sustrato que oxidan preferencialmente las rizobiáceas, el NADH al igual que el TMPD (N,N,N',N'-tetrametil-p-phenilenediamina) han sido mostrado ser oxidado a mayor velocidad que el succinato (75). Esta diferencia en velocidad de oxidación puede deberse a la especificidad que las oxidasas tienen por los diferentes sustratos. Se ha propuesto que el citocromo a+a, tiene una alta velocidad de recambio, y puede soportar un flujo más alto de electrones de lo que puede soportar el citocromo o. Sin embargo, el citocromo o parece ser más adecuado para funcionar en condiciones de bajo O₂ que el citocromo a+a, (69). Las células crecidas bajo condiciones de limitación de oxígeno presentan muy bajas concentraciones de citocromo a+a, o desaparece completamente (75), lo cual es consistente con la idea de que este citocromo terminal oxidasa no es funcional en bajas concentraciones de oxígeno.

Generalmente, la expresión de citocromo a+a, y o es reprimida en los nódulos de la raíz, y en su lugar otras oxidasa son expresadas para mantener la simbiosis (21). La disminución de citocromo a+a, ha sido correlacionada con el incremento en la actividad de nitrogenasa en bacteroides de *B. japonicum* (107). Sin embargo, en un trabajo que sirve como antecedente a éste, se reporta que mutantes de *R. phaseoli*

que expresan el citocromo a+a, en condiciones microaerofílicas son más eficientes en fijar nitrógeno (75, 79) Sin embargo la actividad de las terminales oxidasa citocromo a+a, citocromo d y citocromo o no ha sido demostrada en nódulos (75). Mutantes de *B. japonicum* deficientes en el citocromo a+a, son capaces de producir nódulos efectivos (59).

Los bacteroides de *B. japonicum* expresan citocromos c₅₅₂, P₄₂₀ y P₄₅₀, todos estos reaccionan con el monóxido de carbono, por lo que pudiera tratar de posibles oxidasa (88). Los bacteroides de *B. sp. (lupinus)* también expresan citocromo P₄₅₀ (108) al igual que *R. leguminosarum* *bv. vicia* (63). Los bacteroides de *B. japonicum* también contienen componentes sin grupo hemo, los cuales tienen una alta actividad de citocromo c oxidasa. Esta actividad es sensible a la atebrina, al cianuro y otros agentes metaloquelantes, pero no lo es al monóxido de carbono. Esta actividad puede ser parcialmente restaurada por FAD o FMN, lo cual sugiere que la oxidasa puede ser una flavoproteína (63).

El control de síntesis de ATP por oxígeno en los organismos fijadores de nitrógeno se ha explicado en términos de la existencia de un sistema respiratorio ramificado, con un ramal que tiene una oxidasa más afín por el oxígeno y otra ineficiente o menos afín por el oxígeno (109). En altas concentraciones de oxígeno (más de 1micromolar) la respiración de los bacteroides de *B. japonicum* esta desacoplada para la síntesis de ATP (109). Por lo que se ha propuesto que el transporte de electrones desacoplado funciona como "protección respiratoria" manteniendo baja la concentración intracelular de oxígeno para impedir la inactivación

de la nitrogenasa causada por este gas.

En la figura 4 se ilustra las posibles vías de respiración en el bacterioide de *Rhizobium*.

NITROGENASA.

La nitrogenasa es la enzima que cataliza la reducción del N_2 a NH_3 . Esta formada por dos componentes (110). El componente I o proteína Fe-Mo, tiene un peso molecular de 200,000 daltones y esta formada por dos tipos de polipéptidos que forman un tetrámero; Este componente contiene uno o dos átomos de molibdeno y de veinte a treinta átomos de hierro.

El componente II de la nitrogenasa es reducida por algún donador de electrones (ferrodoxinas, flavodoxinas, NADPH). En el estado reducido forma un complejo con Mg-ATP, lo que provoca un cambio conformacional que permite la interacción con el componente I y la transferencia de un par de electrones a este componente; este proceso está ligado a la hidrólisis de ATP. La proteína I reducida cataliza la reducción de N_2 . Así la reducción de nitrógeno molecular se lleva a cabo dando como productos NH_3 y H_2 (111). Los dos componentes de la nitrogenasa son sensibles al oxígeno (80). El componente II es más sensible que el componente I. A pesar de la sensibilidad de la nitrogenasa al oxígeno, la capacidad de fijar nitrógeno se ha encontrado en microorganismos que son aeróbicos estrictos (112). Esto implica el desarrollo de diferentes estrategias que permiten la protección de la nitrogenasa del

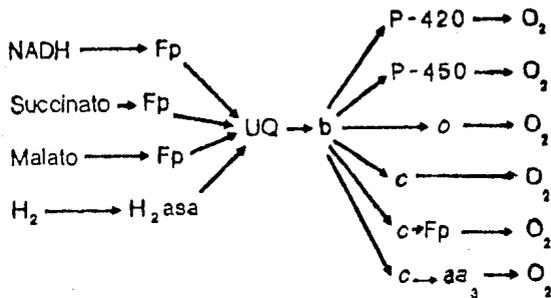


FIGURA 4. Esquema de las posibles vías de respiración en el bacteroide de *Rhizobium*.

oxígeno o bien de nitrogenasas insensibles a este gas (80).

PROTECCION DE LA NITROGENASA DEL OXIGENO DURANTE LA FIJACION SIMBIOTICA DE NITROGENO.

Existen diferentes estrategias reportadas para proteger a la nitrogenasa de su inhibición por oxígeno durante la simbiosis:

1) Leghemoglobina. La leghemoglobina es una hemoproteína, de tipo globina, involucrada en el proceso de fijación simbiótica de nitrógeno, que se encuentra en los nódulos de la raíz de las leguminosas (57). Esta proteína es de gran importancia para el proceso de la fijación simbiótica de nitrógeno, dado que controla la concentración de oxígeno en el nódulo, evitando de esta forma que la enzima nitrogenasa sea inactivada por este gas. *Rhizobium* es un microorganismo aerobio estricto, por lo tanto requiere de oxígeno para obtener la energía necesaria para su metabolismo; así la leghemoglobina une oxígeno reversiblemente con gran afinidad, difundiéndolo a los bacteroides, con un flujo que permite el funcionamiento del metabolismo aeróbico y al mismo tiempo mantiene la concentración de oxígeno lo suficientemente baja para que la nitrogenasa no sea dañada. Se sabe que es la más abundante de las proteínas dentro del nódulo: constituye hasta el 25% de la proteína soluble total del nódulo maduro, dándole su característico color rosa. La apoproteína de la leghemoglobina es un producto de la planta, mientras que el grupo prostético hemo es sintetizado por el bacteroide (113).

2) BARRERA DE DIFUSION DE O₂. La existencia de una barrera contra la difusión de O₂ en el interior del nódulo se ha estudiado utilizando microelectrodos de oxígeno, con los cuales se demostró que la concentración interna de oxígeno en el nódulo se regula en respuesta a la concentración externa de O₂ (114), sin que ocurran cambios en la respiración (115). Se ha propuesto que la barrera se localiza en la corteza nodular que rodea a las células infectadas (116). También se ha sugerido que esta barrera consiste de una capa de células con espacios intracelulares (117).

3) PROTECCION RESPIRATORIA. El mecanismo de protección respiratoria en organismos fijadores de nitrógeno se reportó inicialmente en *Azotobacter vinelandii*, en donde se ha reconocido el papel central del sistema respiratorio sobre el proceso de la fijación, (60). El sistema respiratorio aporta la energía para la síntesis de ATP necesario, además de la protección de la nitrogenasa contra el efecto dañino del oxígeno. Esto se propuso cuando se reportó que *A. vinelandii* consume más carbono del que se requiere para satisfacer sus necesidades energéticas y de crecimiento, cuando se cultiva en altas tensiones de O₂ y en ausencia de nitrógeno (61). Cuando *A. vinelandii* se cultiva en estas condiciones su capacidad respiratoria aumenta de manera considerable y este aumento en la respiración no está acoplado a la síntesis de ATP (118). El citocromo d tiene un papel preponderante. Esta enzima funciona de manera desacoplada permitiendo el consumo de oxígeno rápido, de hecho, la actividad del citocromo d en *A. vinelandii* le permite a esta bacteria tener la más alta tasa respiratoria reportada (61).

En diferentes especies de *Rhizobium* existe evidencia que sugiere la existencia de protección respiratoria. Los bacteroides de *B. japonicum* tienen dos sistemas de oxidasa de diferente afinidad por el oxígeno, pero solo el de alta afinidad parece estar acoplado eficientemente a la síntesis de ATP (118). Por otra parte, *Rhizobium spp* el cual es capaz de fijar nitrógeno en vida libre, aumenta su respiración en tensiones altas de oxígeno (61). Con base a estos resultados se propuso que el sistema de baja afinidad puede funcionar como un sistema de protección similar al reportado para *A. vinelandii*.

ANTECEDENTES.

El análisis comparativo de los citocromos presentes en *Bradyrhizobium japonicum*, en vida libre y en bacteroides indicó que este organismo utiliza diferentes oxidasas terminales en cada una de estas condiciones, además de poseer una cadena respiratoria ramificada. Los citocromos de tipo aa₃ y o son las oxidasas terminales utilizadas en aerobiosis. En los bacteroides de *Rhizobium* el citocromo o y el citocromo a+a₃ desaparecen y en su lugar aparecen las hemoproteínas C₅₅₂, C₅₅₄, P₄₅₀, P₄₂₈, y P₄₂₀. Estas proteínas pudieran ser parte de una o varias oxidasas terminales con alta afinidad por oxígeno. Los electrones son generados a partir de la poza de ubiquinol y se transfieren a las oxidasas terminales a través de citocromos intermedios (57). Sin embargo, a pesar de estos análisis, no existe evidencia funcional de la participación de los diferentes citocromos durante la respiración en altas o bajas tensiones de oxígeno. Además se desconoce la secuencia de los pasos en la transferencia de electrones a lo largo de la cadena respiratoria.

Para demostrar la participación de varios citocromos en diferentes ramas de la cadena respiratoria y para establecer los pasos secuenciales de la transferencia de electrones, las mutantes con lesiones definidas en componentes individuales han sido de gran utilidad.

Hennecke y colaboradores (35) han establecido una serie de predicciones con respecto a la composición y utilización de la cadena respiratoria en *Bradyrhizobium japonicum* mediante el estudio de diversas mutantes. Al describir los genes *fbcF* y *fbcH* que codifican para la proteína hierro-azufre (*fbcF*) y para el citocromo b y c, del complejo bc, (*fbcH*); observaron que mutaciones en el gene *fbcH* presentaban fenotipo Fix⁻, de aquí se concluyó que el complejo bc, es esencial para el establecimiento de una simbiosis efectiva.

O'Brian y colaboradores (8) demostraron que mutantes inducidas por una inserción de Tn5 en *B. japonicum*, que carecen de citocromo a+a, son fenotípicamente Fix⁻.

Bott y colaboradores (1) describieron el aislamiento de dos mutantes de *B. japonicum* con fenotipo negativo para citocromo c aisladas por su incapacidad de oxidar el colorante TMPD. Experimentos de tinción de grupo hemo tipo c se demostró que una de ellas carecía de un citocromo c membranar de 20 K pero sí presentaba la tinción del citocromo c, correspondiente al complejo bc,. Este citocromo c membranar de 20 K se ha involucrado en el transporte de electrones del complejo bc, a la oxidasa a+a. Un dato adicional que ha ayudado a describir la composición de la cadena de electrones de *B. japonicum* fueron los experimento realizados por Thöny-Meyer quien al realizar experimentos de tinción de grupos hemo tipo c en membranas de bacteroides de *B. japonicum* observó que el citocromo c membranar de 20 K era drásticamente reducido, mientras que el citocromo c, (del complejo bc,) estaba en niveles similares a

los observados en células de crecimiento aeróbico. Este conjunto de evidencias han llevado a la proposición de la ramificación de la cadena de transporte de electrones de *B. japonicum* a nivel del complejo bc₁. Este estudio, basado en el análisis de mutantes han llevado a construir el esquema de la figura 5 donde se muestra la cadena respiratoria de *B. japonicum*.

Estos antecedentes de análisis de mutantes en otras especies de *Rhizobium* ha servido a varios investigadores para adentrarse a la elucidación del papel de la respiración bacteriana en la fijación de nitrógeno. El antecedente fundamental de este trabajo lo constituye el trabajo desarrollado por el Dr. Mario Soberón durante su Doctorado.

Este trabajo consistió en determinar la composición de citocromos de la cadena de transporte de electrones de la cepa silvestre CE3 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (75), y en el aislamiento de mutantes con alteraciones en la expresión de los citocromos y en la fijación de nitrógeno.

Los cultivos de células de esta bacteria crecida en medio rico contienen citocromos de tipo b y c y dos oxidasas terminales: los citocromos o y a+a. El citocromo a+a, se expresa parcialmente cuando las células se cultivan en medio mínimo y durante la simbiosis. La composición del sistema respiratorio de *R. phaseoli* es muy parecida a las cadenas respiratorias reportadas en otras especies de *Rhizobium* (2, 68). Recientemente reportaron además la presencia de citocromo d en células de vida libre de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* y un componente

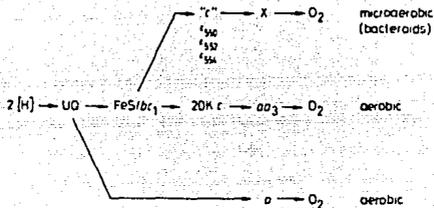


FIGURA 5. Esquema propuesto por Hennecke y cols. de las vías de respiración de *Bradyrhizobium japonicum*.

(no citocromo) capaz de reaccionar con el oxígeno, el cual puede sugerirse como flavoproteína. Esta enzima parece ser exclusiva del crecimiento aeróbico. (17). En la figura 4 se muestra los esquemas propuestos para el transporte de electrones de *R. leguminosarum* *bv. phaseoli*.

En los trabajos mencionados (75, 79) se reportó el aislamiento y caracterización de cinco mutantes con alteraciones en la cadena respiratoria. Estas mutantes se identificaron por su capacidad de oxidar el colorante N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilenediamina (TMPD). Este colorante es oxidado por la cadena respiratoria a nivel de citocromos c y a+a₃, ya que una mutante que carece de ambos citocromos o solo del citocromo a+a₃, no puede oxidar TMPD. (79). Las mutantes fueron aisladas después de tratamientos mutagénicos utilizando nitrosoguanidina o el transposón Tn5, seleccionando solamente aquellas células alteradas en su capacidad de oxidar el colorante TMPD: TMPD⁺ ó TMPD⁻.

Dos mutantes son muy importantes como antecedentes a este trabajo, éstas son las cepas **CFN031** y **CFN037**, ambas fueron aisladas por su capacidad incrementada de oxidar el colorante TMPD (TMPD⁺). Ambas mutantes tienen reprimida la expresión del citocromo a+a₃, en microaerofilia.

Análisis espectrofotométricos mostraron que la cepa **CFN031** carece de la señal característica del citocromo **g** y que la cepa **CFN037** tiene niveles incrementados de citocromo **a+a**. La cepa **CFN031** produce nódulos inefectivos (**Fix'**) con marcadas deficiencias en división celular dentro del nódulo, mientras que la mutante **CFN037** presentó un fenotipo con incrementada capacidad de fijación de nitrógeno (**Fix****).

OBJETIVO

La respiración es central en la fijación simbiótica de nitrógeno; la respiración acoplada a la fosforilación oxidativa proporciona el poder reductor y energético necesarios para la reacción de fijación de nitrógeno (63). La respiración puede funcionar como un mecanismo que regula la concentración de O_2 , evitando la inactivación de la nitrogenasa (3). Esta relación tan estrecha entre dos procesos permite incidir en un proceso incidiendo en el otro.

El aislamiento de mutantes respiratorias de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* ha permitido comenzar el estudio para establecer el papel de los diferentes componentes de la cadena respiratoria en los procesos de respiración y fijación de nitrógeno.

El estudio de las cepas mutantes **CFN037** y **CFN4205** que fueron aisladas por su capacidad de inducir el citocromo a+a, en microaerofilia presentaron un fenotipo de actividad incrementada en la fijación de nitrógeno en nódulos inmaduros. El nivel de fijación de nitrógeno en nódulos maduros es el mismo en la cepa silvestre que en ambas cepas; sin embargo existe un aumento del 30% en la cantidad de nitrógeno total fijado en plantas inoculadas con las cepas **CFN037** y **CFN4205**. En este par de mutantes, aunque expresan en microaerofilia a la oxidasa aeróbica a+a, las oxidasas

terminales alternas (citocromo o y d) mantienen los niveles de la cepa silvestre. El citocromo a+a, es un sitio generador de fuerza protomotriz esencial para la síntesis de ATP, lo que hace pensar que posiblemente bacteroides de estas cepas poseen mayor cantidad de ATP disponible y esto explique su fenotipo de capacidad incrementada de fijación de nitrógeno (Fix^{**}). Sin embargo el aumento en fijación observado se puede deber también a una menor tensión de oxígeno evitando la inactivación de la nitrogenasa.

Por otra parte, la mutante **CFN031** con niveles bajos de citocromo o tiene un fenotipo simbiótico deficiente en su capacidad de fijar nitrógeno (Fix') lo que sugiere que esta terminal oxidasa alterna juega un papel importante en el proceso de fijación. Esta mutante, al igual que la cepas **CFN037** y **CFN4205** induce la expresión de citocromo a+a, en microaerofilia. El citocromo o difiere de la oxidasa terminal a+a, en su afinidad por oxígeno; El citocromo o no es un sitio de conservación de energía, lo que sugiere que el citocromo a+a, por sí solo no es suficiente para establecer una simbiosis efectiva y que citocromos con mayor afinidad por oxígeno pudieran tener un papel determinante en la protección de la nitrogenasa a este gas.

La pregunta que pretendemos contestar en este trabajo es ¿Qué efecto habrá sobre la fijación de nitrógeno si se derreprimen las oxidasas alternas, que tienen mayor afinidad por O₂, que la oxidasa a+a?. Como mencioné anteriormente, el fenotipo de la cepa **CFN031** (citocromo o) es Fix', y por otro lado estas oxidasas pudieran jugar un papel determinante en la protección respiratoria de la nitrogenasa.

La estrategia que decidimos utilizar para contestar la pregunta anterior fue el aislamiento de mutantes de *R. leguminosarum* *bv. phaseoli* que sobreexpresen las oxidasas alternas y analizar su fenotipo simbiótico. Por otro lado, esta estrategia nos permitirá identificar genes que estén involucrados con la regulación de las oxidasas terminales. Esto es importante en el diseño de cepas con un contenido de citocromos tal que la fijación de nitrógeno sea más eficiente.

MATERIAL Y METODOS.

CEPAS Y PLASMIDOS.

En la tabla 1 se encuentran descritas las cepas y los plásmidos que se utilizaron en este trabajo.

MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

Para el crecimiento de todas las cepas de *R. leguminosarum* *bv. phaseoli* se utilizó el medio rico **PY** y el medio mínimo **MY**: **Medio Rico PY**: Peptona de caseína 0.5%, Extracto de levadura 0.3%, CaCl_2 7mM. **Medio Mínimo MY**.: Na_2HPO_4 $12\text{H}_2\text{O}$:10.96 g/l, KH_2PO_4 : 2.7 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$:1.0 g/l, Glucosa 2%, NH_4Cl 2.5 g/l.

Para el crecimiento de *Escherichia coli* en condiciones aeróbicas se utilizó el medio **LB**: **Medio Rico LB**: Triptona 1%, Extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, pH 7.4

Para los medios sólidos se agregó 1.5% agar bacteriológico. Las concentraciones de antibióticos utilizados fueron las siguientes: Estreptomicina (Sm) 200 $\mu\text{g/ml}$, Acido nalidixico (Nal) 30 $\mu\text{g/ml}$, Espectinomina (Sp) 100 $\mu\text{g/ml}$, Kanamicina (Km) 30 $\mu\text{g/ml}$, Rifampicina (Rif) 30 $\mu\text{g/ml}$, Tetraciclina (Tet) 20 $\mu\text{g/ml}$, Cloramfenicol (Cm) 50 $\mu\text{g/ml}$, Ampicilina (Ap) 200 $\mu\text{g/ml}$.

Los cultivos en medio líquido de *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* fueron realizados diluyendo 30 veces en medio PY un inóculo de un crecimiento de 12 horas; El cultivo (1000 ml) fue agitado a 250 rpm por 18 hrs a 30°C. Los cultivos en microarofilia de *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* fueron realizados diluyendo 10 veces en medio PY un inóculo de un crecimiento de 12 horas (500 ml de PY, que previamente había sido inoculado con una dilución 1/40 de un cultivo de 12hrs agitado a 250rpm) e incubado (5 litros de PY) sin agitación 48 horas a 30°C.

Los cultivos en medio líquido de *Escherichia coli* (100ml) se agitaron a 250 rpm a 37°C.

Los cultivos en medio sólido fueron incubados hasta observar colonias aisladas (aproximadamente 3 días para *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* y de 18 a 24 hrs para *Escherichia coli*). Las temperaturas de incubación fueron 30°C para *R. leguminosarum* *bv. phaseoli* y 37°C para *E. coli*.

CONJUGACIONES

Las conjugaciones se hicieron sobre PY sólido mezclando una relación de células receptoras/donadoras de 5-10/1. La mezcla se recuperó en MgSO₄ 10mM después de un mínimo de 16 horas de incubación a 30°C para posteriormente platear las diluciones adecuadas en los medios selectivos.

MUTAGENESIS CON Tn5 Y AISLAMIENTO DE MUTANTES

El plásmido "suicida" (por no tener origen de replicación en *R. leguminosarum* *bv. phaseoli*) **pSUP5011**, el cual lleva consigo al transposón **Tn5** mob fue transferido de la cepa **S17** a la cepa silvestre **CE3** por conjugación. Se plateó en el medio **MY Km** suplementado con 10µg de Azida de sodio.

EXTRACTOS CELULARES Y ACTIVIDADES RESPIRATORIAS

Después de crecer un cultivo en las condiciones deseadas, las células fueron colectadas por centrifugación y lavadas con buffer **TCM** (Tris-HCl 50mM + CaCl₂ 5mM) y resuspendidas en el mismo buffer a una concentración final de 30% (peso/volumen). La suspensión de células fue sonicada 6 periodos de 30 segundos cada uno con intervalos de un minuto para evitar el calentamiento de la suspensión. El proceso de sonicación se llevó a cabo en un sonicador MSE a una magnitud de 14 micrones.

La respiración endógena fue determinada en células enteras a 30°C en un oxímetro (yellow springs instruments Co.), la reacción fue determinada en una cubeta conteniendo 3ml de buffer fosfato (Fosfato de potasio 50mM, pH 7.4 excepto para la determinación de TMPD oxidasa que fue a pH 6.8) y el extracto celular (1.5µg de proteína); la reacción se inició por la adición de 5.5mM de succinato o 5.5mM de NADH o 10mM de Ascorbato-TMPD como donadores de electrones.

Los cultivos en medio líquido de *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* fueron realizados diluyendo 30 veces en medio PY un inóculo de un crecimiento de 12 horas; El cultivo (1000 ml) fue agitado a 250 rpm por 18 hrs a 30°C. Los cultivos en microarofilia de *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* fueron realizados diluyendo 10 veces en medio PY un inóculo de un crecimiento de 12 horas (500 ml de PY, que previamente había sido inoculado con una dilución 1/40 de un cultivo de 12hrs agitado a 250rpm) e incubado (5 litros de PY) sin agitación 48 horas a 30°C.

Los cultivos en medio líquido de *Escherichia coli* (100ml) se agitaron a 250 rpm a 37°C.

Los cultivos en medio sólido fueron incubados hasta observar colonias aisladas (aproximadamente 3 días para *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* y de 18 a 24 hrs para *Escherichia coli*). Las temperaturas de incubación fueron 30°C para *R. leguminosarum* *bv. phaseoli* y 37°C para *E. coli*.

CONJUGACIONES

Las conjugaciones se hicieron sobre PY sólido mezclando una relación de células receptoras/donadoras de 5-10/1. La mezcla se recuperó en MgSO₄ 10mM después de un mínimo de 16 horas de incubación a 30°C para posteriormente platear las diluciones adecuadas en los medios selectivos.

ANALISIS ESPECTROFOTOMETRICOS DE CITOCROMOS

Los espectros de células completas fue realizado en un espectrofotómetro SLM Aminco Midan II. Las muestras fueron resuspendidas en buffer TCM (30% peso/volumen) y reducidas adicionando unos cuantos miligramos de Ditionita. Las muestras fueron oxidadas agregando persulfato de amonio. Los espectros fueron hechos a temperatura ambiente en cubetas de 1ml; para la cuantificación de citocromos los siguientes coeficientes de extinción y picos de absorbancia característica fueron utilizados (39): citocromo $a+a_3-E_{603-630}$ $24\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$; citocromo $b-E_{560-575}$, $22\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$; citocromo $c-E_{524-544}$ $23\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y citocromo $d\text{-CO-E}_{415-430}$ $160\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

MANIPULACION DE DNA.

El aislamiento del DNA total de *R. leguminosarum* *bv. phaseoli* se realizó a partir de cultivos crecidos 24 horas a 30 °C, las células se colectaron por centrifugación y resuspendidas en buffer TE 50-20 (Tris HCL 50mM-EDTA 20mM) pH 8. La lisis se llevó a cabo por la adición de 0.5 ml de SDS al 10% en TE 50-20 y 0.5ml de Pronasa (2mg/ml en TE 10-1, predigerida 1 hr a 37°C). La incubación de lisis fue de 1 hr a 37 °C. Se redujo la viscosidad pasando de 3 a 5 veces el lisado por un jeringa; Agregando un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24-24-1) se realizaron de una a tres extracciones recuperando la fase acuosa. Después se hizo la

extracción 2 veces con solo cloroformo, a la fase se le agregó 0.25 M (concentración final) de NaCl y 2 volúmenes de etanol al 100% y se dejó a -20°C 12hrs. Se recuperó el DNA precipitado centrifugando 20 minutos a 4°C y resuspendiendo la pastilla en 0.5ml de H₂O estéril.

El DNA total fue digerido con la enzima EcoRI siguiendo las recomendaciones del proveedor. (New England Biolabs). Las digestiones fueron corridas en geles de Agarosa 1% en buffer TBE 1X (tris-boratos) (según Maniatis et. al). Las digestiones totales fueron trasferidas a filtros de nitrocelulosa CBA85 (0.45m) (Sleicher and Schuel) como lo describió Southern (1975) (119). La inserción de Tn5-mob de la cepa **CFN037** fue clonada de digestiones totales de DNA con EcoRI en el plásmido **pSUP202** previamente cortado con la misma enzima y tratado con fosfatasa alcalina, la reacción de ligación se efectuó con la enzima ligasa del bacteriófago T4. La mezcla de ligasa se incubó a 14°C por 16 hrs y fue transformada en la cepa **HB101** por el método de cloruro de calcio y las colonias que tuvieron los marcadores Km^r y Tc^r fueron seleccionadas. El plásmido resultante (**pLR01**) fue usado como sonda detectora en los experimentos tipo southern, para ello, la técnica de marcaje "nick translation" fue utilizada. Este trabajo de aislamiento del fragmento con la inserción de Tn5 de la cepa **CFN037** fue realizado por la Técnica Académica del laboratorio Bióloga Laura Rodríguez quien amablemente me facilitó el fragmento.

DETERMINACION DE LA FIJACION DE NITROGENO

Para las pruebas de nodulación y la medición de reducción de acetileno *Phaseolus vulgaris* cv. *negro jamapa* fue esterilizado con hipoclorito y puesto a germinar en condiciones estériles. Las semillas germinadas de tres días fueron transferidas a macetas de plástico conteniendo vermiculita (medio de crecimiento sin nitrógeno); las plantas fueron inoculadas con una suspensión de bacterias en PY y crecidas en un invernadero. A diferentes días después de la inoculación, la fijación de nitrógeno fue medida al medir la reducción de acetileno de raíces noduladas transferidas a frascos cerrados inyectando acetileno a una concentración final de 10% de la fase gaseosa. La producción de etileno fue determinada por un cromatógrafo de gases Packard modelo 430.

El porcentaje de contenido de nitrógeno fue estimado en homogenizados secos de plantas determinado por un detector de nitrógeno Antek 720.

DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE PROTEINA

Se determinó según el método de Markwell (75). usando suero de albúmina como estándar.

TABLA 1

CEPA	CARACTERISTICAS	REFERENCIA O PROCEDENCIA
<i>R. Leguminosarum</i> <i>bv. phaseoli</i>		
CFN42	Cepa silvestre	(120)
CE3	Sm ^r derivada de la cepa CFN42 Nod ^r Fix ^r en frijol.	(120)
CE2	Rif derivada de CFN42	(120)
CFN037	TMPD ^r Tn5-mob mutante derivada de CE3 .	(79)
CFN031	TMPD ^r Tn5-mob cyt <u>o</u>	(79)
CFN030	AZ ^r Tn5-mob mutante derivada de CE3	Este trabajo.
<i>Escherichia coli</i> .		
HB101	F hsdS, hsdM, pro, thi, gal, lacY, recA ^r Sm ^r	(120)
PLASMIDOS.		
pJB3	R68,45 Cm ^r Ap ^r Tc ^r	(120)
pSUP202	pBR325 -mob	(75)
pSUP5011	pBR325 Tn5-mob	(120)
pLR01	Fragmento EcoRI de 14 Kb Tn5-mob de la cepa CFN037 clonado en pSUP202	Biól. Laura Rodríguez

DOMINGO FOR L. C. D. - B. C.

RESULTADOS

Se ha encontrado que existe en *Escherichia coli* una relación entre la expresión del citocromo d y la resistencia a inhibidores de la respiración como KCN o azida de sodio (14). Se han identificado mutantes *cyd'* en *Escherichia coli* por su sensibilidad a Azida de Sodio; La utilización de CN es difícil de manipular, debido a que las características químicas que posee lo hacen muy volátil y la presión de selección no es constante.

Nuestro objetivo inicial fue obtener cepas de *R. leguminosarum* *bv. phaseoli* que resistieran al inhibidor azida de sodio, para lo cual se realizó una mutagénesis al azar utilizando el transposón Tn5.

Después de la mutagénesis con Tn5 (ver material y métodos) de la cepa silvestre **CE3** se identificaron 8 mutantes que mostraban un fenotipo reproducible de resistencia a azida de sodio mayor que la cepa silvestre, sin embargo diferían en el rango de resistencia al inhibidor. Se determinó el número de inserciones del transposón Tn5 en cada una de las mutantes mediante la técnica de Southern utilizando un fragmento del transposón como sonda. Este experimento dió como resultado que todas las cepas mutantes contenían sólo una inserción del transposón; sin embargo todas las inserciones de las mutantes diferían de peso molecular, lo que indica que se habían insertado en fragmentos diferentes. La explicación a este fenómeno pudiera ser la existencia de ocho genes involucrados en otorgar el fenotipo Az' o que las inserciones de Tn5 no fueran responsables del fenotipo Az'. En *E. coli* el

90% de las mutantes aisladas por su capacidad de resistir al inhibidor azida de sodio son mutaciones puntuales que mapean en el gene *sec A*, que codifica para una proteína con actividad de ATPasa y que esta involucrada con la secreción de las proteínas al exterior celular (112). Para evitar estas mutantes, escogimos aquellas que claramente tuvieran ligado el fenotipo de resistencia a Azida de sodio con la presencia del transposón (resistencia a Km).

Para ello, el plásmido **pJB3** fue introducido en las mutantes; este plásmido contiene las funciones necesarias para movilizar las secuencia *mob* en el Tn5 (120). Después las cepas mutantes conteniendo el plásmido **pJB3** se cojugaron con la cepa **CE2** (Rif) (120) y se seleccionaron en medio PY Rif Km, esperando así haber transferido la mutación al fondo genético de la cepa **CE2**, en la tabla 2 se muestran los resultados de este experimento.

TABLA 2. Resistencia a Azida de Sodio debida a la presencia del transposón Tn5 en las diferentes mutantes. (Los números indican % de colonias) (El Azida de sodio "Az" esta en $\mu\text{g/ml}$).

CEPA	PY Km Rif	PY Az 8	PY Az 10
JO1 X CE2	100	99.8	99.8
JO2 X CE2	100	0	0
JO3 X CE2	100	2	5
JO4 X CE2	100	1	1
JO5 X CE2	100	3	3
JO6 X CE2	100	12	2
JO7 X CE2	100	11	4

Como se puede observar en la tabla 2, solo una mutante (**JO1**) tiene ligada la resistencia a azida de sodio con la presencia del transposón Tn5; las otras mutantes no mostraron esta característica, lo cual sugiere otro tipo de mutación responsable de ese fenotipo. Por eso decidimos caracterizar a la mutante **JO1**, a la cual se le denominará **CFN030**.

CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LA CEPA CFN030.

Para determinar si el fenotipo Az' era debido a la expresión diferencial de algún o algunos componentes de la cadena respiratoria, la sensibilidad a CN de la respiración endógena de células de la cepa **CFN030** y de la cepa **CE3** fueron determinadas en condiciones aerobicas como en microaerofilia.

La figura 6 muestra que la respiración endógena es igualmente sensible en ambas cepas en la condición de aerobiosis, sin embargo la cepa **CFN030** muestra un componente muy sensible a CN y otro que es resistente al inhibidor cuando ambas cepas son cultivadas en condiciones microaerofílicas.

Se determinó la composición de citocromos y las actividades respiratorias de las cepas **CE3** y **CFN030** se determinaron en células cultivadas en aerobiosis y células cultivadas en microaerofilia. La figura 7A muestra espectros diferenciales reducido menos oxidado de ambas cepas en aerobiosis y en microaerofilia. El trazo 1

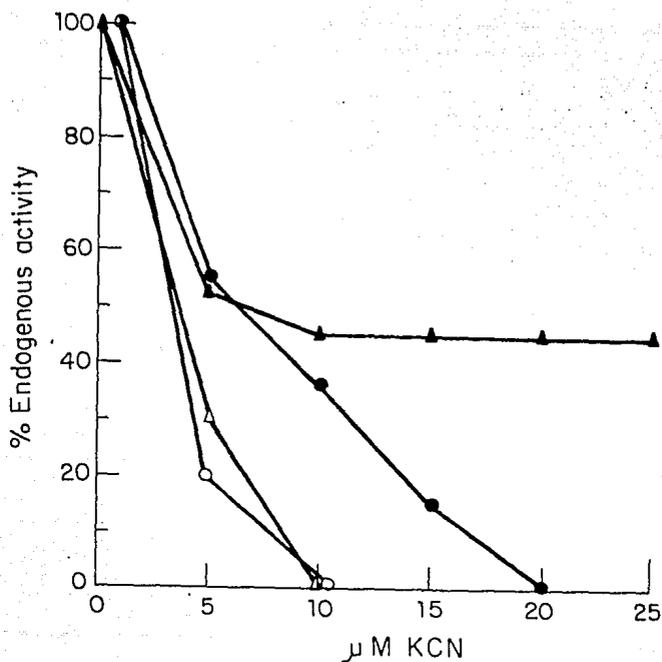


FIGURA 6. Efecto del KCN sobre la respiración endógena de las cepas CE3 (○,●) y CFN030 (△,▲), en condiciones de aerobiosis (○,△) y microaerofilia (●,▲).

corresponde a la cepa **CE3** cuando es cultivada en aerobiosis, como se observa, esta cepa expresa citocromos tipo b (picos a 430nm y 565 nm), tipos c (hombro cerca de 550nm) y citocromo tipo aa, (pico a 603nm). El trazo 3 muestra un espectro diferencial Monóxido de carbono menos reducido en la misma condición de la cepa **CE3** en donde se puede apreciar la presencia de citocromo q (pico a 416nm, hombros a 430nm y a 560nm). La cepa **CFN030** en aerobiosis muestra un patrón de citocromos similar al patrón de la cepa silvestre **CE3** (trazos 2 y 4 de la figura 7A).

La figura 7B muestra espectros realizados en la condición de microaerofilia. La cepa silvestre **CE3** no expresa citocromo aa, en esta condición y muestra también una reducción en los niveles de citocromos tipo b. (trazo 1). En el espectro CO-menos reducido de la cepa **CE3** se observa que no hay expresión de citocromo aa, (valles a 595 nm hasta 610 nm) y bajos niveles de citocromo q (valle a 567nm); En contraste la cepa **CFN030** cultivada en condiciones microaerofilicas no reprimen la expresión del citocromo aa, (hombro a 444 nm, pico a 603 nm) y tiene altos niveles de citocromos tipo b (picos 557-565 nm) (trazo 2). El espectro de monóxido de carbono revela que además de no reprimir el citocromo aa, en esta condición (valle 595 nm a 610 nm) la cepa **CFN030** expresa altos niveles de citocromo q (valles a 416 nm, 545 nm, 572 nm a 431 nm, 567 nm) y también se puede distinguir una señal característica del citocromo d (pico 634 nm a 658 nm) (Figure 7B trazo 4).

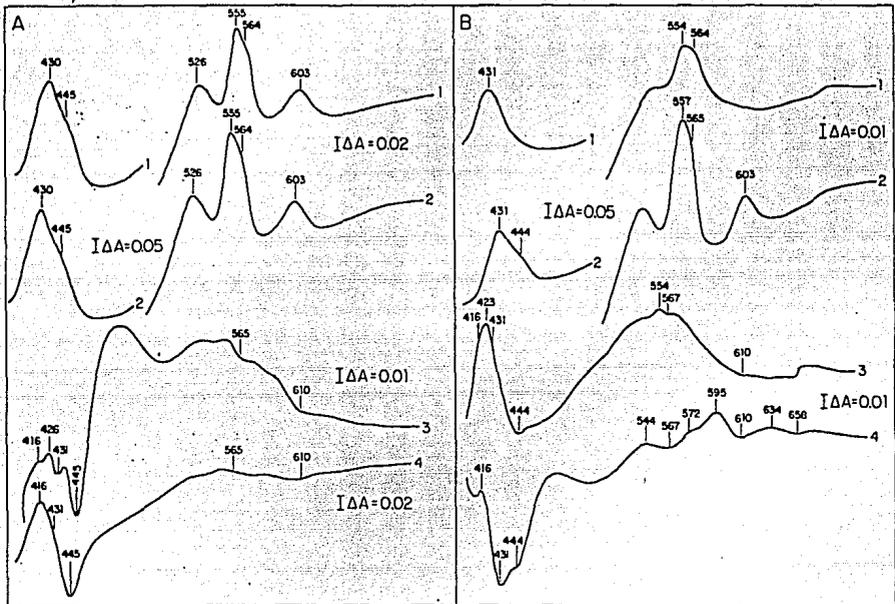


FIGURA 7. Espectros reducido-oxidado (Trazos 1,2) y de reacción con CO (Trazos 3 y 4) de las cepas CE3 y CFN030, bajo condiciones aeróbicas (panel A) y bajo condiciones de microaerofilia (Panel B). Los trazos 1 y 3 corresponden a la cepa CE3 y los trazos 2 y 4 a la cepa CFN030. (Ver texto).

La tabla 3 muestra la concentración de citocromos calculada a partir de los espectros antes mencionados :

TABLA 3. Contenido de citocromos en células completas de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* bajo diferentes condiciones de cultivo.

CEPA	Concentración de Citocromos ^a .				
	<u>b</u>	<u>c</u>	<u>aa</u> ₃	<u>o</u>	<u>d</u>
CE3 Aerobiosis	0.090	0.123	0,044	0.004	ND ^b
CE3 Microaerofilia	0.038	0.038	N.D.	0.0001	ND
CFN030 Aerobiosis	0.098	0.115	0.039	0.003	ND
CFN030 Microaerofilia	0.105	0.095	0.028	0.0133	0.010

a. Las citocromos en unidades de concentración como nanomoles por miligramo de proteína -1.

b. No detectadas. Los experimentos tienen una variación de menos de 20%.

Como se observa, cuando se cultivan en aerobiosis, ambas cepas muestran una concentración similar de citocromos tipo b y tipo c, además de dos terminales oxidasas o y a+a. Cuando la cepa **CE3** se cultiva en microaerofilia, los citocromos tipo c y tipo b son disminuídos a una tercera parte mientras que el citocromo a+a, es reprimido por completo y solo se pueden detectar trazas del citocromo o.

Por su parte la cepa **CFN030**, cuando se cultiva en microaerofilia muestra los mismos niveles de citocromo c y citocromo b que los mostrados en aerobiosis además de similares niveles de citocromo a+a, tanto en aerobiosis como en microaerofilia así como cuatro veces más de citocromo o en microaerofilia respecto a la condición aeróbica.

Con el propósito de determinar el efecto de la mutación sobre la capacidad respiratoria de la cepa **CFN030** se determinaron las actividades respiratorias (Tabla 4) de las cepa **CE3** y **CFN030**. Como se esperaba, ambas cepas muestran actividades respiratorias similares cuando se cultivan en aerobiosis, sin embargo, cuando se cultivaron en microaerofilia, la cepa **CE3** mostró tres veces menos actividad de la oxidasa Ascorbato-TMPD, lo cual se explica por la falta de citocromo a+a, en esta condición. En microaerofilia la cepa **CFN030** mostró niveles un poco incrementados de actividad de las oxidasas de succinato y NADH, además de una actividad similar de TMPD oxidasa.

TABLA 4. Actividades respiratorias en extractos celulares de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* en diferentes condiciones de cultivo.

Actividad de la oxidasa^a

CEPA	Endógena ^b	Succinato	NADH	Ascorbato-TMPD
CE3 (A)^c	39.58	79.03	85.62	184.42
CE3 (MA)^d	35.54	79.90	79.20	61.24
CFN030 (A)	43.60	64.80	79.46	134.50
CFN030 (MA)	58.71	93.50	105.70	132.71

^aLas actividades estan dadas en nanogramos-átomos de oxígeno consumido minuto⁻¹ miligramos de proteína⁻¹.

^bLas actividades fueron obtenidas a partir de células completas.

^cAerobiosis.

^dMicroaerofilia

Los resultados son el promedio de varios experimentos mostrando una variación de menos del 15%.

FENOTIPO SIMBIOTICO DE LA CEPA CFN030.

El fenotipo simbiótico de la cepa **CFN030** fue determinado inoculando tres macetas con tres plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. *negro jamapa* cada una. La cantidad de fijación de nitrógeno fue determinada por el nitrógeno total encontrado en las plantas de 34 días después de la inoculación:

TABLA 5. Nitrógeno total de plantas inoculadas con las cepas CE3 y CF030.^a

CEPA	Cantidad de nitrógeno total (mg [peso seco] ¹)
CE3	2.61 +/- 0.28 (SD) ^b
CFN030	3.25 +/- 0.24 (SD)

^a La determinación se realizó 34 días después de la inoculación.

^b Desviación estándar.

Como se observa en la tabla 5, las plantas inoculadas con la cepa mutante presentaron 25% más nitrógeno que las inoculadas con la cepa silvestre. Estas diferencias son las mismas reportadas para la cepa **CFN037** (79) previamente aislada en nuestro laboratorio, cuyo fenotipo es el de derrepresión del citocromo a+a, cuando se cultiva en microaerofilia; esta mutante presentó una actividad de nitrogenasa alta en nódulos jóvenes (79). Por ello medimos la actividad de la nitrogenasa en plantas inoculadas con las cepas **CE3** y **CFN030** a varios tiempos después de la inoculación.

Como lo muestra la figura 8, ambas cepas alcanzan el mismo nivel de actividad de nitrogenasa, sin embargo, la cepa **CFN030** alcanza el máximo de actividad 4 días antes que las plantas inoculadas con la cepa silvestre **CE3** lo cual explica el alto contenido de nitrógeno en las plantas noduladas con la cepa **CFN030**.

Dado que la cepa **CFN030** tuvo un fenotipo similar al de la cepa **CFN037** previamente aislada por inserción de Tn5, la cual también mostró una derrepresión de la actividad del citocromo a+a, en microaerofilia (79) fue importante determinar que la mutación de la cepa **CFN030** fuese diferente a la de la cepa **CFN037**.

Para ello, utilizamos el fragmento EcoRI (14Kb) que contiene la inserción de Tn5 de la cepa **CFN037** (ver métodos) como sonda para hibridizar contra DNA total digerido con la enzima EcoRI de las cepas **CFN030**, **CFN037** y **CE3**.

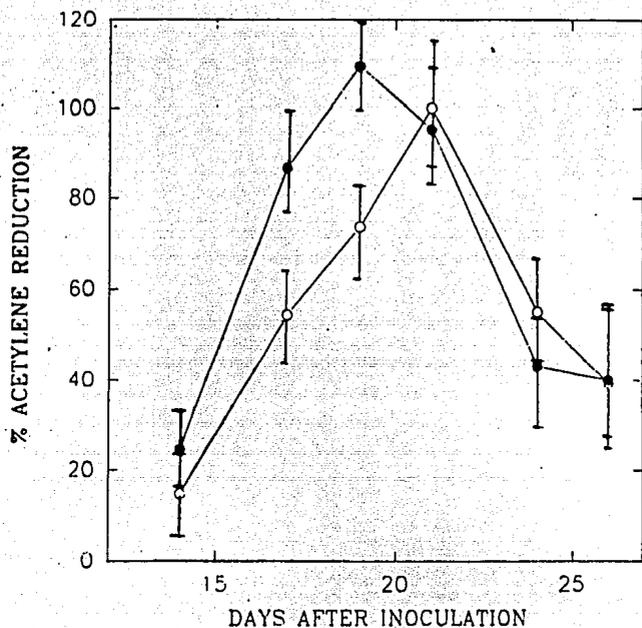


FIGURA 8. Cinética de actividades de reducción de acetileno de nódulos inoculados con las cepas CE3 (o), y CFN030 (●). Las barras indican desviación estándar de tres experimentos diferentes.

Como muestra la figura 9, la cepa **CE3** tiene solo una banda de hibridización de 6.5Kb. La cepa **CFN037** no hibridizó el fragmento de 6.5Kb pero mostró una señal de 14Kb. La cepa **CFN030** tuvo la señal de 6.5Kb y una señal de 16.4Kb. Esto indica que la mutación debida a la inserción del Tn5 en la cepa **CFN030** es diferente a la inserción Tn5 de la cepa **CFN037**.

Además la cepa **CFN037** y la cepa **CFN030** difieren en su resistencia al inhibidor azida de sodio, en su crecimiento en placa (Tabla 6). Por otra parte se determinó la sensibilidad a CN de la respiración endógena de **CFN037** y **CFN030**, y como se observa en la figura 6 la respiración endógena en condiciones aeróbicas es similar en ambas cepas, mientras que en microaerofilia la cepa **CFN037** es más sensible al inhibidor que la **CFN030**.

TABLA 6. Resistencia al inhibidor Azida de sodio de las cepas CFN030, CFN037 y CE3 en placa.

CEPA	Azida de sodio ($\mu\text{g/ml}$)				
	5	8	10	12	20
CE3	^a	^b	-	-	-
CFN037	+	-	-	-	-
CFN030	+	+	+	+/-	-

^aCrecimiento normal.

^bAusencia de crecimiento.

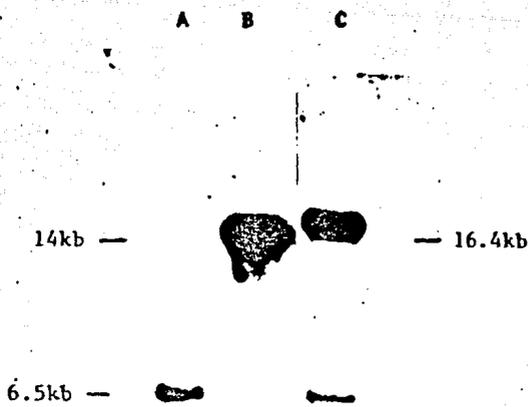


FIGURA 9. Hibridación tipo Southern de DNA total digerido con la enzima EcoRI de las cepas CE3 (carril A), CFN037 (carril B) y CFN030 (carril C), con el fragmento EcoRI-EcoRI que contiene la mutación (inserción del traspsón Tn5) de la cepa CFN037.

DISCUSION

En este trabajo se reporta el aislamiento y caracterización de una mutante (CFN030) de *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* que se obtuvo seleccionando colonias resistentes al inhibidor Azida de sodio. La mutagénesis fue hecha al azar utilizando el transposón Tn5.

En *Escherichia coli* más del 90% de la mutantes que presentan el fenotipo Az' tienen mutaciones puntuales que mapean en el gene *sec A*, el cual está involucrado en la exportación de proteínas al exterior de la célula (14). Si este fuera el caso para *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* esto explicaría los datos de la tabla 2, donde se identificó solo una mutante (CFN030) cuyo fenotipo Az' es causado por la inserción de Tn5.

La respiración endógena de la cepa CFN030 cultivada en microaerofilia es más resistente a la inhibición por CN que la cepa silvestre, esto podría explicar el fenotipo Az' de la cepa CFN030. Se pudo establecer una derrepresión de las oxidasas terminales o y a+a, en la condición de microaerofilia, así como también se observó que la cepa CFN030 tiene incrementada cuatro veces la cantidad de citocromo o cuando se cultiva en microaerofilia con respecto a la condición de aerobiosis. Los altos niveles de citocromo o pueden explicar la resistencia a CN, ya que en otras especies bacterianas se ha descrito que la respiración a través de citocromo o es más resistente a CN que la llevada a cabo a través del citocromo a+a, (18).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

El espectro de monóxido de carbono de células de la cepa **CFN030** en la condición de microaerofilia mostró una señal característica de citocromo d. Durante el desarrollo de este trabajo de investigación en todas las condiciones en las que cultivé la cepa silvestre **CE3** no observé la señal de este citocromo; Sin embargo reportes recientes (17) han demostrado la existencia de este citocromo en *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* bajo condiciones de cultivo diferentes (17). Con ello se ha establecido que esta bacteria tiene tres terminales oxidasas: o, d y a+a. Sin embargo, no se ha demostrado si el citocromo d es una terminal oxidasa funcional en *R. leguminosarum* *bv. phaseoli*. Experimentos posteriores demostraron que la cantidad de citocromo d encontrada en la cepa **CFN030** no es relevante para la resistencia de la respiración de esta cepa a CN (Mario Soberón, datos no publicados).

La cepa **CFN30** tiene una actividad incrementada de nitrogenasa, la cual parece ser es solo observada en nódulos jóvenes. Este fenotipo es similar al descrito previamente (79) para otra mutante (**CFN037**) que también derreprime la expresión del citocromo terminal oxidasa a+a, en microaerofilia. La mutante **CFN037** tiene niveles similares a los de la cepa silvestre **CE3**, de citocromo o en microaerofilia, lo que sugiere que el fenotipo de alta actividad de nitrogenasa en ambas mutantes se debe a la derrepresión del citocromo a+a.

Las posibles razones para explicar a qué se debe el fenotipo de mayor fijación de nitrógeno en nódulos inmaduros de estas mutantes puede tener varias alternativas (que no son excluyentes una con otra) y son las siguientes: 1) El ATP disponible para

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

El espectro de monóxido de carbono de células de la cepa **CFN030** en la condición de microaerofilia mostró una señal característica de citocromo d. Durante el desarrollo de este trabajo de investigación en todas las condiciones en las que cultivé la cepa silvestre **CE3** no observé la señal de este citocromo; Sin embargo reportes recientes (17) han demostrado la existencia de este citocromo en *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* bajo condiciones de cultivo diferentes (17). Con ello se ha establecido que esta bacteria tiene tres terminales oxidasas: o, d y a+a. Sin embargo, no se ha demostrado si el citocromo d es una terminal oxidasa funcional en *R. leguminosarum* *bv. phaseoli*. Experimentos posteriores demostraron que la cantidad de citocromo d encontrada en la cepa **CFN030** no es relevante para la resistencia de la respiración de esta cepa a CN (Mario Soberón, datos no publicados).

La cepa **CFN30** tiene una actividad incrementada de nitrogenasa, la cual parece ser es solo observada en nódulos jóvenes. Este fenotipo es similar al descrito previamente (79) para otra mutante (**CFN037**) que también derreprime la expresión del citocromo terminal oxidasa a+a, en microaerofilia. La mutante **CFN037** tiene niveles similares a los de la cepa silvestre **CE3**, de citocromo o en microaerofilia, lo que sugiere que el fenotipo de alta actividad de nitrogenasa en ambas mutantes se debe a la derreprésión del citocromo a+a.

Las posibles razones para explicar a qué se debe el fenotipo de mayor fijación de nitrógeno en nódulos inmaduros de estas mutantes puede tener varias alternativas (que no son excluyentes una con otra) y son las siguientes: 1)El ATP disponible para

proveer la energía requerida en el proceso de fijación de nitrógeno, ya que el citocromo a+a, es un sitio de conservación de energía y ambas tienen el fenotipo de expresión de esta terminal oxidasa en microaerofilia. 2) La baja tensión de oxígeno provocada por la expresión en grandes cantidades del citocromo o y por el citocromo a+a, 3) Ambas mutaciones afectaron el proceso de infección y por ello infectan más rápido.

El contenido de citocromos de la mutante **CFN030** sugiere la expresión de oxidasas terminales alternas no da un fenotipo acumulativo en el incremento de la capacidad de fijación de nitrógeno.

En *Escherichia coli* se han descrito dos sistemas genéticos independientes involucrados en la activación de la terminal oxidasa aeróbica (citocromo o en *E.coli*) en bajas tensiones de oxígeno. El primer sistema involucra dos genes: *arcA* y *arcB*, que pertenecen a la familia de sistemas de dos componentes "SENSOR-EFECTOR", *ArcB* es una proteína cinasa membranal y se autofosforila (conformación activa) en bajas tensiones de oxígeno o en condiciones en las que se ve afectada la cadena de transporte de electrones para transmitir la señal a *ArcA* (fosforilándola) que es una proteína citoplásmica. *ArcA* tiene sitios de unión a DNA. Cuando es mutado alguno de estos genes, los niveles de citocromo o se elevan considerablemente en condiciones microaerofílicas (74). En estas mutantes (*arcA* o *arcB*) la expresión de la oxidasa de microaerofilia (citocromo d en *E. coli*) se reduce dos veces al cultivar la bacteria en bajas tensiones de oxígeno con respecto al cultivo aeróbico (74). El sistema *arc* tiene que ver con la regulación general de genes que son necesarios bajo condiciones

aerobicas (74). El segundo sistema es el gene *fnr*, el cual en *E. coli* es necesario para la derrepresión de genes necesarios en anaerobiosis (74). La tensión de oxígeno es la señal a la que responde FNR producto del gene *fnr*. Mutantes en este gene tienen altos niveles de citocromo o y tres veces incrementada la expresión de citocromo d en microaerofilia (77).

Estos fenotipos *Arc* y *Fnr* podrían relacionarse a el de las mutantes **CFN037** y **CFN030** respectivamente, ya que en *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* la oxidasa de aerobiosis es el citocromo a+a₃; en el caso de la mutante **CFN037** en la condición de microaerofilia esta oxidasa es expresada a diferencia de la cepa silvestre. Además en esta mutante, la expresión de las oxidasas terminales de bajas tensiones de oxígeno (Citocromos d y o) no son expresadas en forma significativa.

Por otra parte la mutante **CFN030** tiene un fenotipo similar al descrito para las mutantes *fnr* ya que en microaerofilia expresa la terminal oxidasa aeróbica (citocromo a+a₃) y las consideradas oxidasas de bajas tensiones de oxígeno (citocromo o y d) son expresadas a niveles incrementados en microaerofilia. Sin embargo, el hecho de que ambas cepas puedan crecer en presencia de NO₃ como aceptor de electrones indica que ninguna de ellas es una mutante tipo *fnr*.

Será muy importante determinar mediante el análisis de estas mutaciones si existe un sistema global de regulación en *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* similar al que existe en *E. coli*. Para ello nos proponemos a realizar experimentos tipo Southern usando como sonda los fragmentos que contienen a los genes *arcB*, *arcA* y

fnr. Además de la secuenciación de dicha mutación aportará datos de homología con proteínas de otros sistemas bacterianos.

Se realizó una análisis comparativo de la secuencia nucleotídica reportada para los genes *arcA* y *arcB* en el GENBANK (versión marzo 1990). Hasta esa fecha no había sido reportada alguna secuencia significativamente homóloga en el género *Rhizobia*.

En los objetivos de este trabajo se mencionó que mutaciones que afectaban a la oxidasa terminal aerobia, citocromo *a+a*, presentaban un fenotipo de incrementada fijación de nitrógeno, estas mutaciones no afectaban la expresión de las demás oxidasas terminales. En la mutante **CFN030** esta característica la presenta, pero además tiene sobreexpresada la oxidasa terminal *o* y parece no haber efecto acumulativo al tener esta mutación. Sería de gran utilidad poder identificar dobles mutantes a partir de la **CFN030** que carecieran de expresión de *a+a*. Así se podría establecer la capacidad del citocromo *o* para mantener la fijación de nitrógeno. Por otro lado la identificación de este gene afectado nos ayudará a establecer los mecanismos de regulación de la expresión de los citocromos terminales oxidasas de *R. leguminosarum* *bv. phaseoli*.

REFERENCIAS

- 1.- Bott, M., Bolliger, M. and Hennecke, H. (1990), *Molecular Microbiology* **4**(12), 2147-2157.
- 2.- Appleby, C. A. (1969a), *Biochim Biophys Acta* **172**: 71-87.
- 3.- Daniel, R. M., and Appleby, C. A. (1972), *Biochim Biophys Acta* **275**: 347-354.
- 4.- Ludwig, B. (1987), *FEMS Microbiol Rev* **46**: 41-56.
- 5.- Müller, M., Schläpfer, B., and Azzi, A. (1988), *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 6647-6651.
- 6.- Nautiyat, C. S., van Berkum, P., Sadowsky, M. J., and Keister, D. L. (1989), *Plant Physiol* **90**: 553-559.
- 7.- O'Brian, M. R., and Maier, R. J. (1987), *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 3219-3223.
- 8.- O'Brian, M. R., and Maier, R. J. (1989), *Biochim Biophys Acta* **974**: 229-246.
- 9.- O'Brian, M. R., Kirshbom, P. M., and Maier, R. J. (1987), *J Bacteriol* **169**: 1089-1094.
- 10.- Poole, R. K. (1988), London Academic Press, pp. 231-191.
- 11.- Sambrook, J., Fritsch, E. f., and Maniatis, T. (1989), New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 12.- Simon, R., Priefer, U., and Pühler, A. (1983), Heidelberg: Springer Verlag, pp. 98-106.
- 13.- Thöny-Meyer, L., Stax, D., and Hennecke, H. (1989), *Cell* **5**: 683-697.
- 14.- Oliver, D. B., Cabelli, R. J., Dolan, K. M., and Jarosik, G. P., (1990), *Proc Natl Acad Sci USA* Vol. **87**, pp. 8227-8231.
- 15.- Cotter, P. A., Chepuri V., Gennis, R.B., and Gunsalus, R. P. (1990), *J. Bacteriol.*, Vol. 172, p. 6333-6338.
- 16.- Kelly, M. J. S., Poole, R. K., Yates, M. G., and Kennedy, C. (1990), *J. Bacteriol.*, Vol. 172, p. 6010-6019.
- 17.- Barquera, B., Garcia-Horsman, A., and Escamilla, J. E. (1991), *Arch Microbiol.*, p. 1-6.
- 18.- Iuchi, S., Chepuri, V., Fu, H. A., Gennis, R. B., and Lin, E. C. C. (1990), *J. Bacteriol.*, Vol. 172, p. 6020-6025.
- 19.- Ramseier, T. M., Winteler, H. V., and Hennecke, H. (1991), *J. Biol. Chem.*, Vol. 266, pp. 7793-7803.
- 20.- Thöny-Meyer, L., James, and Hennecke, H. (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 88, pp. 5001-5005.

- 21.- Fu, H-A., Iuchi, S., and Lin E.C.C. (1991), *Mol Gen Genet* **226**: 209-213.
- 22.- Anraku, Y., Gennis R. B. (1987), *Trends Biochem Sci* **12**: 262-266.
- 23.- Georgiou, C. D., Dueweke, T. J., Gennis, R. B. (1988), *J. Bacteriol* **170**: 961-966.
- 24.- Iuchi, S., Lin E. C. C., (1988), *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **85**: 1888-1892.
- 25.- Iuchi, S., Kuritzkes, D. R., Lin, E. C. C. (1986), *J. Bacteriol* **168**: 1415-1421.
- 26.- Iuchi, S., Chepuri, V., Fu, H-A., Gennis, R. B., Lin E. C. C. (1990a), *J. Bacteriol* **172**: 6020-6025.
- 27.- Iuchi, S., Matsuda, Z., Fujiwara, T., Lin, E. C. C. (1990b), *Mol Microbiol* **4**: 715-727.
- 28.- Jones, H. M., Gunsalus, R. P. (1987), *J. Bacteriol* **169**: 3340-3349.
- 29.- Lambden, P. R., Guest, J. R. (1976), *J. Gen Microbiol* **97**: 145-160.
- 30.- Rice, C. W., Hempfling, W. P. (1978), *J. Bacteriol* **134**: 115-124.
- 31.- Spiro, S., Guest, J. R. (1987), *Mol Microbiol* **1**: 53-58.
- 32.- Trageser, M., Uden, G. (1989), *Mol Microbiol* **3**: 593-599.
- 33.- Poole, R. K., in C. Anthony ed., *Bacterial Cytochrome Oxidases in Energy Transduction in Bacteria*, C. C. Anthony ed. Academic Press London. **En prensa**.
- 34.- Kurowski, B., Ludwig, B. (1987), *J. Biol. Chem.* **262**: 13805-13811.
- 35.- Hennecke, H., Meyer, L., Göttfert, M., and Fisher, H-M. (1988) In *Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. Rafael Palacios and Desh Pal-Verna eds. APS press.
- 36.- Yang, T. (1982). *Eur. J. Biochem.* **121**: 335-341.
- 37.- Laszlo, D. J., Fandrich, B. L., Sivaram, A., Chance, B., Taylor, B. L. (1984), *J. Bacteriol* **159**: 663-667.
- 38.- Peschek, G. A. (1981), *Biochem Biophys Acta* **635**: 470-475.
- 39.- Poole, R. K. (1983), *Biochim. Biophys. Acta.* **726**: 205-243.
- 40.- Poole, R. F. (1981), *F E B S Lett* **133**, 255-259.
- 41.- Yoshida, T., and Fee, J. A. (1985), *J. Inorg Biochem* **23**: 279-288.
- 42.- Poole, R. K., Chance, B., *J. Gen. Microbiol* **26**: 277-287.
- 43.- De Maio, R. A., Webster, D. A., and Chance, B. (1983), *J. Biol. Chem.* **258**: 13768-13771.

- 44.- Williams, H. D., and Poole, R. K. (1987), *J. Gen. Microbiol* **133**: 2461-2472.
- 45.- Carter, K., and Gennis, R. B. (1985), *J. Biol. Chem.* **260**: 10986-10990.
- 46.- Au, D. C. T., Lorence, R. M., and Gennis, R. B. (1985), *J. Bacteriol.* **161**: 123-127.
- 47.- Kranz, R. G., and Gennis, R. B. (1985), *J. Bacteriol.* **161**: 709-713.
- 48.- Ingledew, W. J., and Poole, R. K. (1984), *Microbiol. Rev.* **48**: 222-271.
- 49.- Miller, M. J., and Gennis, R. B. (1983), *J. Biol. Chem.* **258**: 9159-9165.
- 50.- Konoshi, K., Ouchi, M., Kita, K., and Horikoshi, I. (1986).
- 51.- Kranz, R. G., and Gennis, R. B. (1984), *J. Biol. Chem.* **259**: 7998-8003.
- 52.- Kita, K., Konishi, K., Anraku, Y. (1984), *J. Biol. Chem.* **259**: 3375-3381.
- 53.- Green, G. N., and Gennis, R. B. (1983), *J. Bacteriol* **154**: 1269-1275.
- 54.- Green, G. N., Kranz, R. G., Lorence, R. M., and Gennis, R. B. (1984), *J. Biol. Chem.* **259**: 7994-7997.
- 55.- Green, G. N., kranz, J. E., and Gennis, R. B. (1984), *Gene* **32**: 99-106.
- 56.- Ingledew, W. J., (1982), *Biochim. Biophys. Acta.* **683**: 89-117.
- 57.- Appleby, C. A. (1984), *Ann. Rev. Plant Physiol* **35**: 443-478.
- 58.- Appleby, C. A. (1978), In *FEBS Colloq.* ed H. Degn., D. Loyd., G. C., Hill. **48**: 11-20.
- 59.- O'Brian, M. R., Kishbom, P. M., Maire, R. J. (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **23**: 8390-8393.
- 60.-Williams, A. M., Wilson, P. W. (1954), *J. Bacteriol.* **67**: 303-360.
- 61.- Jones, C. W., y Redfearn, E. R. (1966), *Biochem. Byophys. Acta.* **113**: 467-481.
- 62.- Jones, C. W., y Redfearn, E. R. (1967), *Biochem. Byophys. Acta.* **143**: 340-348.
- 63.- Appleby, C. A., Turner, G. L., Macnicol, P. K. (1975), *Biochem. Byophys. Acta.* **387**: 461-474.
- 64.- Appleby, C. A. (1969), *Bichim. Byophys. Acta.* **172**: 71-87.
- 65.- Kretovich, W. L., Romanov, V. I., Korolyon, A. V. (1973), *Plant Soil.* **39**: 614-634.
- 66.- De Hollander, J. A., Stouthamer, A. H. (1980), *Eur. J. Biochem.* **111**: 473-478.
- 67.- Stam, H., van Verseveld, H. W., de Uries, W., Stouthamer, A. H. (1984), *Arch. Microbiol.* **139**: 53-60.

- 68.- De Hollander, H. (1981), Ph. D. Thesis, Urije Universiteit Amestardam.
- 69.- Avissar, Y. J., Nudler, K. D. (1978), *J. Bacteriol.* **135**: 782-789.
- 70.- Appleby, C. A. (1969), *Biochim. Biophys. Acta.* **172**: 88-105.
- 71.- Daniel, R. M., Appleby, C. A. (1972), *Biochim. Biophys. Acta.* **275**: 347-354.
- 72.- Kretovich, U. L., Matus, U. K., Melik-Sarskis, Yan, S. S. (1972), *Fisiol. Rost.* **14**: 1060-1065.
- 73.- Keistec, D. L., Marsch, S. S. El Makadem, M. T. (1983), *Plant Physiol.* **71**: 194-196.
- 74.- Spiro, S. and Guest J.R. (1991) *TIBS* **16**:310-314.
- 75.- Soberón, M., Williams, H.D., Poole R.K., and Escamilla E. (1989) *J. Bacteriol.* **171**:465-472.
- 76.- Sawers, R. G. (1991) *Mol. Microbiol.* **5**:1483-1490.
- 77.- Zimmerman, A., Reimann, C., Galimand, M., and Haas, D. (1991) *Mol. Microbiol.* **5**:1483-1490.
- 78.- Poole, R. K. (1991). King's College London, University of London. *Microbial Respiration: From Keilin to cloning, and back.* London University Press.
- 79.- Soberón, M., Membrillo-Hernández, J., Aguilar, G.R., and Sánchez, F. (1990) *J. Bacteriol.* **172**:1676-1680.
- 80.- Robson, R. L., Postgate, J. R. (1980) *Ann. Rev. Microbiol.* **34**: 183-207.
- 81.- Harold, F. M. (1986) "The vital force: a study of Bioenergetics". Freeman. New York.
- 82.- Jones, C.W., (1988) "Bacterial energy trasduction". 1-82. London Academic Press.
- 83.- Halliday, J. (1985). *Proc. of 6th International Symposium of Nitrogen Fixation.* pp. 675-682.
- 84.- Anraku, Y. (1988) *Ann. Rev. Biochem.* **57**:1-32.
- 85.- Poole, R.K., "Bacterial cytochrome oxidases". Anthony ed. Academic Press London.
- 86.- Matsushita, K, Patel, L., and Kaback, H.Q., (1984) *Biochem.* **23**:4703-4714.
- 87.- Sone, W., Kagawa, Y., and Orii, Y., (1983) *J. Biochem.* **93**:1329-1336.
- 88.- Krans, R. G. and Gennis, R. B. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**:7998-8003.
- 89.- Sone, W., and Yanagita, Y. (1982) *Biochem. Biophys. Acta* **682**:216-220.
- 90.- Yoshida, T., and Fee, J. A. (1985) *J. Biochem* **23**:279-288.

- 91.- Castor, L.N., and Chance, B. (1959) *J. Biol. Chem* **234**:1587-1592.
- 92.- Hunding, H., and Drews, G. (1984) *Biochem. Biophys. Acta* **765**:171-177.
- 93.- Finalyson, S.D., Ingledew, W.J. (1985) *Biochem. Soc. Trans.* **6**:213-222.
- 94.- Guest, J. R., Gree, J., Spiro, S. Prodromou, C. and Sharrocks, A. (1990) in "The molecular basis of Bacterial metabolism" pp. 134-145 Springer press.
- 95.- Holtink, C. W. G., Woudt, L. P., Turenhout, J. C. M, van de Kamp, M and Canters, G. W. (1990) *Gene* **90**:15-20.
- 96.- Gennis, R. B. (1987). *FEMS Microbiol. Rev.* **46**:387-399.
- 97.- Robson, R. L., Postgate, J. R. (1990). *Ann. Rev. Microbiol.* **34**: 183-207.
- 98.- O'Gara, F., Shanmugan, K. T. (1976) *Biochem. Biophys. Acta.* **437**:313-321.
- 99.- Tuzimura, K., Meguro, H. (1960) *J. Biochem.* **47**:391-397.
- 100.- Hudman, J.F. and Glenn, A. R. (1980) *Arch. Microbiol.* **128**:72-77.
- 101.- Salmiinen, S. O., and Streeter, J.G. (1987) *J. Bacteriol.* **169**:495-499.
- 102.- Peterson, J.B. and LaRue, T. A. (1981) *Plant Physiol.* **68**:489-493.
- 103.- Riebach, P.H. and Streeter, J. G. (1984) *J. Bacteriol.* **159**:47-52.
- 104.- Ronson, C. W. Lytleton, P. and Robertson, J. G. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**:4284-4288.
- 105.- Engelke, T., Jagadish, M. N. and Puhler, A. (1987) *J. Gen. Microbiol.* **133**:3019-3029.
- 106.- Watson, R. J., Yiu-Kwok, C., Wheatcroft, R. and Han, S. (1980) *J. Bacteriol.* **170**:927-934.
- 107.- Chig, Y.M., Hedtke, S., and Newcomb, W. (1977) *Plant Physiol.* **60**:771-774.
- 108.- Matus, V. K., Melik-Sarkisyan, S.S. and Kretovich, V. L. (1973) *Mikrobiologicheskiy Zhurnal* **42**:95-100 (URSS).
- 109.- Bergersen, F. J. and Turner, G. L. (1980) *J. Gen. Microbiol.* **118**:235-252.
- 110.- Winter, H. C.; Burris, R. H. (1976) *Ann. Rev. Biochem.* **215**:409-425.
- 111.- Haaker, H., and Veeger, C., (1984) *TIBS* **45**:188-192.
- 112.- Murray, M. A., Horne, A. J., Benennan, J. R. (1984) *Appl. Env. Microbiol.* **47**:449-454.
- 113.- Curtting, J.A. and Schulmann, H. M. (1969). *Biochem. Biophys. Acta.* **227**:58-62.

- 114.- Sleely, J. E., Michin, F.R., Witty, F. J. (1983) *Ann. Rev. Bot.* **53**:565-572.
- 115.- King, B.K., Hunt, S., Weagle, G. E., Walsh, K. B., Pottler, R. H., Cauin. D.t., Layzell, D. B. (1988) *Plant Phisyol.* **87**:296-299.
- 116.- Tjepkema, J.D., Yocum, C.S. (1974). *Planta* **119**:351-360.
- 117.- Sinclair, T. R., Goutriaan, J. (1981) *Plant Phisyol.* **67**:143-145.
- 118.- Urdadi, M. K., Day, D. A., Gresshoff, P. M. (1986) *Plant Cell* **3**:207-209.
- 119.- Southern, E. M. (1975) *J. Mol. Biol.* **98**:503-517.
- 120.- Noel, K.D., Sánchez, A., Fernández, L., Leemans, J. and Cevallos, M.A. (1984) *J. Bacteriol.* **158**:148-155.