

03062

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE  
FIJACION DE NITROGENO

---

---

ANALISIS ESTRUCTURAL Y DE EXPRESION  
DE LOS GENES REITERADOS PARA LA  
NITROGENASA EN *Rhizobium phaseoli*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A

MARIA BRENDA VALDERRAMA BLANCO

Cuernavaca, Mor.

1993

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.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>INTRODUCCION</b>	1
¿PARA QUE SIRVE EL NITROGENO?	1
<b>LA FIJACION BIOLOGICA DEL NITROGENO</b>	2
Nitrogenasa: Estructura y mecanismo	3
Genética Molecular	4
Procesos simbióticos	6
Adaptación al medio ambiente	7
Evolución y ecología	7
Conclusión	8
<b>BIOQUIMICA DE LA FIJACION DE NITROGENO</b>	9
Producción de hidrógeno y su captura	10
Organización de los genes <i>nif</i>	11
<b>REGULACION DE LA FIJACION DE NITROGENO</b>	13
Activación de genes <i>nif</i> por NifA y RpoN	13
Regulación de la expresión de genes <i>nif</i> en <i>Rhizobium</i>	16
<b>OBJETIVOS</b>	19
<b>RESULTADOS</b>	22
<b>CARACTERIZACION FISICA DE LA REGION <i>nifHc</i></b>	23
Conservación de la región <i>nifHc</i> en diferentes aislados de <i>Rhizobium phaseoli</i>	23
Secuencia nucleotídica de la región próxima a <i>nifHc</i>	25
Secuencia nucleotídica parcial del gene <i>nifDb</i> de <i>R. phaseoli</i> CFN42	27
Comparación entre las secuencias de las regiones <i>nifHb</i> y <i>nifHc</i>	27
<b>CARACTERIZACION FUNCIONAL DE LA REGION <i>nifHc</i></b>	30
Análisis de expresión de las fusiones <i>nifHa::lacZ</i> y <i>nifHc::lacZ</i> en cultivo	30
Fenotipo de las cepas DEM233c y DEM151a de <i>R. phaseoli</i> en simbiosis	31
<b>DISCUSION</b>	
Organización de la región <i>nifHc</i>	35
Regulación transcripcional de los genes <i>nifHa</i> y <i>nifHc</i>	36
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	41
Cepas bacterianas, plásmidos y medios de cultivo	41
Manejo de DNA recombinante	41
Análisis por hibridización	41
Determinación de secuencias nucleotídicas	41
Análisis de secuencias de DNA por computadora	42
Clonación del gene <i>nifD</i> de <i>R. phaseoli</i> CFN42	42
Construcción de fusiones transcripcionales <i>nifH::lacZ</i> en <i>Rhizobium phaseoli</i>	42
Condiciones de crecimiento de plantas y determinación de la nitrogenasa	42
Determinación de la actividad de $\beta$ -galactosidasa	43
Cultivos bajo atmósferas definidas	43
<b>REFERENCIAS</b>	44

# INTRODUCCION

La investigación sobre la fijación de nitrógeno ha recibido un fuerte apoyo en todo el mundo en los últimos veinte años, que se ha visto recompensado con la generación de una enorme cantidad de información tendiente a la solución del problema fundamental: el aumento de las reservas bióticas de nitrógeno. En las condiciones actuales de nuestro planeta, la provisión de nitrógeno utilizable es un factor limitante para la mayor parte de los seres vivos. La fijación de nitrógeno es la única forma de generar una ganancia neta de nitrógeno asimilable en la biósfera, si ésta no existiera, todo el nitrógeno del planeta volvería a la atmósfera en cien años.

Existen métodos industriales para fijar nitrógeno (proceso de Haber-Bosch) que aportan a la biósfera alrededor del 20% de la entrada anual de nitrógeno, pero son muy costosos debido a que requieren de alta temperatura y presión. Una fracción significativa del resto entra a la biósfera por medio de mecanismos abióticos imposibles de controlar (luz ultravioleta, descargas eléctricas, etc.) y el resto proviene de la capacidad de fijar nitrógeno de algunas arqueobacterias y eubacterias, que pueden hacerlo en vida libre o en asociaciones con raíces de plantas, ya sean simbióticas o no simbióticas.

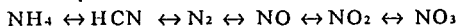
La fijación simbiótica de nitrógeno por bacterias del género *Rhizobium* en asociación con leguminosas llega a suministrar un porcentaje muy importante del nitrógeno utilizable del planeta. La evidente importancia económica de este sistema biológico ha impulsado a gran número de investigadores a incorporarse al área durante los últimos cuarenta años, de forma que actualmente existe un red de instituciones con diferentes enfoques colaborando activamente en el desarrollo del tema.

## ¿PARA QUE SIRVE EL NITROGENO?

El nitrógeno es un elemento esencial en la composición de todos los seres vivos. Forma parte de las proteínas, los ácidos nucleicos y algunos azúcares. La cantidad total de nitrógeno en la tierra está estimada en  $5 \times 10^{18}$  kg y aunque es uno de los elementos más abundantes en la atmósfera, ocupa el lugar número 17 en la corteza terrestre.

En la atmósfera, se encuentra principalmente en forma de dinitrógeno, una molécula casi inerte que requiere 226 kCal/mol para disociarse. Esto se debe a que sus átomos están unidos por un triple enlace muy estable, donde el orbital de mayor energía es un enlace sigma excepcionalmente fuerte. Más de la mitad de la energía necesaria se gasta en romper el primer enlace.

Dada esta falta de reactividad, el dinitrógeno no puede ser utilizado directamente por todos los seres vivos en la formación de moléculas orgánicas, sino que necesita ser convertido previamente a cualquiera de los siguientes compuestos:



Todos estos compuestos son interconvertibles entre sí y las relaciones existentes entre ellos en la naturaleza están determinadas por el ciclo del nitrógeno. Se cree que han existido por lo menos tres tipos diferentes de ciclos durante la historia de nuestro planeta: el prebiótico, el biológico anaerobio y el biológico aerobio. El ciclaje de nitrógeno en la biósfera consiste en una serie sucesiva de reacciones bioquímicas. Estas reacciones se llevan a cabo como parte de un proceso equilibrado que permite la disponibilidad de todas las formas de nitrógeno asimilable en los ecosistemas.

Para dar una idea del tipo de procesos involucrados, citaré un fragmento de la revisión del tema escrita por Mora y Lara (1991): "El ciclo comienza con la conversión del nitrato a amonio en las plantas, seguido por la asimilación de este compuesto inorgánico en nitrógeno orgánico. Por el proceso de amonificación (que se lleva a cabo en microorganismos), el nitrógeno orgánico es reciclado a amonio...El amonio producido es oxidado a nitrato por las bacterias nitrificantes y de esta manera el ciclo se completa. La excepción es la presencia de bacterias denitrificantes, que convierten parte del nitrato en óxido nitroso y dinitrógeno, los cuales escapan a la atmósfera. Una sexta parte del nitrógeno total se pierde por denitrificación y es compensado por el que se fija y reduce a amonio por bacterias".

El paso limitante del ciclo es la fijación de nitrógeno, que ocasiona que la concentración de nitrógeno asimilable en la biósfera se mantenga limitada a pesar de la alta concentración de dinitrógeno atmosférico. Como se menciona en el párrafo anterior, el primer paso de la cadena es la asimilación del nitrógeno inorgánico por plantas. Con el fin de aumentar el rendimiento y el valor nutricional de algunos cultivos, se ha popularizado el uso de fertilizantes industriales. Aunque efectivamente aumentan el rendimiento, poseen una serie de inconvenientes: su alto costo restringe el número de agricultores capaces de ocuparlo (Bohloul, 1990); destruyen el equilibrio biótico del área de aplicación; ocasionan contaminación de mantos freáticos y corrientes fluviales (Schoot-Uiterkamp, 1990). Para solucionar esto, se han creado instituciones de enlace con los agricultores que motivan el uso de la fijación biológica del nitrógeno como una alternativa ecológica para la conservación de la biosfera.

### LA FIJACION BIOLOGICA DEL NITROGENO

La fijación de nitrógeno es uno de los procesos más complejos estudiados por la biología moderna. En 1888 se demostró por primera vez que un organismo podía ocupar el nitrógeno atmosférico como nutriente (ver Quispel, 1988). A partir de entonces, y sobre todo en los últimos 50 años, gran cantidad de instituciones de investigación han consagrado sus esfuerzos al entendimiento del proceso (ver Evans y Burris, 1992).

Para tener una idea de la amplitud de este estudio, en los primeros nueve meses de 1992 se publicaron 5269 artículos del tema en revistas científicas. De estos, 1610 se clasifican como

ciencia básica. Esta información se obtuvo de Biological Abstracts, versión CD (enero a septiembre de 1992) La diversidad de los enfoques utilizados ha motivado la especialización. A continuación haré un breve resumen del estado actual de algunas de estas áreas de especialización y más adelante profundizaré en aquellos temas relevantes en la discusión de esta tesis.

### Nitrogenasa: Estructura y Mecanismo.

La nitrogenasa es la única enzima conocida capaz de interactuar con el dinitrógeno atmosférico. Su función es reducirlo hasta amonio, asimilable directamente por plantas y bacterias. A partir de la primera vez que se detectó actividad de nitrogenasa en extractos celulares, en 1960, se ha buscado conocer el mecanismo de reacción de esta enzima (ver Evans y Burris, 1992).

La complejidad de la reacción ha limitado el avance del área, sin embargo, gracias a sofisticadas técnicas de estudio de metaloproteínas, se han obtenido resultados significativos. El modelo de mecanismo propuesto por Lowe/Thorneley sobre la transferencia secuencial de electrones al sustrato (dinitrógeno) y sus proposiciones sobre la identidad de los intermediarios de la reacción, parece ser el más adecuado, debido a recientes evidencias experimentales (Dilworth y Eady, 1991; Thorneley *et al*, 1992).

Lo que conocemos como nitrogenasa está realmente constituida por dos enzimas diferentes, componentes I y II. El componente I es una reductasa que provee específicamente de electrones al componente II, el cual contiene el sitio activo para la reducción del dinitrógeno. El componente I (nitrogenasa reductasa) es un homodímero de 60,000 D. Un centro [4Fe:4S] se encuentra localizado entre las dos subunidades y es el donador directo de electrones para el componente II.

El componente II (nitrogenasa) es un complejo  $\alpha\beta_2$  de 240,000 D aproximadamente y contiene 2 átomos de molibdeno, 32 de hierro y 32 de azufre por molécula. La nitrogenasa contiene dos tipos de centros de óxido-reducción: los centros P y el cofactor FeMo. Cada molécula contiene dos centros P ([4Fe:4S]) unidos entre sí. El cofactor FeMo consta de dos centros: [4Fe:3S] y [1Mo:3Fe:3S] unidos entre sí y es el sitio activo para la reducción del sustrato (ver Yates, 1992).

Recientemente se estableció la estructura tridimensional del componente I de *Azotobacter vinelandii* (Georgiadis *et al*, 1992). También se ha avanzado en la determinación de la estructura del cofactor FeMo del componente II, tanto de *A. vinelandii* (Kim y Rees, 1992) como de *Clostridium pasteurianum* (Bolin *et al*, 1990). Estos avances han permitido la correcta interpretación de resultados tales como el efecto de la hidrólisis de ATP en el flujo de electrones (Thorneley, 1992; Wolle *et al*, 1992) y el papel del molibdeno en el sitio activo (Kim y Rees, 1992).

Otra de las metas buscadas es el incorporar la capacidad de la nitrogenasa para reducir

dinitrógeno en condiciones normales de presión y temperatura en el diseño de catalizadores inorgánicos que sustituyan al costoso proceso industrial de Haber-Bosch (Newton, 1988).

### Genética Molecular.

Los sistemas naturales más sencillos para estudiar la genética de la fijación de nitrógeno son bacterias que llevan a cabo el proceso en vida libre, tales como *Klebsiella pneumoniae* o *A. vinelandii*. En estos organismos se ha encontrado que se requiere la expresión coordinada de un mínimo de 20 genes específicos, conocidos como genes *nif*. La mayor parte de estos genes están involucrados con el ensamblaje de los cofactores o con la correcta asociación de las subunidades de la nitrogenasa (Tabla I).

La capacidad de las bacterias de la familia de las Rhizobaceas de interactuar simbióticamente con raíces de leguminosas complica el esquema. En efecto, se requiere también de la actividad del producto de algunos genes no presentes en las bacterias fijadoras en vida libre, conocidos como genes *fix*. Esta designación es circunstancial, pues un fenotipo  $\text{nod}^+\text{fix}^-$  puede deberse a alteraciones en procesos no relacionados directamente con la simbiosis, sino que afecten el metabolismo basal de la célula (Barbour *et al*, 1992).

Esta complejidad queda evidente si tomamos en cuenta que el establecimiento de la interacción planta-bacteria y su correcto desarrollo requieren de la expresión de alrededor de 15 genes de la bacteria conocidos como genes *nod* (Long, 1992) y por lo menos otros 15 genes de la planta, todos ellos bajo un estricto control espacio-temporal (Franssen *et al*, 1992).

En estos momentos se ha logrado profundizar lo suficiente como para presentar un esquema funcional del mecanismo genético en las bacterias fijadoras de nitrógeno en vida libre (Dean y Jacobson, 1992). Sin embargo, en el caso de los procesos simbióticos, la complejidad del sistema bacteriano y el aún escaso conocimiento de la genética de la planta hospedera, representan todavía atractivos retos que vencer.

Tabla 1.- Genes específicos para la fijación de nitrógeno.

Gene	Producto y función propuesta
<i>nifH</i>	Nitrogenasa reductasa. Se requiere de su producto para la biosíntesis de la nitrogenasa en <i>K. pneumoniae</i> y en el sistema <i>nif</i> de <i>A. vinelandii</i> . (Joerger <i>et al</i> , 1991, Harris <i>et al</i> , 1990)
<i>nifD</i>	Subunidad $\alpha$ de la nitrogenasa.
<i>nifK</i>	Subunidad $\beta$ de la nitrogenasa.
<i>nifE</i>	Flavodoxina, reductor fisiológico de la nitrogenasa reductasa.

INTRODUCCION

<i>nifJ</i>	Piruvato-flavodoxina-oxidoreductasa. Acopla la oxidación de piruvato a la reducción de la flavodoxina.
<i>nifM</i>	Requerido para la activación de la nitrogenasa reductasa. Se requiere de su producto para la actividad de los tres sistemas de nitrogenasa en <i>A. vinelandii</i> . (Kennedy y Dean, 1992)
<i>nifU</i>	No se conoce su función. Se requiere de su producto para la actividad de los tres sistemas de nitrogenasa en <i>A. vinelandii</i> . Posible estabilización de la nitrogenasa reductasa en <i>A. vinelandii</i> y en la formación de la aponitrogenasa en <i>K. pneumoniae</i> (Kennedy y Dean, 1992, Harris <i>et al</i> , 1990)
<i>nifS</i>	No se conoce su función. Se requiere de su producto para la actividad de los tres sistemas de nitrogenasa en <i>A. vinelandii</i> . Posible estabilización de la nitrogenasa reductasa en <i>A. vinelandii</i> y en la formación de la aponitrogenasa en <i>K. pneumoniae</i> . (Kennedy y Dean, 1992, Harris <i>et al</i> , 1990)
<i>nifV</i>	Homocitrato sintasa. El homocitrato es un componente del cofactor FeMo. Se requiere de su producto para la actividad de los tres sistemas de nitrogenasa en <i>A. vinelandii</i> . (Kennedy y Dean, 1992)
<i>nifE</i>	Requerido para la biosíntesis de la nitrogenasa. Forma un complejo con el producto de <i>nifN</i> .
<i>nifN</i>	Requerido para la biosíntesis de la nitrogenasa. Forma un complejo con el producto de <i>nifE</i> .
<i>nifB</i>	Requerido para la biosíntesis del cofactor FeMo.
<i>nifQ</i>	Involucrado en la biosíntesis del cofactor FeMo. El fenotipo <i>nifQ</i> <sup>-</sup> se suprime con molibdeno o cisteína.
<i>nifW</i>	No se conoce su función. Se requiere para la producción máxima de la aponitrogenasa en <i>K. pneumoniae</i> . (Harris <i>et al</i> , 1990).
<i>nifZ</i>	No se conoce su función. Se requiere para la producción máxima de la aponitrogenasa en <i>K. pneumoniae</i> . (Harris <i>et al</i> , 1990)
<i>nifA</i>	Elemento regulador positivo.
<i>nifL</i>	Elemento regulador negativo.
<i>nifX</i>	No se conoce su función. Posible elemento regulador negativo. (Moreno-Vivian <i>et al</i> , 1989)
<i>nifT</i>	No se conoce su función. Se requiere para la producción máxima de la aponitrogenasa en <i>K. pneumoniae</i> . (Harris <i>et al</i> , 1990)
<i>nifP</i>	Serina-acetiltransferasa. Se requiere para la actividad completa de la nitrogenasa. (Evans <i>et al</i> , 1991)



<i>nifY</i>	No se conoce su función. Posible estabilización del cofactor FeMo en <i>K. pneumoniae</i> . (Harris <i>et al</i> , 1990)
-------------	--

NOTA: La información sobre de los genes carentes de referencia se tomó de la revisión de Dean y Jacobson, 1992.

### Procesos simbióticos.

Las asociaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno con raíces de plantas proporcionan el 50% del nitrógeno disponible en la biósfera (Hardy y Havelka, 1975). Estas asociaciones pueden ser simbióticas con raíces de leguminosas o no simbióticas con raíces de pastos y cultivos de cereales. En ambos casos, la presencia de las bacterias promueve el mejor crecimiento de las plantas y en algunos casos incrementos en su productividad (Bohlool, 1990).

Numerosos grupos de investigación se han dedicado al estudio de la especificidad de las interacciones planta-bacteria. Recientemente se han obtenido avances considerables en cuanto a los mecanismos de comunicación química entre ambos participantes, identificando algunas de las moléculas responsables (Long, 1992).

En el caso de las leguminosas, la presencia de moléculas-señales provenientes de bacterias del género *Rhizobium*, promueve la diferenciación de un órgano específico en la raíz, llamado nódulo, donde se lleva a cabo la fijación de nitrógeno. Las proteínas que intervienen en el establecimiento y desarrollo del nódulo están codificadas por los genes *nod*.

El mecanismo propuesto para la comunicación química entre plantas y bacterias es el siguiente:

1.-Compuestos difusibles como esqueletos de carbono y flavonoides producidos por la raíz de la planta interactúan específicamente con la proteína NodD de la bacteria para activar la transcripción de otros genes *nod*. El tipo de compuestos que la planta excreta son específicos de su especie y le sirven para identificarse.

2.-Algunas de las proteínas inducidas participan en la síntesis y modificación programada de polímeros de N-acetil-glucosamina. La estructura de esta molécula se encuentra conservada en los diferentes organismos estudiados y la especificidad en el rango de infección de las bacterias proviene del tipo de modificaciones que sufre: acetilación, metilación, sulfatación, etc. Estas moléculas, llamadas factores de nodulación, inducen la división celular a distancia en la raíz de la planta aún en ausencia de bacterias.

3.-Mientras se llevan a cabo los dos pasos anteriores, las bacterias se adhieren a la superficie de pelos radiculares por medio de lectinas que reconocen la pared de las Rhizobaceas. Las bacterias penetran por un hilo de infección hasta alcanzar el sitio de crecimiento del nódulo, donde infectan algunas de las células de la planta.

5.-Llegando a este sitio, parte de las bacterias se diferencian a bacteroides, lo que implica que su morfología se modifica y su metabolismo se enfoca casi exclusivamente a la fijación de nitrógeno. A partir de este momento, dependen de los compuestos de carbono que bajen de las hojas. No se ha podido demostrar claramente si este estado de diferenciación es terminal o no,

### Adaptación al medio ambiente.

La nitrogenasa es oxidada irreversiblemente por oxígeno molecular en concentraciones atmosféricas. Todos los organismos fijadores de nitrógeno aerobios han desarrollado mecanismos de protección para la nitrogenasa compatibles con su producción de energía (Postgate, 1981). Algunos de los mecanismos caracterizados son:

- Producción de exopolisacáridos que limitan la difusión de oxígeno al interior de la colonia, ej. *Dexia gumosa* (Hill, 1971).
- Formación de una película semipermeable a oxígeno en el exterior de las colonias, ej. *Azospirillum* (Reiner y Okon, 1986).
- Diferenciación terminal de células especializadas para fijar nitrógeno en heteroquistes, ej. *Anabaena* (Golden *et al*, 1985).
- Inducción de órganos específicos en algunas plantas, que al ser invadidos protegen a las bacterias del oxígeno ambiental, ej. *Rhizobium* (ver Werner, 1992).
- Inactivación reversible de la nitrogenasa reductasa por ADP-ribosilación en condiciones de alto oxígeno, ej. *Rhodospirillum* (Roberts y Luden, 1992) y *Azospirillum* (Zhang, 1992).
- Rearreglos específicos en los genes estructurales para la nitrogenasa (Golden *et al*, 1985).
- Regulación de la actividad de la nitrogenasa por medio de modificaciones postraduccionales en otras enzimas relacionadas (Thorneyley *et al*, 1992);
- Respiración desacoplada de la producción de ATP, ej. *Azotobacter*.

El mecanismo de coordinación de todos los pasos involucrados en el planteamiento de condiciones metabólicas o en el desarrollo de estructuras propicias para el establecimiento de una fijación de nitrógeno exitosa está aún sin resolver.

### Evolución y Ecología.

La capacidad de fijar nitrógeno está restringida a los procariotes y se encuentra tanto en eubacterias como en arqueobacterias (Young, 1992). Es un proceso muy antiguo, quizá tanto como la fotosíntesis (Sprent, 1992). Siendo tan importante y complejo, resulta atractivo reconstruir la historia evolutiva de este proceso. Para esto se han aplicado dos enfoques complementarios: 1) La comparación de secuencias tanto de proteínas como de DNA de genes involucrados con la fijación de nitrógeno y 2) El análisis de poblaciones de bacterias actuales.

El primer enfoque se ha basado en el fuerte compromiso funcional de las proteínas que componen a la nitrogenasa y su extraordinaria conservación entre diferentes géneros (Normand y Busquet, 1989). Esto ha motivado que la secuencia de las proteínas, o la de los genes que las codifican, haya sido determinada en numerosos organismos. A partir de experimentos de este tipo, se ha propuesto que todos los genes conocidos para la nitrogenasa tienen un origen común,

a pesar de la gran diversidad de las bacterias que lo portan. Por lo tanto, la fijación de nitrógeno parece haber surgido antes de la división entre arqueobacterias y eubacterias (Young, 1992).

El segundo enfoque, de genética cuantitativa, ha proporcionado evidencias sobre los flujos de material genético entre diferentes organismos en nichos ecológicos muy importantes agronómicamente (p.ej. la rizosfera, Young, 1989). El hecho que los genes que participan en la interacción simbiótica y en la fijación de nitrógeno se encuentren en moléculas extracromosomales ha motivado la discusión sobre qué tipo de indicadores genéticos deben tomarse en cuenta para la definición de especies bacterianas, especialmente dentro del género *Rhizobium*. Los enfoques cuantitativos han permitido la caracterización de fenómenos de transferencia horizontal de estas moléculas extracromosomales, así como la detección de diferentes mosaicos genéticos dentro de la misma población (Souza *et al*, 1992; Valdes y Piñero, 1992)

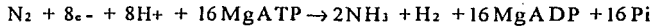
### Conclusión.

La información obtenida en los últimos diez años ha marcado grandes avances en el área de la fijación biológica del nitrógeno y difícilmente pasa un año sin que se obtenga alguna conclusión relevante. Este conocimiento ha permitido un cambio en la apreciación del proceso, pues ya no se restringe al contexto de sus evidentes implicaciones prácticas (impacto agro-económico), sino como un sistema biológico complejo que permite la interacción de diferentes enfoques científicos en su caracterización. A continuación presentaré algunos temas especialmente relevantes para la discusión de esta tesis con mayor profundidad.

## BIOQUIMICA DE LA FIJACION DE NITROGENO

La fijación biológica de nitrógeno es catalizada por la metaloenzima nitrogenasa, un complejo compuesto por dos componentes independientes llamados nitrogenasa y nitrogenasa reductasa. Ambos componentes son indispensables para la actividad biológica del complejo.

La nitrogenasa reductasa es una donadora específica de electrones para la nitrogenasa y obtiene su energía de la hidrólisis de ATP. La nitrogenasa contiene el sitio para la unión del sustrato y su reducción. La reducción catalítica del dinitrógeno es indicada por la siguiente ecuación



Para reducir una molécula de dinitrógeno se requiere que los componentes de la nitrogenasa se asocien y disocien varias veces, ya que solo se incorpora un electrón a la vez. Como se muestra en la ecuación anterior, se requieren ocho protones y ocho electrones por cada molécula de dinitrógeno fijada. También se requiere de un medio ambiente anacróbico, ya que ambos componentes de la enzima son sensibles a oxígeno. La nitrogenasa puede utilizar otros sustratos diferentes del dinitrógeno que también contengan triples enlaces (acetileno, ácido cianhídrico, azidas, etc., ver Yates, 1992).

Recientemente se propuso un modelo de mecanismo para la interacción de los dos componentes (Wolle *et al*, 1992) que implica:

1.-Al unirse ATP a la nitrogenasa reductasa cambia la conformación de la enzima que expone su centro redox al contacto con la nitrogenasa, la cuál obtiene su electrón de una flavodoxina o ferredoxina específica.

2.-Una vez que se acoplan la nitrogenasa y la nitrogenasa reductasa, se hidroliza el ATP y se transfiere el electrón a la nitrogenasa. La donación solo ocurre cuando se encuentran asociadas estas dos proteínas, evitando la transferencia de electrones a otros receptores.

3.-Después de la hidrólisis, el ADP cambia de lugar hasta otro sitio específico localizado entre las dos subunidades, cambiando la conformación de la nitrogenasa reductasa, lo cuál hace irreversible la transferencia del electrón, aunque las dos proteínas se encuentren todavía asociadas.

4.-Después de desacoplarse la nitrogenasa y la nitrogenasa reductasa, el ADP se disocia y la nitrogenasa reductasa adquiere la conformación inicial. En estas condiciones recibe otro electrón, une otra molécula de ATP y comienza el ciclo otra vez. Este ciclo requiere llevarse a cabo ocho veces para la reducción de una molécula de dinitrógeno.

Aunque se conocen otros sistemas enzimáticos de nitrogenasa relacionados estructuralmente al sistema FeMo, pero codificados por otro tipo de genes, el mejor caracterizado es el que posee cofactores de Hierro y Molibdeno y que se conoce como convencional. Los otros sistemas, conocidos como alternativos, han sido identificados en bacterias del género *Azotobacter* y

contienen algunos componentes análogos al sistema convencional pero utilizan cofactores FeVa o Fe exclusivamente (Bishop y Premakumar, 1992).

Lo que parece ser un tercer sistema de nitrogenasa ha sido recientemente identificado en la bacteria gram positiva *Streptomyces thermoautotrophicus* UBT1 (Gadkari *et al*, 1992). Su actividad de fijación de nitrógeno se demostró por incorporación de dinitrógeno marcado con el isótopo  $^{15}\text{N}$  y por incremento de biomasa con dinitrógeno como única fuente de nitrógeno. Se distingue de los otros sistemas en lo siguiente:

- 1.-Es insensible a tungsteno, lo que indica que no se trata de una enzima que utilice molibdeno.
- 2.-Es insensible a acetileno, etileno y monóxido de carbono, todos ellos inhibidores competitivos del sustrato en los otros sistemas. Esto indica que su mecanismo es completamente diferente a todas la nitrogenasas conocidas.
- 3.-No se inhibe por altas concentraciones de hidrógeno, lo que indica que probablemente no produzca hidrógeno como un subproducto de la reacción de reducción de dinitrógeno.
- 4.-Prefiere utilizar dinitrógeno a una fuente rica de nitrógeno orgánico, como el extracto de levadura, lo que significa que no posee sistemas regulatorios equivalentes a los conocidos.
- 5.-Aparentemente no contiene secuencias homólogas a las de los genes de las otras nitrogenasas.

A excepción de este último caso, todas las demás nitrogenasas conocidas, aún las alternativas de *Azotobacter*, poseen suficientes características comunes para ser identificadas como descendientes de un ancestro común, en apoyo a la proposición de un origen monofilético. Con respecto a la encontrada en *S. thermoautotrophicus*, serán necesarios más resultados antes de tener evidencias sobre su origen.

### Producción de hidrógeno y su captura.

Una de las características más intrigantes de la actividad de nitrogenasa es su capacidad para reducir protones a hidrógeno simultáneamente con la reducción de dinitrógeno, dividiendo los electrones disponibles entre los dos sustratos. Aunque en condiciones de alto flujo de electrones o con presiones parciales de dinitrógeno mayores a la atmosféricas se favorece la translocación de electrones al sustrato, el límite experimental es una molécula de dinitrógeno por una molécula de hidrógeno reducido.

Este manejo del flujo de electrones implica una eficiencia máxima teórica de la reacción de solamente el 50%. Obviamente esta eficiencia es bastante menor *en vivo*, sin embargo, la evolución de hidrógeno es parte integral de la actividad de la enzima y no hay reducción de dinitrógeno sin producción de hidrógeno. Interesantemente, si se ha encontrado que en presencia de altas concentraciones de monóxido de carbono todo el flujo de electrones se deriva a la reducción de protones. Adicionalmente, la presencia de hidrógeno como sustrato disminuye aún

más la eficiencia de la reducción de dinitrógeno. Este efecto inhibitorio se debe a que el hidrógeno externo puede ser utilizado como sustrato, disminuyendo aún más la cantidad de electrones dirigidos a la reducción del dinitrógeno.

Para disminuir la pérdida energética intrínseca del sistema, gran cantidad de organismos han desarrollado la capacidad de oxidar el hidrógeno producido por la nitrogenasa. Esta oxidación devuelve parte de la energía depositada en la molécula de hidrógeno a la célula, que aunque poca para ser utilizada como fuente única, aumenta la eficiencia neta de la reducción de dinitrógeno (Arp, 1992). La enzima que lleva a cabo esta reacción es la hidrogenasa. Se trata de un heterodímero  $\alpha\beta$  con un peso molecular de 100 kD. Aunque se ha determinado la secuencia y localización de los genes estructurales para las dos subunidades en *Bradyrhizobium japonicum* (Sayavedra-Soto *et al*, 1988), aparentemente existen otros genes involucrados que aún no han sido caracterizados. La expresión de los genes de la hidrogenasa depende de la concentración externa de hidrógeno y oxígeno, así como de la fuente de carbono utilizada. No se conoce el mecanismo de acción de estos efectores.

Las bacterias aprovechan la actividad de la hidrogenasa acoplando el poder reductor generado a partir de la oxidación de hidrógeno, ya sea a la producción de ATP o a sistemas que reducen oxígeno. Al mismo tiempo se aumenta la eficiencia de la fijación de nitrógeno al disminuir la concentración interna inhibitoria de hidrógeno. Uno de los aspectos más interesantes de la actividad de hidrogenasa es que es modulable, probablemente por medio de un factor difusible, dependiendo del cultivar utilizado (Bedmar *et al*, 1983; Bedmar y Phillips, 1984). Esto indica que la eficiencia final de la reacción de fijación de nitrógeno puede ser modulada por las necesidades de la planta.

Evidentemente, el funcionamiento de un sistema tan complejo requiere un alto grado de organización, tanto estructural como funcional, para alcanzar niveles eficientes. A continuación veremos algunos aspectos relevantes de estos niveles de organización.

### Organización de los genes *nif*.

Los polipéptidos que forman el complejo de la nitrogenasa no se sintetizan como unidades activas, sino que necesitan ser procesados por otras proteínas específicas. Se ha demostrado que ésta es la función del producto de algunos de los genes específicos para fijación de nitrógeno (*nif*) descritos en la tabla 1. Recientemente se demostró que el ensamblaje de una nitrogenasa activa requiere del sistema general de procesamiento de proteínas constituido por los productos de los genes *groEL* (Govezensky *et al*, 1991).

Los productos de otros genes *nif* están involucrados con el transporte de electrones a la nitrogenasa. También hay algunos genes cuyos productos son responsables de la activación o inhibición de la expresión coordinada de todos los genes *nif* en respuesta a las condiciones del

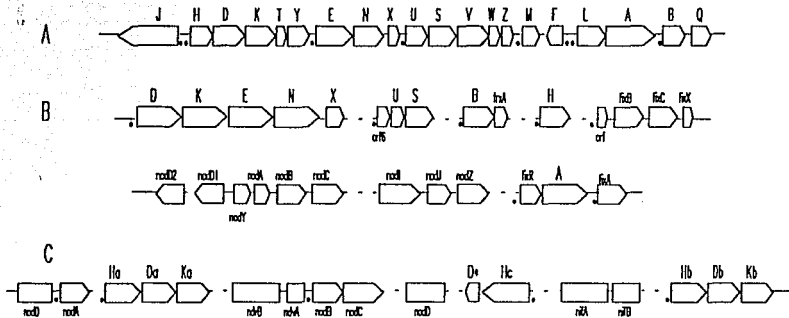


Fig. 1- Organización relativa de los genes de la fijación de nitrógeno en: A) *K. pneumoniae*; B) *B. japonicum* y C) *R. phaseoli* cepa CFN42. Todos los genes son *nifA* no ser que se indique lo contrario. Las flechas indican la dirección de transcripción del gene y los puntos (•) los promotores identificados. Los rectángulos indican genes detectados por hibridación pero aún no caracterizados. NOTA: Los mapas no se encuentran en la misma escala

medio ambiente.

En *Klebsiella pneumoniae* los 17 genes *nif* conocidos se encuentran localizados en el mismo fragmento del cromosoma junto con tres marcos de lectura aún no caracterizados (fig. 1A). En bacterias del género *Azotobacter* y *Bradyrhizobium* también se encuentran en el cromosoma (fig. 1B). En bacterias del género *Rhizobium* la mayor parte de los genes involucrados en la fijación de nitrógeno se encuentran en moléculas autorreplicables independientes del cromosoma llamadas plásmidos ( ver Martínez *et al*, 1990). En *Rhizobium phaseoli* cepa CFN42, los genes *nif* que se han identificado hasta ahora se encuentran dispersos sobre una región de 120 kB del plásmido D, conocido como plásmido simbiótico (fig. 1C; Girard *et al*, 1991). Esta cepa posee copias múltiples de los genes para la nitrogenasa (dos copias de *nifDK*) y para la nitrogenasa reductasa (tres copias de *nifH*, Quinto *et al*, 1985). También han sido identificados otros genes involucrados en la regulación de los genes *nif*, tales como *nifA* y *nifB* (Girard *et al*, 1991 y 1993).

Algunos genes necesarios para llevar a cabo una interacción simbiótica exitosa se encuentran en un solo replicón, diferente al cromosoma, esto proporciona una gran flexibilidad genética para las poblaciones de bacterias que se encuentren en el suelo pues en algunas condiciones, unas pocas células que posean la capacidad de nodular cierta leguminosa pueden proporcionarla a otras por medio de la transferencia de plásmidos. Esto se ha demostrado en condiciones de laboratorio, donde la transferencia del plásmido simbiótico de *R. tropici* a la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* la capacita para nodular plantas de frijol (Martínez *et al*, 1987).

## REGULACION DE LA FIJACION DE NITRÓGENO.

Como ya se mencionó anteriormente, la fijación de nitrógeno es un proceso energéticamente costoso que requiere de la hidrólisis de 16 moles de ATP para reducir una mol de dinitrógeno a amoníaco. Es, por lo tanto, evidente la necesidad de controlar de manera rigurosa tanto la síntesis como la actividad de la nitrogenasa en respuesta a factores ambientales.

La sensibilidad intrínseca de la nitrogenasa al oxígeno provoca que la concentración de éste sea el principal factor regulatorio de todo el sistema (Merrick, 1992). En algunos organismos, principalmente los que utilizan el nitrógeno fijado para su propio crecimiento (diazótrofos), la disponibilidad de nitrógeno asimilable en el medio ambiente es otro factor importante (Hill, 1992; Kennedy y Dean, 1992). Además, dado que la nitrogenasa es una metaloenzima, la concentración de los metales requeridos para su actividad tiene efectos regulatorios, sobre todo en aquellos organismos que poseen nitrogenasas con diferentes cofactores metálicos, p.ej. *Azotobacter* (Bishop y Premakumar, 1992).

Con el fin de preservar la integridad de la nitrogenasa, algunos organismos modulan su actividad por medio de cambios conformacionales reversibles que la protegen de altas concentraciones de oxígeno atmosférico, p.ej. *Azotobacter* (Hill, 1992). En otros organismos la enzima se inactiva específicamente en condiciones adversas para reducir el mal uso de la energía, p.ej. *Rhodospirillum* (Roberts y Luden, 1992). En el caso de las cianobacterias, la actividad de nitrogenasa se restringe a solo algunas células especializadas que se diferencian de acuerdo a un proceso coordinado finamente, desarrollando una barrera mecánica contra altas concentraciones de oxígeno (Golden *et al*, 1985).

A pesar de algunas diferencias encontradas entre generos, los esquemas generales de regulación de la transcripción de genes *nif* son claramente comparables, ya que las otras proteínas involucradas (FixL, FixJ, FixK, ver más adelante), actúan al nivel del control la transcripción de *nifA*. Por lo que el papel de NifA como regulador maestro de la expresión de los genes *nif* se encuentra conservado.

### Activación de genes *nif* por NifA y RpoN.

La transcripción de los genes *nif* se realiza por medio de la activación de promotores específicos, que se encuentran en la posición -12, -24 con respecto al inicio de la transcripción. La expresión de estos promotores es completamente dependiente del factor específico  $\sigma_{54}$ , producto del gene *rpoN* (Kustu *et al*, 1989). La RNA-polimerasa carece de especificidad intrínseca en su unión a DNA (McClure, 1985) y depende de los factores sigma " $\sigma$ " para acoplarse eficientemente a los promotores (Helmman y Chamberlin, 1988).

Todos los promotores activables por  $\sigma^{54}$  (RpoN-dependientes) reconocen secuencias de DNA muy parecidas, con el consenso TGG-N8-TTCA en las posiciones -11,-26 con respecto al inicio



de la transcripción (Morett y Buck, 1989). El funcionamiento de los promotores RpoN-dependientes es dependiente estricto por la distancia de diez pares de bases entre las posiciones -12 y -24 (Buck, 1986). Modificaciones de los residuos ubicados en las posiciones -12, -13, -14, -18 y -26 del promotor *nifH* de *K. pneumoniae* tienen un efecto negativo en la eficiencia del promotor al reducir la afinidad del acoplamiento con RpoN (Buck et al, 1985). Los nucleótidos GG-N10-GC en las posiciones -12,-24 están notablemente conservados, excepto en los tres promotores *nifH* de *R. phaseoli* (Quinto et al, 1985), el promotor *nifH* de *R. trifolii*, el promotor *nifN* de *R. meliloti* (Merrick, 1992) y el promotor *glnH* de *E. coli* (Claverie-Martin y Magasanik, 1991), que contienen A en lugar de C en la posición -13.

RpoN se une al promotor y forma un complejo cerrado que es incapaz de isomerizarse en un complejo abierto por sí mismo, por lo tanto todos los promotores RpoN-dependientes requieren absolutamente de una proteína activadora específica para su funcionamiento (Kustu et al, 1989). En el caso de los genes *nif*, el activador específico es el producto del gene *nifA*, aunque pueden ser activados por otras proteínas del mismo grupo (p.ej. NtrC, Buck et al, 1985). NifA promueve la isomerización del DNA del promotor de un complejo cerrado a uno abierto (Morett y Buck, 1989).

La actividad óptima de NifA se obtiene cuando se une a secuencias de DNA específicas localizadas entre 80 y 150 pares de bases antes del inicio de la transcripción (NifA-UAS=Upstream Activator Sequences; Buck et al, 1986; Morett y Buck, 1988). Las secuencias UAS<sup>+</sup> contienen el elemento TGT-N10-ACA, y al igual que en la secuencia de los promotores RpoN-dependientes la distancia interna es esencial. Derivados con la secuencia TGT-N10-ACC reducen la actividad del promotor, indicando un pegado débil de NifA a la secuencia (Buck et al, 1987).

Se ha demostrado que los promotores RpoN-dependientes pueden activarse tanto por su activador específico, como por otros de la misma familia. Esto se debe a la homología de secuencia entre las proteínas de este grupo, por la que comparten un mecanismo común (Kustu et al, 1989). Por ejemplo, los promotores de los genes *nifH* o *nifU* de *K. pneumoniae* se activan tanto por NifA como por NtrC, sin embargo los niveles de expresión con NifA son de 20 a 40 veces más altos. La delección de la copia única de NifA-UAS de cada uno de estos promotores reduce notablemente su activación por NifA, sin alterar la activación por NtrC (Buck y Cannon, 1989). Esto indica que en ausencia de una secuencia UAS, ambas proteínas activadoras poseen la misma capacidad restringida de promover la activación de este promotor, pero cuando la proteína específica, NifA, se coloca en una posición exacta en la misma cadena de DNA aumenta notablemente su especificidad. A diferencia de lo que se encuentra en *K. pneumoniae*, el promotor *nifH* de *R. meliloti* no depende tanto de la unión de NifA a UAS (Huala y Ausubel, 1989). El promotor *nifH* de *R. meliloti* se acerca más al consenso que el promotor *nifH* de *K.*

*pneumoniae*, lo que sugiere que la dependencia por los sitios de pegado a NifA puede ser un mecanismo de compensación de una unión débil a RpoN. Esto se demostró al modificar los nucleótidos -15 y -16 del promotor *nifH* de *K. pneumoniae*, de forma tal que al aumentar su homología con el promotor *nifH* de *R. meliloti* (y con el consenso), se disminuye su dependencia por la presencia de NifA-UAS (Buck y Cannon, 1989).

El mecanismo por el que las NifA-UAS compensan la falta de afinidad del promotor *nifH* de *K. pneumoniae*, es mediante la presentación del activador al complejo polimerasa-RpoN-promotor, facilitando su interacción y promoviendo mayor estabilidad en la iniciación de la transcripción. En el caso de este promotor, la distancia de DNA que separa al promotor de su NifA-UAS es exacta para que con un solo doblez ambas proteínas queden presentadas. Sin embargo, la tensión producida por este doblez dentro del DNA no permitiría que fuera suficientemente estable.

Hoover *et al* (1990) identificaron que la proteína IHF (Host Integration Factor), conocida por mediar la integración del bacteriofago lambda en el cromosoma de *E. coli*, así como otros procesos que requieren el doblamiento de DNA, participa en la activación de promotores RpoN dependientes, proporcionando la estabilidad necesaria en su presentación con las moléculas de NifA unidas a DNA. El efecto de IHF en la estimulación de la transcripción ha sido demostrado para promotores de diferentes organismos, incluyendo algunas Rhizobaceas, por lo que aparentemente se trata de un mecanismo general. La secuencia consenso para el pegado de IHF (a/TATCAA-N4-TTa/g) se encuentra entre el promotor y NifA-UAS, en el caso de las regiones regulatorias de los genes *nifHa* y *nifHb* de *R. phaseoli* cepa CFN42, aunque no existe una secuencia idéntica al consenso, sí se encuentra una región rica en AT alrededor de la posición -125, entre el promotor y NifA-UAS, por lo que es posible que también requiera IHF para su activación. En la figura 2 se presenta un modelo para la expresión de genes *nif* a partir de promotores RpoN-dependientes donde la proteína IHF se une a secuencias intermedias entre el promotor y NifA-UAS, facilitando la interacción de NifA con la polimerasa (Hoover *et al*, 1990).

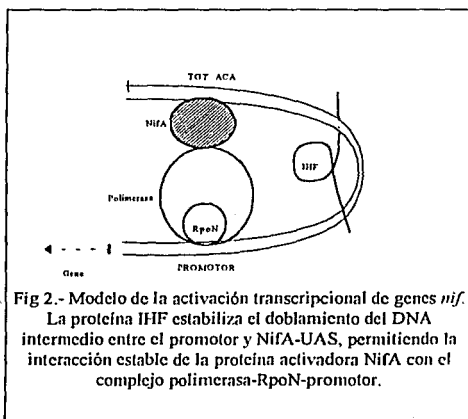


Fig 2.- Modelo de la activación transcripcional de genes *nif*. La proteína IHF estabiliza el doblamiento del DNA intermedio entre el promotor y NifA-UAS, permitiendo la interacción estable de la proteína activadora NifA con el complejo polimerasa-RpoN-promotor.

Como ya se mencionó NifA y NtrC son similares en cuanto a su función, pues ambos son activadores transcripcionales de promotores RpoN-dependientes, por lo tanto pueden sustituirse

el uno al otro, aunque con eficiencia reducida. Esta similitud proviene de un alto grado de similitud entre la secuencia de ambas proteínas. Al comparar la secuencia de estas dos proteínas, así como de otras con funciones similares (Drummond *et al*, 1986), se observó que algunos fragmentos estaban organizados como dominios con funciones específicas:

1.-El dominio amino terminal de NtrC está involucrado en la interacción con NtrB y contiene el sitio de fosforilación. Este dominio está conservado entre diferentes proteínas del sistema de dos componentes (DctD, OmpR, NusA, etc.). En el caso de NifA de *K. pneumoniae*, el dominio amino terminal está involucrado en la inactivación por NifL y aunque este mecanismo no existe en Rhizobaceas, existe similitud entre diferentes NifA. La homología entre NifA y NtrC es muy reducida en este dominio, concordante con las diferencias en los mecanismos de activación.

2.-El dominio central está muy conservado entre todos los activadores de promotores RpoN dependientes y se sabe que aún disectado es capaz de activar la transcripción (Morett *et al*, 1988; Huala y Ausubel, 1989).

3.-El dominio carboxilo terminal presenta la estructura hélice-vuelta-hélice, reconocida por su capacidad de interactuar con DNA y ha sido propuesta como el sitio de unión a las secuencias de estabilización (UAS) para la interacción con la polimerasa. En el caso de NifA, se demostró que éste dominio efectivamente se une a la secuencia TGT-N10-ACA (NifA-UAS; Morett *et al*, 1988).

En *K. pneumoniae* NifA regula la expresión del resto de los genes *nif* en respuesta a los estímulos ambientales mediante la regulación de su transcripción. Responde a la concentración de oxígeno por medio de la interacción con NifL y la expresión de *nifLA* está controlada por el grado de superenrollamiento del DNA, el cual a su vez es afectado por la transición aerobiosis-anaerobiosis. Por otro lado, responde a la disponibilidad de nitrógeno asimilable por medio de la activación de su transcripción por NtrC a partir del promotor RpoN-dependiente *nifLA*. Esta activación se lleva a cabo de manera cooperativa por la unión de dos moléculas de la proteína en dos secuencias NtrC-UAS débiles en la región anterior al promotor.

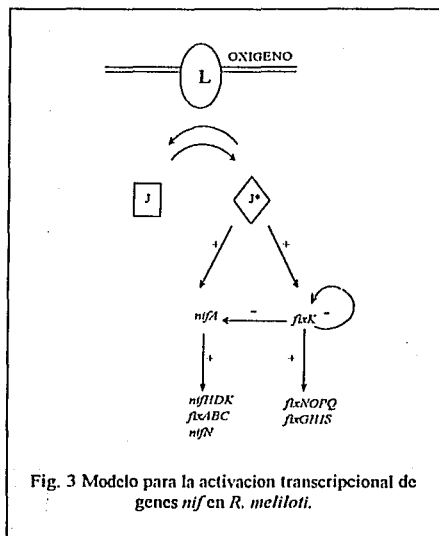
#### Regulación de la expresión de genes *nif* en *Rhizobium*.

Igual que en *K. pneumoniae*, la expresión de genes *nif* en bacterias de la familia de las Rhizobaceas es dependiente de la presencia de las proteínas RpoN y NifA. Sin embargo, los efectores del sistema regulatorio parecen ser diferentes: en *Rhizobium* la transcripción de los genes *nif* responde solamente a la concentración de oxígeno disuelto, y es insensible de la disponibilidad de fuentes de nitrógeno combinado. Esta diferencia puede tener fundamento en el hecho que las bacterias de esta familia fijan nitrógeno esencialmente para ser exportado a la planta y que éste es inmediatamente transportado lejos del bacteroide, por lo tanto, no hay necesidad de que la actividad de nitrogenasa necesite ser regulada por la presencia de amonio o de glutamina.

Los elementos que conforman el esquema de regulación de la expresión de genes *nif* en Rhizobaceas se han obtenido del estudio de bacterias de los géneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* y *Azorhizobium*. Aunque los tres sistemas comparten gran parte del mecanismo, presentan algunas particularidades. Por lo tanto me limitaré a revisar solamente a las especies más cercanas a *R. phaseoli*. Se ha trabajado de manera más completa en *R. trifolii*, *R. meliloti* y *R. leguminosarum*, y se ha encontrado que los elementos regulatorios de las tres especies son bastante similares.

En estas tres especies el gene *nifA* está localizado después de *fixABC* y antes de *nifB*. La transcripción de *nifA* es a partir del promotor RpoN-dependiente de *fixABC* o a partir de un promotor propuesto localizado entre ambos genes. Este promotor se obtuvo por comparación de las tres secuencias intercistronicas y se determinó como su secuencia mínima, TAATA/tTT, en la posición -30,-40 con respecto al inicio de la transcripción (Iisma y Watson, 1989).

En nódulo, la transcripción de *nifA* se autoregula positivamente, a partir del promotor *fixABC* y se ha demostrado en *R. meliloti* que se pueden alcanzar en cultivo los mismos niveles de expresión que en el bacteroide si se reduce la concentración de oxígeno disuelto (Ditta *et al*, 1987). Esta inducción ocurre aún en presencia de nitrógeno fijado y es debida a la activación del promotor TAATA/tTT, probable equivalente de un promotor  $\sigma^{70}$  en *Rhizobium*, por FixLJ (David *et al*, 1988). Estas proteínas pertenecen a la familia de sistemas reguladores de dos componentes, donde FixL fosforila a FixJ en respuesta a la concentración de oxígeno. La primera evidencia sobre la



regulación de la transcripción del promotor *nifA* de *R. meliloti* por la fuente de nitrógeno, aparentemente por medio de las proteínas reguladoras FixLJ fué obtenida recientemente por Noonan y colaboradores (1992).

En las Rhizobaceas la actividad de NifA responde a la concentración de oxígeno por medio de la oxidación de la misma proteína. Aparentemente ésta sensibilidad es mediada por la presencia de la secuencia CXXXXC, donde X puede ser cualquier aminoácido, entre el dominio central y el carboxilo terminal. Dado que se requiere de ambas cisteínas y la distancia entre ellas es crítica

para su función, pero no el tipo de residuos intermediarios, se ha propuesto que se trata un sitio de unión para un metal. En *B. japonicum* se demostró que la presencia de agentes quelantes en el medio de cultivo impiden la función de NifA (Morett *et al*, 1991).

Dependiendo de la presencia de la secuencia CXXXXC se ha clasificado a las proteínas NifA conocidas en dos grupos: 1) Las que la contienen: *B. japonicum*, *R. capsulatus*, *R. meliloti*, *R. trifolii*, *R. leguminosarum* *A. caulinodans*, *H. seropedicae*, y 2) Las que no la contienen: *K. pneumoniae* NifA, *A. chroococcum* NifA, *A. vinelandii* NifA, AnfA y VnfA.

Batut y colaboradores (1989) encontraron condiciones en las que FixLJ no bastaban para activar la expresión de *fixN* en *R. meliloti*. Esta observación llevó a la identificación de otra proteína regulatoria, el producto del gene *fixK*. Esta proteína, FixK, no activa la transcripción de *nifA*, sino que aparentemente la regula negativamente. Por comparación de secuencias, se encontró que tiene gran parecido a Fnr, proteína reguladora de la transcripción, sensible a la concentración de oxígeno disuelto. La expresión del gene *fixK* se autoregula negativamente y es dependiente del sistema FixLJ. Se han encontrado homólogos a *fixK* en *A. caulinodans* (Kamismki *et al*, 1991) y otras cepas de *R. meliloti* (Aguilar *et al*, 1987). En la Fig. 3 se presenta un modelo general de regulación de la transcripción para *Rhizobium meliloti* en el que se incluyen las proteínas conocidas.

## OBJETIVOS

Gran parte del conocimiento que tenemos del proceso de la fijación biológica del nitrógeno proviene del estudio de bacterias de los géneros *Klebsiella*, *Azotobacter* y *Bradyrhizobium*. Recientemente se ha comenzado a prestar atención al estudio de otros fijadores, especialmente de las *Rhizobaeaceas*, bacterias que fijan nitrógeno en simbiosis. Dentro de este género, se ha trabajado fundamentalmente en *R. meliloti*, *R. leguminosarum*, *A. caulinodans* y *B. japonicum*. En el Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, lugar donde se realizó el trabajo de esta tesis, existe un interés particular en el estudio de bacterias que interactúan con frijol (*Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, *Rhizobium tropici* y *Rhizobium etli*).

Nuestro grupo está comprometido con el estudio de la fisiología microbiana en general, y de la fisiología de *R. phaseoli* en particular. El proyecto en el que participo se enfoca al estudio de la fisiología de la fijación de nitrógeno de *R. phaseoli*, tanto en vida libre como en simbiosis con frijol. La principal justificación para este trabajo de tesis es la falta de conocimiento que existe sobre la regulación de los genes involucrados en la fijación de nitrógeno en la cepa CFN42 de *R. phaseoli*, lo que complementaría trabajos realizados en otras áreas. Hasta el momento solo existen antecedentes sobre el tema en tres trabajos producidos en el Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno:

- 1) El efecto de las reiteraciones de los genes para la nitrogenasa en la fijación simbiótica (Romero *et al*, 1988).
- 2) La actividad transcripcional de estos genes en nódulo (Morett *et al*, 1988b).
- 3) La localización de genes relevantes para el proceso (Girard *et al*, 1991 y 1993).

Por otro lado, otros proyectos desarrollados en este mismo Centro sobre diferentes aspectos de la biología de *R. phaseoli* (correspondientes a 25 artículos publicados), nos proporcionan las bases conceptuales necesarias para el desarrollo de proyectos ubicados en la frontera entre la genética y la fisiología, tal como el presentado en esta tesis.

Algunos de los antecedentes que fundamentaron el planteamiento de este proyecto se encuentran dentro del enfoque estructural en el estudio del genoma de *Rhizobium phaseoli*. Ahora sabemos que la estructura de su plásmido simbiótico presenta gran cantidad de secuencias reiteradas que promueven rearrreglos a alta frecuencia en el genoma de este organismo (Romero *et al*, 1991). Dentro de estas secuencias reiteradas se han identificado a los genes *nodD* y *nifHDK* (Girard *et al*, 1991).

La reiteración del gene *nifH* en *R. phaseoli* cepa CFN42 es especial, en cuanto que las tres copias son idénticas, este hecho despertó curiosidad desde que fueron identificadas (Quinto *et al*, 1982). Dos de estas copias están asociadas a genes *nifDK* y se demostró que se requieren ambas para una completa eficiencia simbiótica (Romero *et al*, 1988). Sin embargo, el porqué se

requieren dos copias de *nifHDK* para habilitar a *Rhizobium phaseoli* en un proceso que en cualquier otro género se realiza con solo una copia sigue sin conocerse. Aún más interesante es la existencia de la tercera reiteración de *nifH*, pues aparentemente no se encuentra asociada a genes *nifDK*.

Existen evidencias de la reiteración del gene *nifH* en otros organismos, *A. caulinodans* se ha demostrado que una de las copias se activa durante la simbiosis con *Sesbania rostrata*, mientras que la otra se activa en condiciones de vida libre. Esta regulación dual es importante para bacterias que nodulan tallo, ya que carecen de las fuentes de nitrógeno que se encuentran en el suelo y por lo tanto dependen de su crecimiento diazotrófico hasta el establecimiento de una simbiosis efectiva (Norel y Elmerich, 1987). En *C. pasteurianum* se ha demostrado la existencia de seis homólogos al gene *nifH*. Uno de estos es el gene estructural para la nitrogenasa reductasa, mientras que cuatro de los otros cinco se transcriben en condiciones de limitación de nitrógeno, aunque no se les ha propuesto ninguna función específica (Chen *et al*, 1986; Wang, *et al*, 1988). Se ha especulado que pudieran participar en algún sistema alternativo aún no caracterizado.

Existen resultados previos que sugieren que la tercera copia del gene *nifH* de la cepa CFN42 se expresa en nódulo más que las otras dos copias y que inserciones en este gene aparentemente no producen modificaciones en la actividad simbiótica de nitrogenasa (Morett, *et al*, 1988b). La diferencia en niveles de expresión no es discutida por los autores dado que los datos obtenidos son demasiado dispersos y que algunas de sus cepas sufrieron rearrreglos. La falta de fenotipo simbiótico de mutaciones en esta tercera reiteración fueron corroboradas por experimentos realizados bajo condiciones más controladas por Romero *et al* (1988). En un trabajo previo (Valderrama, 1989), demostramos que contigua a la tercera reiteración de *nifH* se encuentra otro homólogo al gene *nifD* de esta misma cepa. Esta nueva secuencia se encuentra conservada entre todos los demás aislados de *R. phaseoli* que probamos.

A partir de estos antecedentes nos planteamos las siguientes preguntas: ¿Cuál es la relevancia fisiológica de una copia independiente del gene *nifH*? ¿La proteína codificada por la nueva secuencia homóloga al gene *nifD* está involucrada con las proteínas de la nitrogenasa funcional? ¿Las diferencias en secuencias regulatorias entre las reiteraciones son reflejadas en su actividad transcripcional? ¿Puesto que están tan conservadas, existe alguna función para las secuencias contiguas a la tercera reiteración? ¿Cuáles son los mecanismos regulatorios de los genes *nifH* reiterados y cuál es su relevancia en el proceso simbiótico?

Para responder a estas preguntas, nos planteamos como objetivo de este trabajo el análisis fisiológico de los genes que codifican para las enzimas nitrogenasa (*nifDK*) y nitrogenasa reductasa (*nifH*) en la cepa CFN42 de *Rhizobium phaseoli*. Para llevarlo a cabo, se utilizaron dos enfoques complementarios:

- 1) La caracterización física de las regiones de DNA adyacentes a las tres copias de los genes *nifH* presentes en la cepa CFN42, con énfasis en la tercera reiteración, denominada región *nifHc*.
- 2) La regulación de la transcripción de las copias múltiples de los genes *nifH* en condiciones de cultivo y en simbiosis con frijol, por medio de la fusión con genes reporteros.



## RESULTADOS

Quinto *et al.* (1985) reportaron simultáneamente con la secuencia nucleotídica de las tres copias del gene *nifH* de la cepa CFN42 y la caracterización preliminar de sus regiones inmediatas. En ese trabajo encuentran secuencias homólogas a los genes *nifDK* por medio de hibridizaciones con detectores de *R. parasponia* en las regiones *nifHa* y *nifHb*. También confirmaron la extensión de la similitud entre diferentes regiones por medio de alineamiento de heteroduplex.

En un trabajo previo (Valderrama, 1989) detectamos la presencia de una nueva secuencia homóloga al gene *nifD* de la región *nifHb* de la misma cepa CFN42. Utilizando el gene *nifK* de la región *nifHb* como detector, solo encontramos las señales de hibridización reportadas. La nueva banda homóloga a *nifD* corresponde en tamaño con la región *nifHc*. Al hibridizar contra cada uno de los cósmidos que cubren el plásmido simbiótico de la cepa CFN42 (Girard *et al.*, 1991), determinamos que la nueva señal se encuentra efectivamente dentro del mismo fragmento de *BamHI* que el gene *nifHc*.

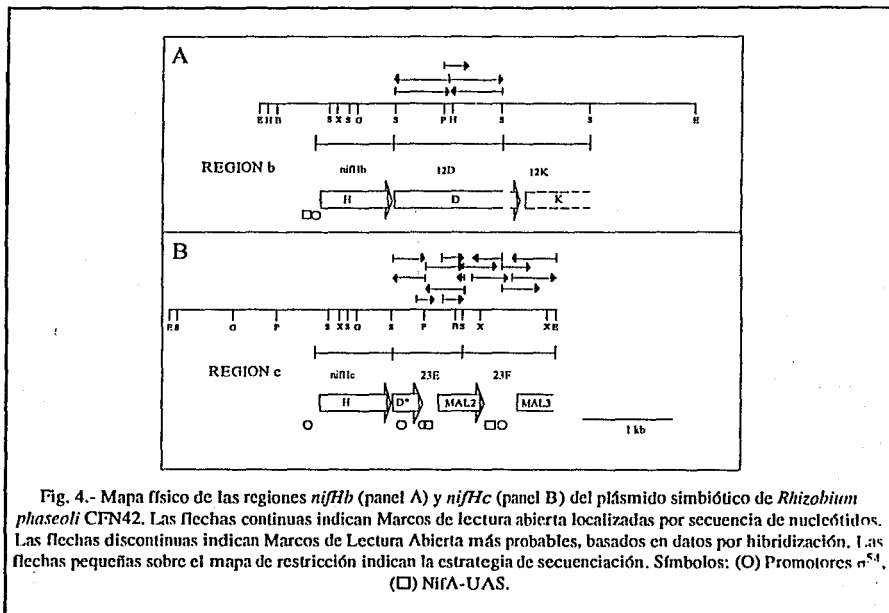
Basados en estas evidencias sobre la presencia de una nueva reiteración del gene *nifD* en la región *nifHc*, decidimos llevar a cabo su caracterización. Esta consistió en el desarrollo de dos enfoques complementarios:

- 1) La caracterización física de las regiones de DNA adyacentes a las tres copias de los genes *nifH* presentes en la cepa CFN
- 2) La regulación de la transcripción de las copias múltiples de los genes *nifH* en condiciones de cultivo y en simbiosis con frijol, por medio de su fusión con genes reporteros.

CARACTERIZACION FISICA DE LA REGION *NifHc*

Conservación de la región *nifHc* en diferentes aislados de *Rhizobium phaseoli*.

Para determinar la representatividad del patrón de hibridización *nifHDK* encontrado en la cepa CFN42 dentro de la especie *Rhizobium phaseoli*, se utilizaron fragmentos internos de *nifH* y los fragmentos 12D y 12K de la cepa CFN42, subclonados del plásmido pDEM12, como detectores (Fig. 4A). En la Fig. 5 (panel A, carriles 1 a 3), se presenta el patrón de hibridización de estos detectores contra DNA total de la cepa CFN42 digerido con la enzima *Bam*HI. Cuando se utiliza *nifH* como detector (carril 1) aparecen tres bandas de la misma intensidad que corresponden a las reiteraciones de este gene, denominadas *nifHa*, *nifHb* y *nifHc* (Quinto *et al*, 1985). Siguiendo la nomenclatura propuesta por Girard *et al* (1991), se trata de las bandas número 1, 25 y 13 respectivamente del plásmido simbiótico.



Cuando se utiliza el fragmento 12D como detector (carril 2) se encuentran las bandas correspondientes a las reiteraciones *nifHa* y *nifHb*, pero aparece una nueva banda más tenue que las otras dos y del mismo tamaño de la reiteración *nifHc*. Al utilizar al framento 12K como detector (carril 3), solamente aparecen dos bandas, correspondiendo a las reiteraciones *nifHa* y

*nifHb*. Un equivalente a este perfil de hibridación se encontró en todos los aislados de *R. phaseoli* que se analizaron. Una muestra de esos resultados son los paneles B-E (carriles 1-3), de la Fig 5. Aunque el tamaño de los fragmentos de restricción es característico de cada aislado, es evidente la conservación del patrón relativo de hibridación. Es interesante que en todos las cepas probadas, la banda más pequeña sea la que no posee copia de *nifK*. No sabemos a que puede deberse esta coincidencia.

También se analizaron cepas no reiteradas que infectan frijol clasificadas como *Rhizobium tropici* (Martinez-Romero *et al*, 1991), así como cepas de otras especies: *Rhizobium meliloti*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium loti*, *Bradyrhizobium loti*, *Bradyrhizobium spp.*, y *Rhizobium fredii*. En ninguna de ellas se encontró evidencia de señales de hibridación adicionales a los genes *nifHDK* (datos no mostrados).

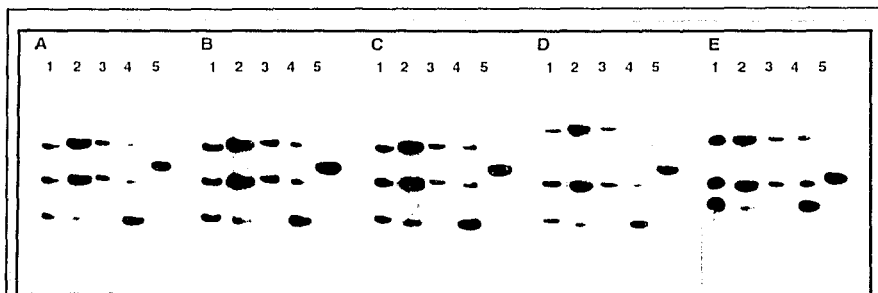


Fig. 5.- Perfil de hibridación de DNA total de cepas de *Rhizobium phaseoli* contra diferentes fragmentos de las regiones *nifHb* y *nifHc* provenientes de la cepa CFN42 (ver Fig. 4).  
Cepas utilizadas (panel): CFN42 (A), Nitragin 8251 (B), CFN227 (C), VikingI (D), CFN307 (E).  
Detectores (carril): *nifH* (1), p12D (2), p12K (3), p23E (4), p23F (5).

Para verificar la conservación de la región *nifHc* en cepas de *R. phaseoli*, se subclonaron los fragmentos *Sall* de 0.7 kb (23E) y *Sall-EcoRI* de 1.1 kb (23F) del plásmido pDEM23. En la Fig. 5 (panel A, carriles 4 y 5), se presenta el patrón de hibridación de estos fragmentos contra el DNA total de la cepa CFN42. Como se puede observar, cuando se utiliza el fragmento 23E como detector (carril 4), la señal más intensa es contra sí mismo, mientras que las señales contra las regiones *nifHa* y *nifHb* son de menor intensidad. Esta imagen es complementaria a la que se obtiene cuando se utiliza el fragmento 12D como detector, indicando que el fragmento 23E es el portador de la homología. Cuando se utiliza el fragmento 23F como detector (carril 5), solo se

detecta la señal contra sí mismo. Como este fragmento se encuentra posterior al sitio de *Bam*III, se trata de la banda 12 del plásmido simbiótico (Girard *et al.*, 1991).

Este perfil de hibridización se conserva en todos los aislados de *R. phaseoli* analizados (ver Fig 5, paneles B-E, carriles 4 y 5). Cuando se utilizó el fragmento 23E como detector contra las otras cepas de *Rhizobium*, solamente se revelaron las copias conocidas de *nifD*. No se detectó ninguna señal cuando se utilizó al fragmento 23F como detector (dato no mostrado). Los aislados de *R. phaseoli* que se presentan fueron seleccionados por provenir de diferentes partes del continente y estar distantes genéticamente entre sí (Piñero *et al.*, 1988), con el fin de demostrar que el perfil de hibridización *nifHDK* encontrado en la cepa CFN42 no se limita a una región determinada, sino que se encuentra asociado a la presencia de reiteraciones.

De este análisis podemos concluir que la presencia del nuevo tipo de reiteración del gene *nifH* encontrado en la cepa CFN42 es aparentemente una característica exclusiva de cepas de *R. phaseoli*, que es independiente del sitio de origen y que se encuentra ampliamente conservada.

#### Secuencia nucleotídica de la región próxima a *nifHc*

A partir de la identificación del fragmento 23E (Fig. 4) como el portador del nuevo homólogo de *nifD* en la región *nifHc*, se decidió secuenciar los 1847 nucleótidos localizados entre el sitio de *Sall* enseguida del final de *nifHc* y el siguiente sitio de *EcoRI*. Dentro del fragmento secuenciado identificamos tres Marcos Abiertos de Lectura: MAL1, del nucleótido 100 al 312, MAL2, del nucleótido 679 al 1434 y MAL3 del nucleótido 1785 hasta por lo menos el sitio de *EcoRI*. En la Fig. 6 se presenta la secuencia completa de esta región, donde los primeros seis nucleótidos corresponden al sitio de *Sall* que marca el final de la secuencia reportada por Quinto *et al.* (1985).

Determinamos la presencia de algunas secuencias con posibles funciones regulatorias entre los MALs: tres secuencias con el consenso mínimo para promotores RpoN-dependientes (GG-N10-GC, Morett y Buck, 1989): al frente del MAL2 (nucleótidos 150-165 y 292-305) y del MAL3 (nucleótidos 1656-1669). También se detectaron dos elementos *nifA*-UAS: una perfecta (TGT-N10-ACA) al frente del MAL3 (nucleótidos 1416-1431) y una imperfecta (TGT-N10-ACC) al frente del MAL2 (nucleótidos 301-316). Este último se superpone con uno de los promotores (Figs. 4 y 5). Resultados preliminares que indican que el MAL2 se transcribe activamente en nódulo y la presencia de las secuencias regulatorias específicas para fijación de nitrógeno esta zona, nos indican que al menos uno de los tres marcos encontrados pudiera ser un gene *fix*.

En 1985 (Quinto *et al.*) se reportó que las secuencias regulatorias de las tres copias de *nifH* son idénticas por lo menos hasta el nucleótido -100 con respecto al codón de iniciación. Dentro de este fragmento de identidad se localizó un promotor RpoN-dependiente en el nucleótido -75. Las regiones *nifHa* y *b* son idénticas por lo menos hasta el nucleótido -200, mientras que la región *nifHc* diverge en el nucleótido -100. Por lo tanto, existe un elemento *nifA*-UAS consenso en el nucleótido -181 es solo en las regiones *nifHa* y *b*. En los 550 nucleótidos previos al codón de

RESULTADOS

	10	20	30	40	50	60
Sali						
	GTGCACAGGAGCGCGCTGGCCCTTTCGGCCAGCGCGTCTCTTCCAAGAAAGCCGCTTCGGCGA					
	CGAACACCTTAACCCGAACCTTGAAGAGGGGGAGGGGCCATGAGCCCTTCAATTACGAAAT					
						H S L D Y E N
	GACAGCGTTTTCGATGAACAGCTCATTTGGCGGAGTATTAGCCGANTATCCAGACAAGCGG					
	D S V L H E Q L I A E V L A Q Y P D K A					
	GGAAAGCGCCCAAGAAGCACTCAGCGTTCGCAACGAGCGCGCAGCAGCGCTGGCGATGAG					
	A K R R R K K H L S V A T S G D E P G D E					
	CCGAAGGCCCTTTCGGAATGCGACGCTCAAAATCGAACAATCAAGTCCATTCCGGCCATGGCA					
	P K A L S E C D V K S N I K S I P G V A					
	<u>TGTGCCCAATAGCACCGCTTTCGAAGGAAAAAACGTGCAAAATATGATATGTGAACG</u>					
	<u>C A Q</u>					
	TGACACGGACTGCAGGCGAAAGTCTTTGGCGCGCACCGCTCGTGCATTTTCGTTCCGAAAC					
	AAATAGCGGGGGCGAGTTGCCCTTGGTATATCTATCTACCCAAACAATACAGGAGTTTCTCC					
	AGAAATCGGGCCCACTTATGAGCAATGGCTGAGAGAGCTAGGGAACGTGATGACCGCTGT					
	CTGGCTCTATCTCCCACTCCATCTCCGGCTCGAATGGTGGTATGGTGGTTTCCGAC					
	TAGACTCACCTGTCGGGACACTTGTATAACCGATATCTAGCAATGCTCCGCGAGGAAT					
	CCGCTGGTGGCGGACCAATGGCGGAGGCACTCTCCGTGGTGCAGTGCACCTTTCGGCGG					
						H P Q A L S V G D V H F G G
	GGATCCCGACCAATTAAGCATCGGCAGACTTCCTGTTCGCTAATGGAACCTCCATGGCGGG					
	G S P T I M P S A D F L S L M E L L R G					
	CGTTTTCGCTTGGAGGAGTCAACCAATTTGCCCTTGGAGTTCGACCCGGCGCAGTTCACC					
	R F A L E R G A T I A V E E V D P R T F T					
	ACCGATAAGCCGAAGCCCTAGAAAGAACCGGTGGAATGGCGCAAGCCTCGGTGTGCGAG					
	T D H A E A L E R T G V H R A S V G V Q					
	AGCTTTCGATCCGTCGTACAAAAAGCGATCAACCGGATTCAGAGCGAGGCGCAAGTGTATG					
	S F D P V V Q K A I H R I Q S E A Q V M					
	ACCGCGTCGAAAACCTCCGGCTGTATGGGGTCAGGCGTATCAAATTCGACTTGAATGTTT					
	T A V E N L R L Y G V R R I N F D L N F					
	GGTTTCGGAACCAAACCGTCCAGTCCGTCTTCGAGAGCGCTATGTTAGCTATTGCGATG					
	G L P N Q T V Q S C L E S A M L A I A M					
	CGTCCGACCGCTTCGGGTTTTCGGTATTTCCACGTTCCATCTTTTCGAAAAATCAG					
	R P D R L A V P G Y S H V P S F R K N Q					
	CGCTTGAATGACACAGCAGCACTGGCCGATATAGCCGGGAGCTGAGCAGGCTCAGCC					
	R L I D T A A L P D I A A R A E Q A S A					
	ATGGCCGATACGTTAGTTGACGAGGCTATTCGCAATTTGGTCTCGACCAATTTGCTTTG					
	H A D T L V A A G Y L Q I G L D H F A L					
	CCGGATGACGAGCTTGCAAATAGCACAGAGGCTGGTCTTCGCCGAAATTCGCTTCGT					
	P D D E L E L A I A Q R A G R L R R N S L G					
	TACTTCGCGAAACCTGCTCAACTGTCATCGGTTTGGCGCTCCGCCATTTGGTCGTTGG					
	Y S A E T C S T V I G L G R P P L V V A					
	GGCAGGTTTACGTTCAAAAACGATCTCACGCAAGCTGTATAACCGGCACATGACATCCG					
	A T V T F K T I S R K A V I T G T					
	GCCGCTTGGCGATCTCAAGGGGCTACCCTTTAGCTACCGAGGATCGCGTAAGAGCTGCCAA					
	TCATCGAACAGCTCATGTGCTACTTGGAGGGCGGCAATATCAGCAATCTGTACGGCTCAGG					
	GATTTGATCAGACCCATCTAGTATTCAGCTTAAGCAGCTAGAGATTCGGCTCAGGATGG					
	ACTGTTGATTTGACAAACGGTTTGTGATGCTGTCGGCAGGACCTTCGCTCTGCCCTTCG					
	CCATGTCGCTGGCCGGTTTCGATGCTTATCTTGGCCCGCAGCCGATCTAGACTGGCAACG					
	GAGGACCTTGGAGTATCACTTAATCGAGCTCGAGTTCGTCGAGATGTTAGGCAGAGGGC					
						H L G R R Q
						EcoRI
	AAGCCCCAATTTGCTCGATTTTAAATCGATCGGGCTGCAGGAATTC					
	A P N C S I L N R S R L Q E F					

Fig. 6. Secuencia completa de los fragmentos posteriores al gen *nifHc*. Los promotores propuestos se presentan subrayados y los posibles elementos NifA-UAS se presentan resaltados.

iniciación de *nifHc* solo se encuentra el promotor RpoN-dependiente ya mencionado. Aparentemente no existen secuencias para el pegado de NifA en esta región (Datos no mostrados).

Secuencia nucleotídica parcial del gene *nifDb* de *R. phaseoli* CFN42.

Dado que sabemos que las secuencias de los tres genes *nifH* de la cepa CFN42 se encuentran reiterados, al encontrar un homólogo a un gene *nifD* en esta cepa nos planteamos la pregunta de si esta nueva secuencia sería idéntica a sus equivalentes funcionales dentro del plásmido simbiótico. Con el fin de conocer la secuencia del gene *nifDb*, se subclonaron derivados del plásmido p12D que proviene de la región *nifHb* con la estrategia mostrada en la Fig. 4A. Tal como se muestra en la Fig. 7, esta secuencia codifica para un marco de lectura abierta de 986 nucleótidos, que se inicia en el nucleótido 98 con ATG y no se encuentra codón de terminación hasta donde se terminó de secuenciar.

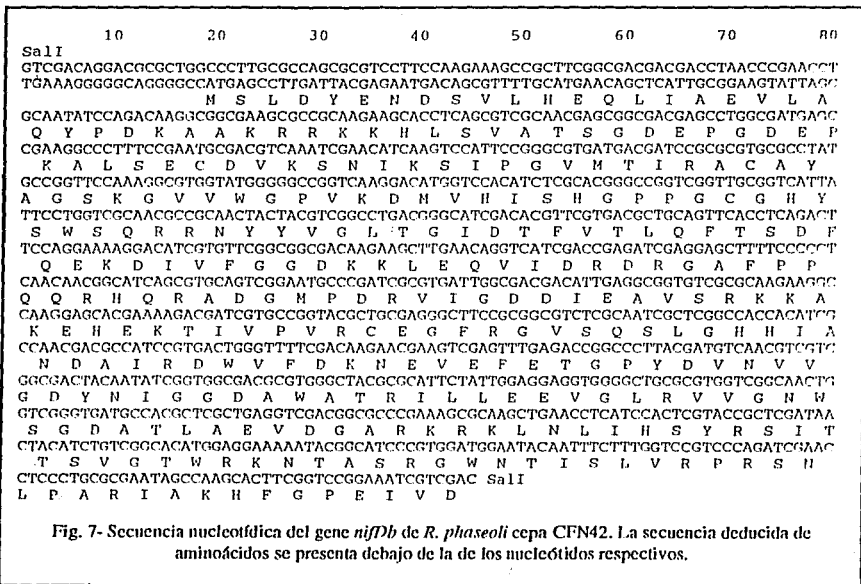


Fig. 7- Secuencia nucleotídica del gene *nifDb* de *R. phaseoli* cepa CFN42. La secuencia deducida de aminoácidos se presenta debajo de la de los nucleótidos respectivos.

Comparación entre las secuencias de las regiones *nifHb* y *nifHc*.

En la Fig. 8 se muestra el alineamiento resultante de comparar las secuencias obtenidas para el gene *nifD* y para el MAL1 de la cepa CFN42. Encontramos que los primeros 292 nucleótidos son idénticos y que solo difieren en los últimos 15 nucleótidos del MAL1, a partir de donde divergen

completamente. La proteína codificada por el MAL1 corresponde a los primeros 70 residuos del amino terminal de la subunidad  $\alpha$  de la nitrogenasa, donde los primeros 66 son idénticos al producto de *nifDb*. Los últimos cuatro corresponden a la diferencia en secuencia nucleotídica al final del MAL1. A partir de la identidad encontrada, designamos al MAL1 como *nifD\**.

La identidad se extiende a la zona entre *nifH* y *nifD* en ambas regiones, excepto por una deleción de un nucleótido de la región *nifHb* (correspondiente a la posición 63). Como se ha demostrado previamente, los genes *nifHDK* de las regiones *nifHa* y *nifHb* están organizados como operones (Segovia, 1989). Dado que la región intercistronica de la región *nifHc* es idéntica, es razonable considerar que los genes *nifHD\** también estén organizados en una sola unidad transcripcional, muy probablemente regulada por el promotor RpoN-dependiente anterior a *nifHc*.

# RESULTADOS

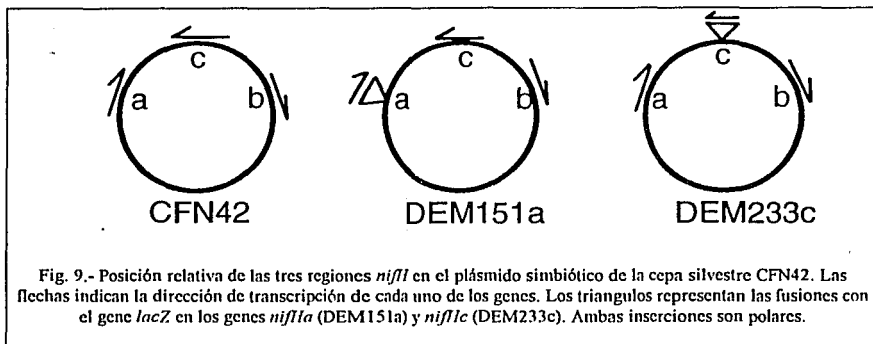
Sali	10	20	30	40	50
D <sub>b</sub>	GTCGACAGGACGGCGTGGCCCTTGGCCAGCGCGCTCCTTC AAGAAAGCC				
D*	.....				
D <sub>b</sub>	GCTTCGGCGACG .ACGACCTAACCCGAACCTTGA AAGGGGCGAGGGCCA				
D*	.....A.....				
	N				
D <sub>b</sub>	TGAGCCITGATFACGAGAATGACAGCGTTTGGCATGAACAGCTCATTTGCC				
D*	.....				
	S L D Y E N D S V L H E Q L I A				
D <sub>b</sub>	GAAGTATTAGCGCAATATCCAGACAAGGGCGGAAGCGCCGCAAGAAAGCA				
D*	.....				
	E V L A Q V P D K A A K R R R K K H				
D <sub>b</sub>	CCTCAGCGTCGCACGAGCGGGCGACGAGCCTGGCGATGAGCCGAAGGCC				
D*	.....				
	L S V A T S G D E P G D E P K A L				
D <sub>b</sub>	TTTCCGAATGGCAGCTCAAAATCGAACATCAAGTCCATTCCGGCGTGATG				
D*	.....TGCCA				
	S E C D V K S N I K S I P G V M				
D <sub>b</sub>	ACGATCCGCGCGTGGCCCTATGCCGGTTCCAAAGGCGTGATGCGGGCC				
D*	.....TGTGC .AATA.				
	T I R A C A Y A G S K G V V W G P				
	C A Q -				
D <sub>b</sub>	GGTCAAGGACATGGTCCACATCTGGCAGGGCGGTTCGGTTCGGGTCAIT				
	V K D M V H I S H G P P G C G H Y				
D <sub>b</sub>	ATTCCITGGTCGCAACGGCGCACTACTACGTCCGGCTGACGGGCATCGAC				
	S W S Q R R N Y Y V G L T G I D				
D <sub>b</sub>	ACGTTCTGTACCGTGCAGTTCACCTCAGACTTCAGGAAAAGGACATCGT				
	T F V T L Q P T S D F Q E K D I V				
D <sub>b</sub>	GTTCCGGCGGCAAGAAAGCTTGAACAGGTCAATCGACCGAGATCGAGGAG				
	F G G D K K L E Q V I D R D R G A				
D <sub>b</sub>	CTTTCCCECTAACCAAGCGCATCAGCGTGCAGTCGGAATGCCGATCGC				
	F P F Q Q R H Q R A D G H P D R				
D <sub>b</sub>	GTGATTCGGCAGCATTGAGCCGGTTCGGCAAGAGGCCAAGGAGCA				
	V I G D D I E A V S R K K A K E H				
D <sub>b</sub>	CGAAAAGAGATCGTGGCGCTACCTGCGAGGCGTTCGCGCGGTTTCGC				
	E K T I V P V R C E G F R G V S Q				
D <sub>b</sub>	AATCGCTCGGCCACCACTCGCCAAAGCAGCCATCCGTAACCTGGGTTTTC				
	S L G H H I A N D A I R D W V F				
D <sub>b</sub>	GACAAGCAAGAGTGGAGTTGAGACCGGCCCTTACGATGTCAA CGTGT				
	D K N E V E F E T G P Y D V N V V				
D <sub>b</sub>	CGGCGACTACAAATACGGTCCGACCGCTTCGGCTACCGCAATCTATTGG				
	G D Y N I G G D A W A T R I L L E				
D <sub>b</sub>	AGGAGTGGGCTGCGGTGATTCGGCAACTGCTGGGTGATGCCACGCTC				
	E V G L R V V G N W S G D A T L				
D <sub>b</sub>	GCTGAGGTCGACGGGCCCAAGCGCAAGCTGAACCTCATCCACTCGTA				
	A E V D G A R R K L H L I H S Y				
D <sub>b</sub>	CCGCTCGATATCTACTCTCTTCGACATCGAGGAAAATACGGCATGCC				
	R S I T T S V G T W R K N T A S R				
D <sub>b</sub>	GTGGATGGAATACAATTTCTTCCTCCGATCGAACTCCCTGGG				
	G W N T I S L V R F R S N L P A				
D <sub>b</sub>	CGAATAGCCAAGCACTCGGTCGGGAAATCGTCGAC Sali				
	R I A K H F G P E I V D				

Fig. 8.- Comparación del gene *nifD<sub>b</sub>* y de la secuencia *nifD\**. Las secuencias de aminoácidos deducidas se presentan debajo de las de nucleótidos.



CARACTERIZACION FUNCIONAL DE LA REGION *nifHc*Análisis de expresión de las fusiones *nifHa::lacZ* y *nifHc::lacZ* en cultivo.

Para cubrir el segundo objetivo, sobre el estudio de la regulación de la transcripción de los genes para la nitrogenasa, construimos fusiones transcripcionales de los genes *nifHa* (DEM151a) y *nifHc* (DEM233c) con el gene reportero *lacZ*, que codifica para la enzima  $\beta$ -galactosidasa (Fig. 9; Material y Métodos). Se escogió este reportero por su fácil ensayo de determinación, y sobre todo, para poder comparar directamente con los resultados de trabajos equivalentes en otras especies de *Rhizobium* (Virts *et al*, 1988; Huala *et al*, 1989; Noonan *et al*, 1992)



La nitrogenasa es extremadamente sensible a daño por oxidación, por lo tanto, la concentración de oxígeno disuelto es uno de los principales reguladores para estas enzimas (Dean y Jacobson, 1992). Se sabe que este es uno de los efectores más comunes para la regulación del inicio de la transcripción de genes *nif* (ver Introducción). Considerando lo anterior, analizar la expresión de los genes con fusiones transcripcionales en las cepas DEM233c y DEM151a en diferentes concentraciones de oxígeno disuelto era obvio. Para lograr esto, se implementó la metodología necesaria para la exposición de cultivos de *R. phaseoli* a diferentes condiciones atmosféricas. Después de realizar una serie de experimentos preliminares, decidimos restringir el presente estudio a la medición de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa durante el crecimiento en medio mínimo adicionado con succinato y cloruro de amonio. En la Fig. 10 se presenta la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de las cepas CFN42, DEM233c y DEM151a a las 8 horas de crecimiento bajo diferentes concentraciones de oxígeno. La actividad basal de la cepa silvestre se mantuvo siempre a niveles despreciables, mientras que las actividades de las fusiones fueron significativamente diferentes.

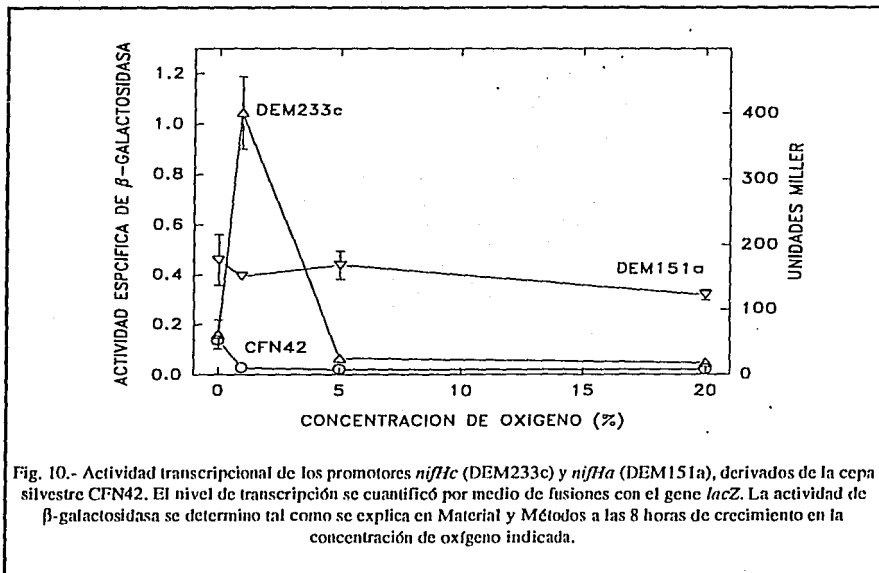


Fig. 10.- Actividad transcripcional de los promotores *nifHc* (DEM233c) y *nifHa* (DEM151a), derivados de la cepa silvestre CFN42. El nivel de transcripción se cuantificó por medio de fusiones con el gene *lacZ*. La actividad de  $\beta$ -galactosidasa se determinó tal como se explica en Material y Métodos a las 8 horas de crecimiento en la concentración de oxígeno indicada.

Como se puede observar en esta figura, la actividad de  $\beta$ -galactosidasa en la cepa DEM233c se induce exclusivamente en bajas concentraciones de oxígeno (1%), mientras que la actividad en la cepa DEM151a es independiente de la concentración de oxígeno utilizada. La actividad basal en ésta última cepa es dos a tres veces más alta que la de la cepa DEM233c, desde las cero horas en medio mínimo. La actividad en la cepa DEM233c mantiene una pendiente constante durante 12 horas de crecimiento en estas condiciones (Fig. 11), como sabemos que a las doce horas de cultivo comienza a terminarse el oxígeno disuelto, detuvimos la determinación de la actividad en este tiempo (datos no presentados).

#### Fenotipo de las cepas DEM233c y DEM151a de *R. phaseoli* en simbiosis.

Para realizar el análisis de las cepas CFN42 y sus derivadas con fusiones en el gene *nifH* DEM233c y DEM151a en simbiosis, se inocularon semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* cv Negro Jamapa). Como se muestra en la Fig. 12A, los extractos de nódulos producidos por la cepa DEM233c presentan una actividad de  $\beta$ -galactosidasa diez veces mayor que los producidos por la cepa DEM151a en todos los tiempos probados. La actividad basal presente en los nódulos de la cepa silvestre es 100 a 1000 veces menor que la de los nódulos de las cepas con fusiones.

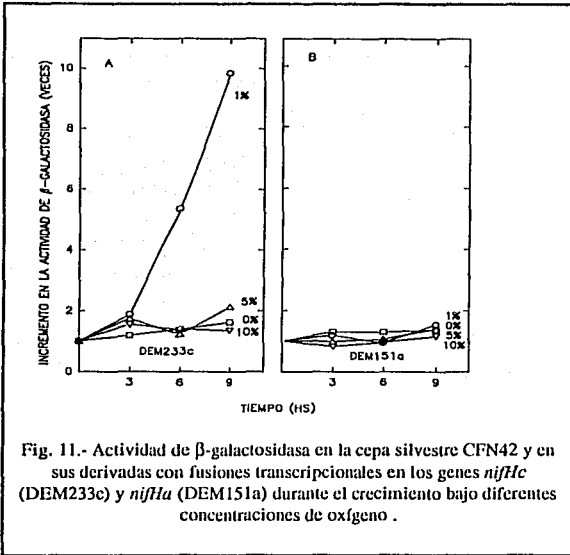


Fig. 11.- Actividad de  $\beta$ -galactosidasa en la cepa silvestre CFN42 y en sus derivadas con fusiones transcripcionales en los genes *nifHc* (DEM233c) y *nifHa* (DEM151a) durante el crecimiento bajo diferentes concentraciones de oxígeno.

Para conocer el efecto de estas mutaciones sobre la eficiencia simbiótica, se midió la actividad específica de nitrogenasa en plantas inoculadas con la cepa silvestre o con las derivadas con fusiones a los 13, 18 y 24 días (Fig. 12B). La cepa CFN42 presenta la cinética normal de la nitrogenasa en nódulos de frijol, teniendo un máximo de actividad a los 18 días (Hungria *et al*, 1991). La actividad de nitrogenasa en *R. phaseoli* es el resultado de la expresión de las dos copias de los genes *nifHDK*, donde cada una aporta la mitad de la actividad (Fig. 9;

Romero *et al*, 1988). La cepa DEM151a contiene solamente la copia *nifHDKb* funcional, por lo que se esperaba una actividad de nitrogenasa menor que en la silvestre. En la Fig. 12B se puede observar que esta cepa mutante alcanza solamente el 40% de la actividad de la cepa CFN42 a los 18 días después de inocular. La cepa DEM233c presenta la misma actividad de la cepa silvestre a los 18 y 25 días. La diferencia de actividad a los 13 días no es significativa, según se demostró en experimentos posteriores (Fig. 13).

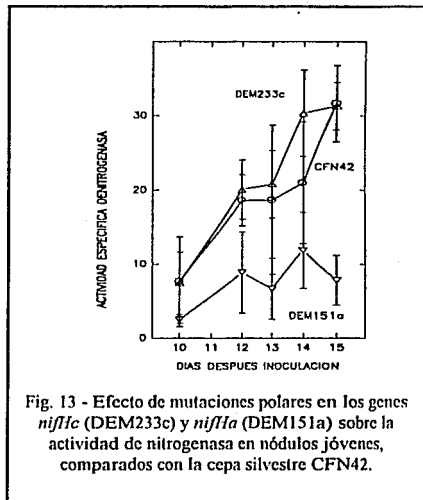
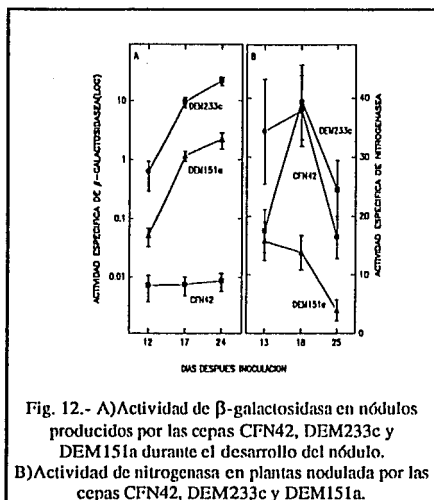
Sobre los resultado obtenido del estudio de las cepas con fusiones en los genes *nifHa* y *nifHc*, podemos concluir:

1.- Los genes *nifHb* y *nifHc* son dispensables durante el crecimiento en cultivos líquidos, tanto en medio rico como en medio mínimo bajo cualquiera de las concentraciones de oxígeno estudiadas.

2.- La expresión a partir de la región promotora del gene *nifHa* no parece estar regulada por la concentración de oxígeno disponible.

3.- La expresión a partir de la región promotora del gene *nifHc* está regulada finamente por la concentración de oxígeno disponible.

4.- Durante simbiosis, la expresión a partir de la región promotora del gene *nifHc* es diez veces mayor que la del gene *nifHa*.



## DISCUSION

En esta tesis se presenta la organización física y el análisis funcional de las diferentes copias del gene *nifH* (nitrogenasa reductasa) de *Rhizobium phaseoli* cepa CFN42. La reiteración de los genes para la nitrogenasa es una característica común entre poblaciones de *R. phaseoli* (Martínez *et al*, 1985). Se ha demostrado que la cepa CFN42 requiere que ambas copias de los genes *nifHDK* sean funcionales para desarrollar una capacidad simbiótica total (Romero *et al*, 1988; Morett *et al*, 1988b). No se saben las razones por las que se necesitan dos copias de los genes para la nitrogenasa en *R. phaseoli*, mientras que en la mayor parte de los demás organismos estudiados basta con una sola. Una alternativa es que debido a baja actividad catalítica de la nitrogenasa se requiera una mayor concentración de proteína, esto es poco probable debido a la alta similitud entre las proteínas NifH y NifD con las de otros microorganismos, pero no podemos descartarlo, pues nunca se ha purificado la nitrogenasa de esta cepa.

Una segunda alternativa es que los genes *nifHDK* reiterados posean una baja tasa de transcripción intrínseca, y como compensación, se requiera aumentar la dosis génica para tener la misma actividad que en otros organismos. Tal como se mencionó en la Introducción, todos los promotores RpoN-dependientes conocidos comparten una secuencia mínima, y mientras más parecidos sean al consenso, mayor es su afinidad por el factor  $\sigma^{54}$  y menor su dependencia por NifA-UAS. Al alinear el promotor *nifH* de *R. meliloti*, el de las tres copias del gene *nifH* en la cepa CFN42, y las secuencias homólogas presentes en la región contigua al gene *nifHc* (mostradas en la Fig. 6), encontramos que el promotor *nifH* y el localizado en la posición 1656-1669 son suficientemente homólogos al consenso (15/17 y 14/17) como para ser promotores fuertes (Fig. 14). Sin embargo, debido a que los datos disponibles como referencia sobre la expresión del promotor *nifH* de *R. meliloti* fueron obtenidos en situaciones artificiales, en plásmidos multicopia o con sobreexpresión de *nifA*, y por lo tanto no podemos comparar directamente las tasas de expresión.

Consenso	C/T	T/G	G	G	C/T	A/C	C/T	G/A	G/A	C/T	CAT	T/G	T/C	T/C	G	C/A	A/T
Rme <i>nifH</i>	C	T	G	G	C	A	C	G	A	C	T	T	T	T	G	C	A
Rph <i>nifH</i>	A	T	G	G	C	A	C	G	G	G	T	T	T	T	G	A	A
150-165	G	C	G	G	A	A	G	T	A	T	A	G	C	G	C	A	A
292-305	C	C	G	G	G	C	G	T	G	C	A	T	G	T	G	C	C
1656-1669	G	C	G	G	C	A	C	G	A	A	C	G	T	C	G	C	T

Fig. 14.- Comparación de la secuencias consenso y del promotr *nifH* de *R. meliloti* (Morett y Buck, 1989), con los promotores detectados en los genes *nifH* de *R. phaseoli* cepa CFN42 o en la región contigua al gene *nifHc* (Quinto *et al*, 1985 y Fig. 6). Los residuos homólogos al consenso están resaltados.

### Organización de la región *nifHc*.

Basados en observaciones preliminares sobre la existencia de una tercera secuencia homóloga al gene *nifD* (subunidad  $\alpha$  de la nitrogenasa, Valderrama, 1989), se subclonaron los fragmentos de DNA posteriores al gene *nifHc*. En un primer acercamiento, se demostró que estos fragmentos se encuentran extensivamente conservados en aislados de *R. phaseoli* provenientes de diferentes puntos del continente (Fig. 5, Martínez *et al*, 1985). No detectamos señales homólogas en cepas provenientes de otras especies o de otros géneros. Esto nos permite concluir que el perfil de organización de los genes para la nitrogenasa entre aislados provenientes de diferentes lugares del continente y lejanos genéticamente entre sí (Piñero *et al*, 1988), no se conserva solamente en cuanto a la presencia de reiteraciones, sino en cuanto al ligamiento físico de otras secuencias (el gene *nifD*\* y los MAL1 y 2).

Para completar el análisis estructural, se determinó la secuencia nucleotídica de los fragmentos contiguos al gene *nifHc* (ver Fig. 6). Analizando esta secuencia se infiere la existencia de tres marcos abiertos de lectura. El primero es un gene *nifD* truncado, con potencial para codificar los primeros 70 aminoácidos del dominio amino terminal de una subunidad  $\alpha$  de la nitrogenasa. Dada la idéntidad de secuencia entre las regiones intercistricónicas *nifHDb* y *nifHD*\*, proponemos que también estos últimos se cotranscriben, y ya estamos llevando a cabo los experimentos necesarios para demostrar la existencia de la proteína NifD\*.

La presencia del gene *nifD*\* es interesante, no solo debido a su idéntidad con respecto al gene *nifDb* (Fig. 8), sino además, porque como una consecuencia de la expresión diferencial de los dos promotores *nifH* en algunas de las condiciones aquí estudiadas, se obtendría una alta concentración relativa de las proteínas NifD\*/NifD. Considerando lo complejo del ensamblaje de una nitrogenasa funcional, tal como se describió en la Introducción, altas concentraciones de NifD\* podrían competir con NifD en la formación de los tetrameros ( $\alpha^2\beta^2$ ) con el potencial de generar multímeros híbridos ( $\alpha^*\beta^2$  ó  $\alpha\alpha^*\beta^2$ ). Se ha descrito que combinaciones con monómeros truncados tiene un efecto modulador sobre la actividad de complejos enzimáticos en otros sistemas (Nakabeppu y Nathans, 1991; Andrew *et al*, 1991). Sin embargo, aunque se ha demostrado que mutaciones polares en *nifHc* no tienen efecto en la actividad de nitrogenasa en simbiosis (Romero *et al*, 1988; Morett *et al*, 1988b), es de esperarse que un fenómeno de competencia como el que proponemos solo pueda observarse cuando exista un exceso de NifD\*. Dado que no hemos podido encontrar la condición natural para demostrar esto, estamos realizando construcciones que nos permitan sobreproducir NifD\* en nódulo.

Los otros dos MALs detectados en la región *nifHc* se transcriben en la misma dirección que *nifHD*\* (Figs. 4 y 6). Al frente de ellos se encuentran secuencias semejantes a secuencias regulatorias típicas de genes involucrados en la fijación de nitrógeno (promotores  $\sigma^{54}$  y NifA-UAS). Resultados preliminares indican que el MAL2 se transcribe en nódulo. Con el fin de

asignarles identidad, se buscaron secuencia homóloga a estos dos genes y a las proteínas que codifican en las bases de secuencias GenBank y SwissProt. Se detectó un fragmento de 520 pares de bases que contiene a los genes *nodABC* de *R. fredii* y que presenta una homología de 70% con el MAL2 (Krishnan y Pueppke, 1991). Este fragmento de *R. fredii* también se encuentra representado en *B. japonicum* y *A. tumefaciens*. Los autores del trabajo proponen que esta región pudiera tener una función de movilización dada la presencia significativa de secuencias repetidas, que recuerdan las encontradas cerca de elementos transponibles. El fragmento homólogo en la comparación de ambas secuencias corresponde tanto a la región previa como a la porción codificadora del MAL2, por lo que no podemos interpretar nuestros datos de la misma manera, pues implicaría dividir al MAL2.

#### Regulación transcripcional de los genes *nifH* y *nifHc*.

Los promotores RpoN-dependientes, del tipo de los encontrados en la cepa CFN42, requieren de una proteína activadora para llevar a cabo la iniciación de la transcripción de los genes que regulan (Kustu *et al*, 1989). El factor de transcripción  $\sigma^{54}$  acopla específicamente la RNA-polímera a la secuencia de promotores RpoN-dependientes, pero no basta para llevar a cabo la separación de la doble cadena (Morett y Buck, 1989). En el caso de los genes para la nitrogenasa, se sabe que la proteína activadora de la transcripción es el producto del gene *nifA* (Merrick, 1992).

La función de NifA es el controlar la expresión de los genes involucrados en la fijación de nitrógeno en respuesta al nivel de oxígeno disuelto (Merrick, 1992). En *R. phaseoli* se ha determinado la localización de un homólogo de *nifA* de *K. pneumoniae* en el plásmido simbiótico (Girard *et al*, 1991). Recientemente se aisló y se demostró su funcionalidad al complementar una cepa *nifA*<sup>-</sup> para la expresión de un gene dependiente de NifA (Girard *et al*, 1993).

Todos los genes para la nitrogenasa encontrados en eubacterias están bajo el control de un promotor RpoN-dependiente que se activa por NifA. Como consecuencia, la transcripción de todos ellos responde a la concentración de oxígeno del medio, tal como ha sido demostrado en algunos organismos (Norel y Elmerich, 1987; Virts *et al*, 1988; Huala *et al*, 1989). En diazotrofos los genes de la nitrogenasa también responden al estado nutricional de la célula (ver Merrick, 1992), aunque esto es a través de la regulación de la expresión de NifA, por la proteína NtrC. Solo se conoce un caso equivalente dentro de la familia de las Rhizobaceas, recientemente reportado para *R. meliloti* (Noonan *et al*, 1992).

En *Rhizobium phaseoli* cepa CFN42, las copias funcionales de los genes para la nitrogenasa, *nifHDKa* y *nifHDKb* contienen las secuencias regulatorias ya mencionadas (Fig. 4; Quinto *et al*, 1985): un promotor RpoN-dependiente (ATGGCACGGGTTTTGAA) en la posición -74 y una NifA-UAS perfecta (TGT-N10-ACA) en la posición -178. La tercera copia, *nifHc*, difiere de las

otras dos en que solo posee el promotor RpoN-dependiente y no contiene NifA-UAS, por lo menos hasta el nucleótido -550. Como mencionamos previamente, este promotor es homólogo en 15/17 nucleótidos con el promotor consenso, y por lo tanto es probable que sea un promotor fuerte, o sea, que su activación sea parcialmente independiente de NifA.

Para llevar a cabo el análisis de expresión de los promotores *nifH*, construimos dos derivadas de la cepa silvestre CFN42 conteniendo fusiones transcripcionales en los genes *nifHa* (DEM151a) o *nifHc* (DEM233c) tal como se muestra en la Fig. 9. Se probó la capacidad de expresión de  $\beta$ -galactosidasa de estas cepas en microaerobiosis en medio mínimo (Fig. 10). En estas condiciones encontramos que la cepa DEM233c presenta una cinética de inducción dependiente de la concentración de oxígeno, con un pico máximo bajo una atmósfera al 1%. Sin embargo la actividad basal de la cepa DEM151a no es sensible a las diferencias en concentración de oxígeno.

Nosotros esperábamos que la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de la cepa DEM151a respondiera a la concentración de oxígeno y que la de la cepa DEM233c fuera insensible a la concentración de oxígeno. Este comportamiento resulta contradictorio dado el tipo de secuencias regulatorias presentes en las regiones previas a cada uno de los dos genes. Algunas alternativas sobre el mecanismo de regulación de la expresión del promotor *nifHc* en cultivo en función de las secuencias regulatorias encontradas y de proteínas que sabemos participan en otros sistemas son:

1.- Activación cruzada. Cuando un promotor RpoN-dependiente, cuya transcripción se estimula normalmente por un activador específico, es susceptible de expresarse cuando se encuentra en presencia de altas concentraciones de otra proteína activadora del mismo grupo (NtrC, NifA, DctD, etc; Ninfa *et al*, 1988). Esto se ha demostrado en *K. pneumoniae*, donde NtrC promueve la transcripción del promotor *nifH* en ausencia de su NifA-UAS (Buck y Cannon, 1989). Sin embargo, una activación cruzada no alcanza los niveles de la legítima y solo funciona con respecto a su propio estímulo ambiental. Dado que las únicas proteínas de este grupo que responden a la concentración de oxígeno son NifA y FixJ, y ésta última no se une a promotores RpoN-dependientes, la única que cumple con los requisitos para inducir la expresión del promotor *nifHc* es NifA.

2.- Activación por NifA libre. Aunque se puede activar la transcripción de promotores RpoN-dependientes por asociación libre de NifA con el complejo de la RNA-polimerasa, la actividad óptima se obtiene cuando NifA se une a secuencias específicas de DNA (TGT-N10-ACA), ubicadas alrededor de 100 nucleótidos antes del promotor (Morett *et al*, 1988; Huala y Ausubel, 1989). Si la activación del promotor *nifHc* fuera por asociación con NifA libre, esperaríamos que el promotor *nifHa* presentara una mayor expresión, puesto que este sí contiene una NifA-UAS en la posición correcta. Los resultados presentados en las Figs. 10 y 12A demuestran que esta condición no se cumple. Por lo tanto, en el caso que NifA fuera el activador responsable, debería tener un mecanismo diferente.



3.- NifA como represor. Una función represora de NifA sobre promotores RpoN-dependientes cuando se encuentre presente una NifA-UAS (*nifHa* y *nifHb*), mientras que en ausencia de esta secuencia, funcionara como activador (*nifHc*), explicaría algunos de los resultados encontrados. Este tipo de dualidad de función ha sido demostrada para algunas proteínas reguladoras de promotores  $\sigma^{70}$ -dependientes, pero no para promotores RpoN-dependientes, aunque no existen impedimentos mecánicos para ello (Collado-Vides *et al*, 1991). Sin embargo, este comportamiento de NifA no nos explicaría el nivel basal de transcripción del gene *nifHa*, encontrado en todas las condiciones probadas, inclusive bajo concentraciones de oxígeno del 20%.

4.- Otros elementos regulatorios. Finalmente solo queda suponer que las secuencias regulatorias que encontramos no son funcionales, sino que la transcripción se esta promoviendo a partir de otro(s) promotor(es) y está siendo regulada por otra(s) proteína(s) aún no caracterizada(s).

Las tres primeras alternativas consideran la participación de las secuencias y moléculas que conocemos en otros sistemas, sin embargo son notablemente más complejas que la última, donde solamente se requeriría la participación de una proteína reguladora o una secuencia aún no caracterizadas. No podemos descartar en este momento la presencia de otros promotores, pues carecemos de evidencias sobre cuáles son las secuencias involucradas en la iniciación de la transcripción de estos genes. Con respecto a la existencia de otra proteína regulatoria diferente de NifA, una de las predicciones sobre su funcionamiento es que debería ser capaz de activar promotores RpoN-dependientes en respuesta a la concentración de oxígeno. También se esperaría que no pueda activar un promotor idéntico si existe una secuencia de pegado para NifA en la zona regulatoria (p.ej. *nifHa*). Para poder definir la responsabilidad de NifA en la expresión diferencial que encontramos, estamos trabajando en la construcción de cepas que nos permitan estudiar el efecto de una deleción del gene *nifA* sobre la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de las fusiones en *nifHa* y *nifHc*.

Sin embargo, cualquiera que sea el mecanismo de activación del promotor *nifHc* no nos explica la falta de respuesta del promotor *nifHa* a la concentración de oxígeno, por lo que aparentemente se trata de dos fenómenos diferentes. Aunque existe una copia funcional de *nifA* en la cepa CFN42 (Girard *et al*, 1993), el perfil de expresión del promotr *nifHa* no se comporta como su equivalente en *R. meliloti* (Virts *et al*, 1988; Huala *et al*, 1989). La falta de respuesta de este promotor en nuestro sistema podría deberse a que no haber encontrado las condiciones óptimas para su expresión. Por ejemplo, recientemente se demostró que el promotor *nifH* de *R. meliloti* se transcribe tres veces más en glutámico como única fuente de nitrógeno que en amonio, que es la fuente que estamos utilizando (Noonan *et al*, 1992), pero esto es por medio de la regulación de la expresión de *nifA* por la fuente de nitrógeno. El perfil de expresión de *nifA* nos

ayudaría a delimitar si existe una correlación con el de *nifHa* o de *nifHc*, así como definir si su expresión esta controlada de alguna manera o si conserva la sensibilidad intrínseca a oxígeno que se encuentra en NifA de otras Rhizobaeas.

Para completar el análisis de expresión, se determinó la actividad de  $\beta$ -galactosidasa en nódulos producidos por las cepas DEM233c y DEM151a. Para una bacteria del género *Rhizobium*, la condición de máxima inducción para los genes de la nitrogenasa es dentro de nódulos maduros (en frijol, de 18 a 20 días después de la inoculación). En estas condiciones vemos claramente una cinética de inducción del promotor *nifHa* dependiente del estadio de desarrollo del nódulo (Fig. 12A), que corresponde con la obtenida para la actividad de nitrogenasa en nódulos producidos por la cepa silvestre CFN42 (Fig. 12B). La posibilidad de monitorear simultáneamente las actividades de  $\beta$ -galactosidasa y de nitrogenasa se debe a que la cepa CFN42 posee dos copias funcionales de los genes *nifHDK*, que se expresan coordinadamente (Fig. 9; Romero *et al*, 1988; Morett *et al*, 1988b). De esta manera, si se abole la expresión de una de las copias, la segunda copia basta para obtener nódulos capaces de producir 50% de la actividad de nitrogenasa silvestre.

Al monitorear la actividad de  $\beta$ -galactosidasa a partir del promotor *nifHc*, encontramos que sigue la misma cinética del promotor *nifHa*, pero diez veces más alta. Esto nos indica que la fusión construida sobre el gene *nifHa* es perfectamente inducible, y que sus reguladores (o las condiciones efectoras necesarias) se encuentran presentes en nódulo. Si la expresión del promotor *nifHc* estuviera siendo activada por NifA, esperaríamos encontrar la misma actividad que del promotor *nifHa*. Inclusive menor, por la carencia de secuencias para el pegado de esta proteína, pero de ninguna manera mayor.

En un reporte previo (Morett *et al*, 1988b) se realizó un estudio transcripcional de las tres copias del gene *nifH* en la cepa CFN42, donde demuestra que las tres copias se transcriben activamente en nódulo, aunque las interpretaciones de las actividades de  $\beta$ -galactosidasa se complican por la presencia de rearreglos en el plásmido simbiótico. Dada su estructura genómica, los plásmidos simbióticos de *R. phaseoli* presentan rearreglos genéticos a alta frecuencia (Romero *et al*, 1991), por lo que durante el desarrollo de este trabajo evitamos la presencia de amplificaciones al seleccionar las cepas construidas en bajas concentraciones de kanamicina (15  $\mu$ g/ml). Una vez seleccionadas, se checaron rutinariamente para asegurar su estabilidad genómica.

Al montar las condiciones de expresión de los genes de la nitrogenasa en cultivo buscábamos encontrar una en la que simuláramos lo que pasa dentro del nódulo, lo que nos permitiría llevar a cabo una serie de observaciones que serían difíciles de realizar aún con bacteroides aislados. El patrón de expresión que observamos en nuestros cultivos en bajo oxígeno semeja el que se encuentra en simbiosis, y aún más, nos ha permitido la detección de una interesante expresión diferencial de los genes reiterados *nifH*, así como la identificación de otras secuencias con

probable incidencia dentro del proceso de fijación de nitrógeno. Los resultados presentados en esta tesis nos proporcionan evidencias de una nueva modalidad para la regulación de copias múltiples de la nitrogenasa en bacterias del género *Rhizobium*, que presenta características no encontradas en otros organismos.

Sin embargo, quedan todavía una serie de preguntas interesantes que trataremos de responder muy pronto: ¿Porqué se requiere de tres copias del gene *nifH*? ¿Cuál es el significado fisiológico de la proteína NiFD\*? ¿Cuáles son las moléculas involucradas en la expresión diferencial de los promotores *nifHa* y *nifHc*? ¿Cuáles son los mecanismos de esta expresión diferencial? ¿Cuál es la función de los otros genes encontrados en la región *nifHc*?

## MATERIAL Y METODOS

### Cepas bacterianas, plásmidos y medios de cultivo.

Las cepas de *R. phaseoli* CFN42 y demás aislados (Martínez *et al*, 1985) se crecieron en medio rico PY o en medio mínimo Y (Bravo y Mora, 1988) a 200 rpm y 30°C. Las cepas de *E. coli* se crecieron en medio rico LB (Ausubel *et al*, 1989) a 37°C. Cuando se requirió, se utilizaron los siguientes antibióticos: ap 200 µg/ml, sm 200 µg/ml, rif 50 µg/ml, nal 20 µg/ml, km 15µg/ml. La construcción de plásmidos se detalla en el texto.

### Manejo de DNA recombinante.

Todo el trabajo se efectuó con técnicas de rutina tal como se describe en el libro "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel *et al*, 1989). El DNA purificado fue digerido siguiendo las indicaciones y utilizando las mezclas de reacción provistas por el fabricante de las enzimas de restricción (Amersham Corp.). Algunos fragmentos de restricción se recuperaron de geles de agarosa de bajo punto fusión (Sigma Chem.) y se fundieron a 65°C. Posteriormente se extrajeron una vez con fenol saturado caliente, dos veces con fenol/cloroformo/isoamilico caliente, y una vez con cloroformo/isoamilico a temperatura ambiente. Se precipitaron con etanol absoluto y sulfato de amonio 3M pH 5.4 en proporción de 1:20. Las transformaciones de *E. coli* se hicieron de acuerdo al protocolo de Chung *et al* (1989).

### Análisis por hibridización.

Las muestras de DNA total digerido se ajustaron a una concentración aproximada de 5µg por carril y se separaron por electroforesis en geles de agarosa (Sigma Chem.) al 1% toda la noche a 4°C en buffer TAE. Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond C-Extra, Amersham Corp.) por capilaridad. Las membranas se prehibridizaron por 2hs y se hibridizaron toda la noche a 65°C en la siguiente mezcla: 5X SSC, buffer de fosfato de sodio 0.1M pH 6.7, 10X Denhardt, 100 µg/ml DNA de timo de ternera. Las membranas se lavaron con 0.1X SSC + 0.1% SDS a 55°C por tres periodos de 30 minutos, finalmente se secaron al aire y se expusieron. Los detectores se marcaron con nucleótidos radioactivos usando los reactivos para "Nick Translation" de Amersham Corp.

### Determinación de secuencias nucleotídicas.

Los fragmentos de restricción 12D, 23E, 23F y 23G, fueron subclonados en los plásmidos pUC19 y pBluescript II SK y KS, utilizando la estrategia indicada en la Fig. 4. Se secuenciaron por medio del método publicado por Sanger *et al* (1977), utilizando el sistema Sequenase 2 (USB Biochemical).

#### Análisis de secuencias de DNA por computadora.

Todo el análisis de secuencias se llevo a cabo en una computadora MicroVax 3300 usando los programas del Genetics Computer Group (Devereux *et al*, 1984). Los alineamientos múltiples se realizaron con el programa Pileup. La búsqueda de secuencias homólogas se efectuó sobre las bases de secuencias nucleotídicas Gen EMBL y Gen Bank.

#### Clonación del gene *nifD* de *R. phaseoli* CFN42.

Los fragmentos del plásmido simbiótico que llevan las tres copias del gene *nifH* se aislaron previamente (Quinto *et al*, 1985; Fig. 4). A partir del plásmido pDEM12 se aisló el fragmento de 1.1kb flanqueado por sitios de *Sall* que hibridiza contra el gene *nifD* de *B. japonicum*, pero no contra *nifK* (Valderrama, 1989). De la misma manera se aisló el fragmento que contiene a *nifK* y a un fragmento interno de *nifH*. Todos estos se subclonaron y fueron utilizados como detectores de hibridización. La clona que contiene a *nifDb* de la cepa CFN42 se subclonó posteriormente para obtener su secuencia.

#### Construcción de fusiones transcripcionales *nifH::lacZ* en *Rhizobium phaseoli*.

Las regiones *nifHb* y *c* se subclonaron en el plásmido pSUP205 (Simon *et al*, 1983). Se digirieron con la enzima *BgIII* y se ligaron a un interposón que contiene el gene estructural para la enzima  $\beta$ -galactosidasa y un gene que confiere resistencia a kanamicina (Kokotek y Lotz, 1989). Se analizó el patrón de restricción de todas las derivadas resistentes a kanamicina para confirmar que el interposón estuviera clonado en la orientación correcta.

La cepa CFN42 de *R. phaseoli* se utilizó como recipiente para la obtención de recombinantes que incorporaran las fusiones a sus plásmidos simbióticos. Se obtuvieron dobles recombinante en un solo paso de los plásmidos respectivos por el método del vector suicida (Hahn y Hennecke, 1984). La cepa derivada DEM233c contiene una fusión en el gene *nifHc* y la cepa DEM151a una en el gene *nifHa*. Todas las cepas derivadas se analizaron regularmente para asegurar su estabilidad genómica (ausencia de rearreglos).

#### Condiciones de crecimiento de plantas y determinación de la nitrogenasa.

Semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* cv. Negro Jamapa) fueron esterilizadas con una solución comercial de hipoclorito de sodio al 30% y germinadas en oscuridad por 3 días. Las plántulas se trasplantaron a macetas con vermiculita estéril como soporte. La inoculación se efectuó en una campana de flujo laminar y se regaron con soluciones estériles. El crecimiento de las plantas se llevó a cabo en invernadero. La actividad de reducción de acetileno se determinó incubando los sistemas radiculares aislados en 1/160 (v/v) de acetileno por dos horas. La producción de etileno

se cuantificó usando un cromatógrafo de gases marca Varian 3300. La actividad específica se reporta como el promedio de las nanomolas de etileno producido por gramo de nódulos de cada planta por hora.

#### Determinación de la actividad de $\beta$ -galactosidasa.

Se desprenden algunos nódulos de cada planta (5 a 10) y se muelen en buffer Z frío (Ausubel *et al*, 1989), se agregan dos gotas de cloroformo y se agitan en el vortex. Los extractos se centrifugan 15 minutos a 4°C. La actividad se determina como el incremento de absorbancia a 420 nm en presencia de 30  $\mu$ l de ONPG (8 mg/ml, Sigma Chem.). Una unidad de actividad específica corresponde a la enzima que se requiere para producir 1mM de ONP por minuto por microgramo de proteína en el extracto.

Para los cultivos, se toman diferentes volúmenes, dependiendo de la densidad óptica, y se centrifugan en frío. Las pastillas se resuspenden en 1ml de buffer Z, al que se agregan un par de gotas de cloroformo, se agitan muy bien en el vortex. La actividad se determina como el incremento en la absorbancia a 420 nm después de agregar 30  $\mu$ l de ONPG (13.3 mg/ml) a 30°C. La reacción se detiene con 0.25 ml de carbonato de sodio 2M y las muestras se centrifugan 15min a temperatura ambiente antes de medir. Una unidad de actividad específica corresponde a la cantidad de enzima que se requiere para producir 1mM de ONP por minuto por microgramo de proteína en el cultivo. Las unidades Miller se determinaron según Ausubel *et al* (1989).

#### Cultivos bajo atmósferas definidas.

Se inoculan las cepas a analizar en 5 ml de PY, de preferencia de cajas frescas. Al siguiente día se inoculan 100 ml de PY con 0.2 ml del precultivo y se incuban durante 12 hs. Este tiempo es crítico para la actividad y no debe excederse, hay que procurar que todos los cultivos tengan la misma densidad al final. Las células se centrifugan y se lavan con  $MgSO_4$  10mM.

Se inocula medio mínimo Y con succinato 10 mM y cloruro de amonio 10mM, a una densidad óptica inicial de 0.05 a 540nm. Se inyectan 30 ml de los cultivos en botellas de 160 ml con tapones de goma nuevos estériles. La atmósfera de las botellas se cambia la noche anterior haciendo pasar varios volúmenes de la mezcla de gases pertinente. Se recomienda dejar una presión positiva dentro de las botellas para evitar contaminaciones con aire. Las muestras para determinación de  $\beta$ -galactosidasa y de proteína se toman con jeringa, procurando no picar más de cuatro veces cada sello.

Para controlar la concentración de oxígeno inyectada, se usaron tanques de mezclas de gases: oxígeno 1 % y 5 % en argón, argón 100 % y aire. Las mezclas fueron certificadas a un error <0.5 % por el fabricante (Linde de México).

## REFERENCIAS

Aguilar, M., Reiländer, H., Arnold, W., y Pühler, A. (1987) *Rhizobium meliloti nifN (fixF)* gene is part of an operon regulated by a *nifA*-dependent promoter and codes for a polypeptide homologous to the *nifK* gene product. *J Bact* **169**:5393-5400.

Andrew, M., Chan, J., Rubin, J.S., Bottaro, D.P., Hirschfield, D.W., Chedid, M., and Aaronson, S.A. (1991) Identification of a competitive HGF antagonist encoded by an alternative transcript. *Science* **254**:1382-1385.

Arp, D. (1992) Hydrogen cycling in symbiotic bacteria. En *Biological Nitrogen Fixation*. Stacey, G., Burris, R., y Evans, H. (eds) New York: Chapman and Hall, pp. 432-460.

Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., et al. (1989) Current Protocols in Molecular Biology, U.S.A.:John Wiley.

Barbour, W., Wang, S., y Stacey, G. (1992) Molecular genetics of *Bradyrhizobium* symbioses. En *Biological Nitrogen Fixation*. Stacey, G., Burris, R., y Evans, H. (eds) New York: Chapman and Hall, pp. 648-684.

Batut, J., Daveran, M-L., David, M., Jacobs, J., Garnerone, A. and Kahn, D. (1989) *fixK*, a gene homologous with *fir* and *crp* from *Escherichia coli*, regulates nitrogen fixation genes both positively and negatively in *Rhizobium meliloti*. *EMBO. J.* **8**:1279-1286.

Bedmar, E., Edie, S., y Phillips, D. (1983) Host plant cultivar effects on hydrogen evolution by *Rhizobium leguminosarum*. *Plant Phys* **72**:1011-1015.

Bedmar, E., y Phillips, D. (1984) A transmissible plant shoot factor promotes uptake hydrogenase activity in *Rhizobium* symbionts. *Plant Phys* **75**:629-633.

Bishop, P., y Premakumar, R. (1992) Alternative nitrogen fixation systems. En *Biological Nitrogen Fixation*. Stacey, G., Burris, R., y Evans, H. (eds) New York.: Chapman and Hall, pp. 736-762.

Bohlool, B. (1990) Introduction of nitrogen fixation in agriculture and industry: Contribution of BNF to sustainability of agriculture. En *Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives*. Gresshoff, P., Roth, E., Stacey, G., y Newton, W. (eds) New York: Chapman and Hall., pp. 613-616.

Bolin, J., Ronco, A., Mortenson, L., Morgan, T., Williamson, M., y Xuong, N. (1990) Structure of the nitrogenase MoFe protein: spatial distribution of the intrinsic metal atoms determined by X-ray anomalous scattering. En *Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives*. Gresshoff, P., Roth, E., Stacey, G., y Newton, W. (eds) New York: Chapman and Hall, pp. 117-124.

Bravo, A., y Mora, J. (1988) Ammonium assimilation in *Rhizobium phaseoli* by the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway. *J Bact* 70:980-984.

Buck, M., Khan, H., y Dixon, R. (1985) Site-directed mutagenesis of the *Klebsiella pneumoniae* *nifL* and *nifH* promoters and *in vivo* analysis of promoter activity. *Nucl Acids Res* 13:7621-7638.

Buck, M. (1986) Deletion analysis of the *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase promoter: Importance of the spacing between conserved sequences around positions -12 and -24 for activation by the *nifA* and *ntrC* (glnG) products. *J Bact* 166:545-551.

Buck, M., Miller, S., Drummond, M., y Dixon, R. (1986) Upstream activator sequences are present in the promoters of nitrogen fixation genes. *Nature* 320:374-378.

Buck, M., Cannon, W., y Woodcock, J. (1987) Mutational analysis of upstream sequences required for transcriptional activation of the *Klebsiella pneumoniae* *nifH* promoter. *Nucl Acids Res* 15:9945-9956.

Buck, M., y Cannon, W. (1989) Mutations in the RNA polymerase recognition sequence of the *Klebsiella pneumoniae* *nifH* promoter permitting transcriptional activation in the absence of NifA binding to upstream activator sequences. *Nucl Acids Res* 17:2597-2612.

Buck, M., y Cannon, W. (1992) Activator-independent formation of a closed complex between  $\sigma^{54}$ -holoenzyme and *nifH* and *nifU* promoters of *Klebsiella pneumoniae*. *Mol Microbiol* 6:1625-1630.

Chen, K., Chen, J., y Johnson, J. (1986) Structural features of multiple *nifH*-like sequences and very biased codon usage in nitrogenase genes of *Clostridium pasteurianum*. *J Bact* 166:162-172.

Chung, C., Niemela, S., y Miller, R. (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2172-2175.

Claverie-Martin, F., y Magasanik, B. (1991) Role of integration host factor in the regulation of the *glnH*<sub>2</sub> promoter of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:1631-1635.

Collado-Vides, J., Magasanik, B., y Gralla, J.D. (1991) Control site location and transcriptional regulation in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 55:371-394.

David, M., Daveran, M-L., Batut, J., Dedieu, A., Domergue, O., Ghai, J., Hertig, C., Boistard, P. and Kahn, D. (1988) Cascade regulation of *nif* gene expression in *Rhizobium meliloti*. *Cell* 54:671-683.

Dean, D., y Jacobson, M. (1992) Biochemical genetics of nitrogenase. En *Biological Nitrogen Fixation*. Stacey, G., Burris, R., y Evans, H. (eds) New York: Chapman and Hall, pp. 763-834.



Devereux, Haerberli, P., and Smithies, O. (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucl Acids Res* 12:387-395.

Dilworth, M., y Eady, R. (1991) Hydrazine is a product of dinitrogen reduction by the vanadium nitrogenase from *Azotobacter chroococcum*. *Biochem J* 277:465-468.

Ditta, G., Schmidhauser, T., Yacobson, E., Lu, P., Liang, X., Finlay, D., Guiney, D., y Helinski, D. (1987) Plasmids related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. *Plasmid* 13:149-153.

Drummond, M., Whitty, P., y Wootton, J. (1986) Sequence and domain relationships of *nirC* and *nifA* from *Klebsiella pneumoniae*: homologies to other regulatory proteins *The EMBO Journal* 5:441-447.

Evans, D., Jones, R., Woodley, P., Wilborn, J., y Robson, R. (1991) Nucleotide sequence and genetic analysis of the *Azotobacter chroococcum* *nifUSVWZM* gene cluster, including a new gene (*nifP*) which encodes a serine acetyltransferase. *J Bact* 173:5457-5469.

Evans, H., y Burris, R. (1992) Highlights in biological nitrogen fixation during the last 50 years. En *Biological Nitrogen Fixation*. Stacey, G., Burris, R., y Evans, H. (eds) New York: Chapman and Hall, pp. 1-42.

Franssen, H., Nap, J., y Bisseling, T. (1992) Nodulins in root nodule development. En *Biological Nitrogen Fixation*. Stacey, G., Burris, R., y Evans, H. (eds) New York: Chapman and Hall, pp. 598-624.

Gadkari, D., Morsdorf, G., y Meyer, O. (1992) Chemolithoautotrophic assimilation of dinitrogen by *Streptomyces thermoautotrophicus* UBT1: Identification of an unusual N<sub>2</sub>-fixing system. *J Bact* 174:6840-6843.

Georgiadis, M., Komiya, H., Chakrabarti, P., Woo, D., Kornuc, J., y Rees, D. (1992) Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. *Science* 257:1653-1659.

Girard, M.de L., Flores, M., Brom, S., Romero, D., Palacios, R., y Dávila, G. (1991) Structural complexity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli. *J Bact* 173:2411-2419.

Girard, M.de L., Valderrama, B., Brom, S., Palacios, R., Romero, D., y Dávila, G. (1993) Identification and specific amplification of *nifA* gene of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli. En *New Horizons in Nitrogen Fixation*. Palacios, R., Mora, J., y Newton, W.E. (eds) Dordrecht:Kluwer Academic Publishers, p 614.

Golden, J., Robinson, S., y Haselkorn, R. (1985) Rearrangement of nitrogen fixation genes during heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena*. *Nature* 314:419-423.

- Govezensky, D., Greener, T., Segal, G., y Zamir, A. (1991) Involvement of GroEL in *nif* gene regulation and nitrogenase assembly. *J Bact* 173:6339-6346.
- Hahn, M., y Hennecke, H. (1984) Localized mutagenesis in *Rhizobium japonicum*. *Mol Gen Genet* 193:46-52.
- Hardy, R., y Havelka, U. (1975) Nitrogen fixation: a key to world food? *Science* 188:633-643.
- Harris, G., White, T., Flory, J., y Orme-Johnson, W. (1990) Genes required for formation of the apomolybdenum iron protein of *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 265:15909-15919.
- Helmann, J., y Chamberlin, M. (1988) Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu Rev Biochem* 57:839-872.
- Hill, S. (1971) Influence of oxygen concentration on the colony type of *Derris gumosa* grown on nitrogen-free media. *J Gen Microbiol* 67:77-83.
- Hill, S. (1992) Physiology of nitrogen fixation in free-living heterotrophs. En *Biological Nitrogen Fixation*. Stacey, G., Burris, R., y Evans, H. (eds) New York: Chapman and Hall, pp. 87-134.
- Hoover, T., Santero, E., Porter, S., y Kustu, S. (1990) The integration host factor stimulates interaction of RNA polymerase with NifA, the transcriptional activator for nitrogen fixation operons. *Cell* 63:11-22.
- Huala, E., y Ausubel, F. (1989) The central domain of *Rhizobium meliloti* NifA is sufficient to activate transcription from the *R. meliloti nifH* promoter. *J Bact* 171:3354-3365.
- Hungria, M., Barradas, C., y Wallsgrave, R. (1991) Nitrogen fixation, assimilation and transport during the initial growth stage of *Phaseolus vulgaris* L. *J Exp Bot* 42:839-844.
- Iisma, S.E., y Watson, J.M. (1989) The *nifA* gene product from *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* lacks the N-terminal domain found in other NifA proteins. *Mol Microbiol* 3:943-955.
- Joerger, R., y Bishop, P. (1988) Bacterial alternative nitrogen fixation systems. *CRC Crit Rev Microbiol* 16:1-15.
- Joerger, R., Wolfinger, E., y Bishop, P. (1991) The gene encoding dinitrogenase reductase 2 is required for expression of the second alternative nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *J Bact* 173:4440-4446.
- Kaminski, P., Mandon, K., Arigoni, F., Desnoues, N., y Elmerich, C. (1991) Regulation of nitrogen fixation in *Azorhizobium caulinodans*: identification of a *fixK*-like gene, a positive regulator of *nifA*. *Mol Microbiol* 5:1983-1992.

- Kennedy, C., y Dean, D. (1992) The *nifU*, *nifS* and *nifV* gene products are required for activity of all three nitrogenases of *Azotobacter vinelandii*. *Mol Gen Genet* 231:494-498.
- Kim, J., y Rees, D. (1992) Structural models for the metal centers in the nitrogenase molybdenum-iron protein. *Science* 257:1677-1682.
- Kokotek, W., y Lotz, W. (1989) Construction of a *lacZ*-kanamycin-resistance cassette, useful for site directed mutagenesis and as a promoter probe. *Gene* 84:467-471.
- Krishnan, H.B., y Pueppke, S.G. (1991) Sequence and analysis of the *nodABC* region of *Rhizobium fredii* USDA257, a nitrogen-fixing symbiont of soybean and other legumes. *Mol Plant Microbe Interac* 4:512-520.
- Kustu, S., Santero, E., Keener, J., Popham, D., y Weiss, D. (1989) Expression of  $\sigma^{54}$  (*ntrA*)-dependent genes is probably united by a common mechanism. *Microbiol Rev* 53:367-376.
- Long, S. (1992) Genetic analysis of *Rhizobium nodulation*. En *Biological Nitrogen Fixation*. Stacey, G., Burris, R., y Evans, H. (eds) New York: Chapman and Hall., pp. 560-597.
- Martínez, E., Pardo, M.A., Palacios, R., y Cevallos, M.A. (1985) Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *J Gen Microbiol* 131:1779-1786.
- Martínez, E., Palacios, R., y Sánchez, F. (1987) Nitrogen fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. *J Bact* 169:2828-2834.
- Martínez, E., Romero, D., y Palacios, R. (1990) The *Rhizobium* genome. *Crit Rev Plant Sci* 9:59-93.
- Martínez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F., Franco, A., Graham, P., y Pardo, M.A. (1991) *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int J Syst Bact* 41:417-426.
- McClure, W. (1985) Mechanism and control of transcription initiation in prokaryotes *Annu Rev Biochem* 54:171-204.
- Merrick, M. (1992) Regulation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic bacteria. En *Biological Nitrogen Fixation*. Stacey, G., Burris, R., y Evans, H. (eds) New York: Chapman and Hall, pp. 835-876.
- Mora, J., y Lara, F. (1991) Nitrogen Metabolism: and overview. En *Nitrogen Source Control of Microbial Processes*. Sánchez-Esquivel, S. (ed) Florida: CRC Press.
- Moreno-Vivian, C., Schmehl, M., Masepohl, B., Arnold, W., y Klipp, W. (1989) DNA sequence and genetic analysis of the *Rhodobacter capsulatus nifENX* gene region: homology

between NifX and NifB suggests involvement of NifX in processing of the iron-molybdenum cofactor. *Mol Gen Genet* 216:353-363.

Morett, E., y Buck, M. (1988) NifA-dependent in vivo protection demonstrates that the upstream activator sequence of nif promoters is a protein binding site. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:9401-9405.

Morett, E., Cannon, W., y Buck, M. (1988) The DNA-binding domain of the transcriptional activator protein NifA resides in its carboxy terminus, recognises the upstream activator sequences of nif promoters and can be separated from the positive control function of NifA. *Nucl Acids Res* 16: 11469-11488.

Morett, E., Moreno, S., y Espín, G. (1988b) Transcription analysis of the three nifH genes of *Rhizobium phaseoli* with gene fusions. *Mol Gen Genet* 213:499-504.

Morett, E., y Buck, M. (1989) In vivo studies on the interaction of RNA polymerase- $\sigma^{54}$  with the *Klebsiella pneumoniae* and *Rhizobium meliloti* nifH promoters. *J Mol Biol* 210:65-77.

Morett, E., Fischer, H-M., y Hennecke, H. (1991) Influence of oxygen on DNA binding, positive control, and stability of the *Bradyrhizobium japonicum* NifA regulatory protein. *J Bact* 173:3478-3487.

Nakabeppu, Y., y Nathans, D. (1991) A naturally occurring truncated form of FosB that inhibits Fos/Jun transcriptional activity. *Cell* 64:751-759.

Newton, W. (1988) Chemical nitrogen-fixing systems and structural models with parallels to nitrogenase. En *Nitrogen fixation: hundred years after*. Bothe, H., de Bruijn, F., y Newton, W. (eds) Stuttgart: Gustav Fischer, pp. 43-50.

Ninfa, A., Gottlin-Ninfa, E., Lupas, A., Stock, A., Magasanik, B., y Stock, J. (1988) Crosstalk between bacterial chemotaxis signal transduction proteins and regulators of transcription of the Ntr regulon: Evidence that nitrogen assimilation and chemotaxis are controlled by a common phosphotransfer mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5492-5496.

Noonan, B., Motherway, M., y O'Gara, F. (1992) Ammonia regulation of the *Rhizobium meliloti* nitrogenase structural and regulatory genes under free-living conditions: involvement of the fixL gene product? *Mol Gen Genet* 234:423-428.

Norel, F., y Elmerich, C. (1987) Nucleotide sequence and functional analysis of the two nifH copies of *Rhizobium* ORS571. *J Gen Microbiol* 133:1563-1576.

Normand, P., y Bousquet, J. (1989) Phylogeny of nitrogenase sequences in *Frankia* and other nitrogen-fixing microorganisms. *Mol Evol* 29:436-447.

Phillips, D., y Teuber, L. (1992) Plant genetics of symbiotic nitrogen fixation. En *Biological Nitrogen Fixation*. Stacey, G., Burris, R., y Evans, H. (eds) New York: Chapman and Hall, pp. 625-647.

Piñero, D., Martínez, E., y Selander, R. (1988) Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Appl and Environ Microbiol* 54:2825-2832.

Postgate, J. (1981) *Fijación de nitrógeno*, Barcelona:Ediciones Omega.

Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Fernández, L., Ballado, T., Soberón, G., y Palacios, R. (1982) Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. *Nature* 299:724-728.

Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Leemans, J., Cevallos, M.A., Pardo, M.A., Azpiros, R., Girard, M. de L., Calva, E., y Palacios, R. (1985) Nitrogenase reductase: A functional multigene family in *Rhizobium phaseoli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:1170-1174.

Quispel, A. (1988) Hellriegel and Wilfarth's discovery of (symbiotic) nitrogen fixation hundred of years ago. En *Nitrogen fixation: hundred years after*. Bothe, H., de Bruijn, F., y Newton, W. (eds) Stuttgart: Gustav Fischer, pp. 3-12.

Reiner, O., y Okon, Y. (1986) Oxygen recognition in aerotactic behaviour of *Azospirillum brasilense* Cd. *Can J Microbiol* 32:829-834.

Roberts, G., y Luden, P. (1992) Nitrogen fixation by photosynthetic bacteria. En *Biological Nitrogen Fixation*. Stacey, G., Burris, R., y Evans, H. (eds) New York: Chapman and Hall, pp. 135-165.

Romero, D., Singleton, P., Segovia, L., Morett, E., Bohlool, B., Palacios, R., y Dávila, G. (1988) Effect of naturally occurring *nif* reiterations on symbiotic effectiveness in *Rhizobium phaseoli*. *Appl and Environ Microbiol* 54:848-850.

Romero, D., Brom, S., Martínez-Salazar, J., Girard, M. de L., Palacios, R., y Dávila, G. (1991) Amplification and deletion of a *nod-nif* region in the symbiotic plasmid of *Rhizobium phaseoli*. *J Bact* 173:2435-2441.

Sanger, F., Nicklen, S., y Coulson, A. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467.

Sayavedra-Soto, L., Powell, G., Evans, H., y Morris, R. (1988) Nucleotide sequence of the genetic loci encoding subunits of *Bradyrhizobium japonicum* uptake hydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:8395-8399.

Schoot-Uiterkamp, A. (1990) Nitrogen cycle and human intervention. En *Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives*. Gresshoff, P., Roth, E., Stacey, G., y Newton, W. (eds) New York: Chapman and Hall., pp. 55-66.

Segovia, L. (1988) Construcción de mutaciones en las regiones *nifH* de *Rhizobium phaseoli* Tesis de Maestría en Investigación Biomédica Básica. UACPyP del CCH, UNAM.

Simon, R., Priefer, U., y Pühler, A. (1983) Vector plasmids for *in-vivo* and *in-vitro* manipulations of gram-negative bacteria. En *Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction*. Pühler, A. (ed) Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 98-105.

Souza, V., Nguyen, T.T., Hudson, R.R., Piñero, D., Lenski, R.E. (1992) Hierarchical analysis of linkage disequilibrium in *Rhizobium* populations: Evidence for sex? *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:8389-8393.

Sprent, J., y Raven, J. (1992) Evolution of nitrogen fixing symbiosis. En *Biological Nitrogen Fixation*. Stacey, G., Burris, R., y Evans, H. (eds) New York: Chapman and Hall., pp. 461-496.

Thorneley, R. (1992) Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*: A magnesium ATP hydrolysing energy transduction system with similarities to actomyosin and p21ras. *Phil Trans Royal Soc, Biol Sci* **336**:73-82.

Thorneley, R., Abell, C., Ashby, G., Drummond, M., Eady, R., Huff, S., Macdonald, C., y Shneier, A. (1992) Posttranslational modification of *Klebsiella pneumoniae* flavodoxin by covalent attachment of coenzyme A, shown by <sup>31</sup>P NMR and electrospray mass spectrometry, prevents electron transfer from the NiF protein to nitrogenase. A possible new regulatory mechanism for biological nitrogen fixation. *Biochemistry* **31**:1216-1224.

Valderrama, B. (1989) Búsqueda y caracterización genética de sistemas alternativos para la nitrogenasa en Rhizobaceas. Tesis de Licenciatura en Investigación Biomédica Básica, UCPyP del CCH, UNAM.

Valdés, A.M., y Piñero, D. (1992) Phylogenetic estimation of plasmid exchange in bacteria. *Evolution* **46**:641-656.

Virts, E., Stanfield, S., Helinski, D., y Ditta, G. (1988) Common regulatory elements control symbiotic and microaerobic induction of *nifA* in *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**:3062-3065.

Wang, S., Chen, J. and Johnson, J. (1988) The presence of five *nifH*-like sequences in *Clostridium pasteurianum*: sequence divergence and transcription properties. *Nucl. Acids Res.* **16**:439-454.

Werner, D. (1992) Physiology of nitrogen-fixing legume nodules: compartments and functions. En *Biological Nitrogen Fixation*. Stacey, G., Burris, R., y Evans, H. (eds) New York: Chapman and Hall, pp. 399-431.

Whitehall, S., Austin, S., y Dixon, R. (1991) DNA supercoiling response of the  $\sigma^{54}$ -dependent *Klebsiella pneumoniae nifL* promoter *in vitro*. *J Mol Biol* **225**:591-607.

Wolle, D., Dean, D., y Howard, J. (1992) Nucleotide-iron-sulfur cluster signal transduction in the nitrogenase iron-protein: the role of Asp125. *Science* **258**:992-995.

Yates, M. (1992) The enzymology of molybdenum-dependent nitrogen fixation. En *Biological Nitrogen Fixation*. Stacey, G., Burris, R., y Evans, H. (eds) New York: Chapman and Hall., pp. 685-735.

Young, P. (1989) The population genetics of bacteria. In *Genetics of Bacterial Diversity*. Hopwood, D.A., y Chater, K.F. (eds) London: Academic Press, pp. 417-438.

Young, P. (1992) Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. En *Biological Nitrogen Fixation*. Stacey, G., Burris, R., y Evans, H. (eds) New York: Chapman and Hall, pp. 43-86.

Zhang, Y., Burris, R., y Roberts, G. (1992) Cloning, sequencing, mutagenesis and functional characterization of *draT* and *draG* genes from *Azospirillum brasilense*. *J Bact* **174**:3364-3369.