

CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS  
UNAM

ANÁLISIS FUNCIONAL Y FENOTÍPICO DE UNA MUTANTE FNR DE  
*Rhizobium etli* CFN42.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A  
BIOLÓGA EXPERIMENTAL  
PATRICIA RIVERA ROSAS

DIRECTORA:  
Dra. María de Lourdes Girard Cuesy



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00144

Matricula: 208381876

ANALISIS FUNCIONAL Y  
FENOTIPICO DE UNA MUTANTE  
Fnr de *Rhizobium etli* CFN42

En México, D.F., se presentaron a las 11:30 horas del día 29 del mes de marzo del año 2012 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. FRANCISCO JOSE FERNANDEZ PERRINO
- DRA. GEORGINA HERNANDEZ DELGADO
- DR. MARIO RAMIREZ YAÑEZ
- DR. FRANCISCO FIERRO FIERRO



  
PATRICIA RIVERA ROSAS  
ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA

DE: PATRICIA RIVERA ROSAS

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. RUBEN ROMAN RAMOS

PRESIDENTE

DR. FRANCISCO JOSE FERNANDEZ  
PERRINO

VOCAL

DRA. GEORGINA HERNANDEZ DELGADO

VOCAL

DR. MARIO RAMIREZ YAÑEZ

SECRETARIO

DR. FRANCISCO FIERRO FIERRO

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465”

Este trabajo fue realizado en el Programa de Genómica Funcional de Procariontes del Centro de Ciencias Genómicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Girard Cuesy.

México D.F. a 29 de marzo del 2012

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**ANÁLISIS FUNCIONAL Y FENOTÍPICO DE UNA MUTANTE FNR DE  
*Rhizobium etli* CFN42.**

que presentó  
**Patricia Rivera Rosas**

Comité Tutorial:

Directora: Dra. María de Lourdes Girard Cuesy

Asesora: Dra. Georgina Hernández Delgado

Asesor: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Jurado:

Presidente: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Secretario: Dr. Francisco Fierro Fierro

Vocal: Dra. Georgina Hernández Delgado

Vocal: Dr. Mario Ramírez Yáñez

## DEDICATORIAS

El siguiente trabajo de tesis está dedicado a las siguientes personas en agradecimiento por lo que ellas representan en mi vida.

A mis padres por enseñarme a luchar día a día, por demostrarme que lo más valioso en la vida es trabajar duro por las cosas que se anhelan, por ayudarme a ser una mejor persona y por ser un ejemplo de amor incondicional.

A mis hermanos Iván y Jonathan que a pesar de la distancia seguimos siendo cómplices, y por creer en mí.

A mis sobrinos Alan, John y Fer, por su cariño, sus risas y sus detalles, por que han visto en mí una amiga más que sólo una tía.

A mis amigos Iveth, Andrea, Mariana, Espe, Pao (Lola), Claus, Rogers, Rulo, Cacho, Daniel, quiero agradecerle porque me brindaron las relaciones más estables de mi vida, por acompañarme ser un apoyo emocional.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM por permitirme realizar este proyecto de tesis.

Este trabajo fue parcialmente apoyado por el donativo PAPIIT IN202109 de la DGAPA, UNAM.

Agradezco al Dr. Jaime Mora Célis, Investigador Emérito y responsable del Programa de Genómica Funcional de Procariotes del CCG, por todo el apoyo que me brindó para la realización de este trabajo.

Al laboratorio de transcriptómica del CCG-UNAM, dirigido por el Dr. Sergio Encarnación, por las facilidades otorgadas para el uso del equipo.

A la Dra. Rosa Ma. Gutiérrez del IBt-UNAM por sus enseñanzas y ayuda en el análisis de los datos.

A la Doctora Ma. de Lourdes Girard Cuesy (Malu) por recibirme en el laboratorio, por tu trabajo de dirección en esta tesis. Por enseñarme la importancia de una bitácora y por iniciarme de manera más formal en la investigación científica por el apoyo que he recibido y por qué nos impulsas a mejorar.

A mis compañeros de laboratorio el Dr. Nicolás por adoptarme (jaja), y por enseñarme a trabajar en el laboratorio.

Gracias Alma porque siempre nos demuestras la importancia de tener orden y por tu amistad.

David por todos los comentarios y críticas constructivas para el proyecto, por siempre tener tiempo para mis dudas, por las largas horas que me dedicaste para mejorar este trabajo y por reír de mis buenos chistes.

A J. Donato porque aun que fue poco tiempo el que compartimos en el laboratorio eres un buen amigo y gracias por sus valiosos consejos.

A Rosy, primero por tu amistad y apoyo, siempre tienes tiempo para escucharnos

Gracias a Eli (Paz), por tu aportación y ayuda para cada uno de los que formamos parte del laboratorio.

Agradezco de manera muy especial al Dr. Francisco J. Fernández, porque siempre ha creído en mí, por las segundas oportunidades que me brindaste, por tu apoyo incondicional y por todos los buenos detalles que has tenido conmigo.

A los integrantes del comité Tutoral por sus consejos y aportaciones para este trabajo de tesis.

A los miembros del jurado por sus valiosas críticas sobre el proyecto

Han sido muchos los que han formado parte para lograr este trabajo, a todos ¡ Muchas Gracias!

## RESUMEN

El nitrógeno es, después del agua, el principal nutriente que limita el desarrollo de las plantas. La fijación biológica de nitrógeno (FBN) aporta la mayor parte del nitrógeno fijado a los ecosistemas terrestres, y es además, un proceso agronómicamente significativo que provee una alternativa al uso de fertilizantes químicos. Para que los beneficios de la FBN puedan repercutir en la mejor calidad de las cosechas y en el aumento de la productividad, es necesario que las interacciones beneficiosas (bacteria-planta) sean cada vez mejor entendidas. Las bacterias del género *Rhizobium* establecen una relación simbiótica con las raíces de las plantas leguminosas en una estructura denominada nódulo, en la cual se realiza la fijación biológica de nitrógeno. La asociación simbiótica rhizobia-leguminosa representa la culminación de una serie de eventos que requiere de la expresión definida y temporal de genes específicos. Las moléculas señal inducen la expresión de genes bacterianos los cuales a su vez inducen la expresión de genes de la planta que provocan cambios en el desarrollo morfológico de las raíces. La concentración de oxígeno y el monitoreo de los niveles intracelulares de nitrógeno son puntos clave para la regulación del proceso de fijación de nitrógeno.

*Rhizobium etli* es una bacteria del suelo que establece una relación simbiótica efectiva con plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*). El modelo de regulación de los genes *fix* en *R. etli* CFN42, propuesto por nuestro grupo de investigación, presenta características novedosas a las reportadas para otros rhizobia: (i) la cascada de regulación de los genes *fix* inicia con una proteína FixL atípica (hFixL) y con la ausencia de un homólogo estructural a FixJ; (ii) el regulador de la respuesta, posible cognado de hFixL, pertenece a la familia de reguladores PhoB/OmpR; los genes que codifican para las proteínas reguladoras del proceso están codificadas en al menos tres replicones diferentes.

En el caso de la fijación biológica de nitrógeno en condiciones simbióticas, la transducción de señales genera, en respuesta a la concentración de oxígeno, una regulación en cascada de los genes implicados (genes *nif* y *fix*.) Entre los reguladores transcripcionales que participan en la fijación de nitrógeno, cabe destacar a proteínas que pertenecen a la familia CRP/FNR de reguladores transcripcionales.

El genoma de *R. etli* codifica para 6 proteínas reguladoras de la familia CRP/FNR, a saber: FixKf, FnrNd, FnrNchr, StoRd, StoRf y NnrR, cuya participación en la simbiosis con plantas de frijol ha sido estudiada por nosotros.

El objetivo principal de este trabajo fue describir la red de regulación global que opera en *R. etli* en respuesta a la concentración de oxígeno en el medio ambiente, a través de la caracterización funcional y fenotípica de una mutante que no expresa ninguno de los genes que codifican para los reguladores CRP/FNR. Desde esta perspectiva, se planteó un enfoque experimental global, basado en microarreglos. El perfil global de expresión fue determinado usando un microarreglo que contiene 70 mrs que representan los 6,034 marcos abiertos de lectura predichos en el genoma de esta bacteria.

Los resultados obtenidos muestran que en *R. etli* los reguladores tipo FNR controlan la expresión de más de 100 genes que pertenecen a categorías funcionales relacionadas con distintos procesos celulares, como la producción de factores de virulencia, enzimas de degradación de compuestos, fijación de nitrógeno, diferentes tipos de respiración y síntesis de aminoácidos. La predicción del motivo de unión de FNR (caja de anaerobiosis) en la región promotora de los genes identificados como blancos de regulación, utilizando algunas de las herramientas del servidor RSA Tools (<http://rsat.ulb.ac.be/rsat/>), sugiere que aproximadamente el 35% de estos genes tienen una caja de anaerobiosis.

Uno de los retos más grandes de este trabajo fue el análisis e interpretación de los datos derivados del microarreglos. Más allá de los requerimientos bioinformáticos que las nuevas metodologías de secuenciación demandan, consideramos que la secuenciación masiva de RNA. (RNA-Seq) es una mejor herramienta para obtener los datos del transcriptoma.

## ABSTRACT

Nitrogen is a fundamental nutrient that limits plant growth. Biological nitrogen fixation (BNF) provides the highest amount of fixed nitrogen in terrestrial ecosystems, and is also a natural alternative for the use of chemical fertilizers in the agronomical industry. In order for the benefits of BNF to have repercussions in a better quality of crops and an increase in productivity it is necessary that the beneficial interactions between bacteria and plants are better understood. Bacteria from the *Rhizobium* genera establish a symbiotic relationship with the roots of legume plants in a structure denominated nodule, in which the BNF takes place. The symbiotic relationship rhizobia-legume represents the culmination of a series of events that require the temporal expression of specific genes. Signaling molecules synthesized by the plant, induce the expression of bacterial genes that in turn promote the synthesis of a signal that induce the expression of plant genes that control changes in the developmental morphology of the roots. The concentration of oxygen and the level of the nitrogen pool are key aspects for the regulation of BNF.

*Rhizobium etli* is a soil bacterium that establishes an effective symbiotic relationship with bean plants (*Phaseolus vulgaris*). The regulatory model of the *fix* genes in *R. etli* CFN42, proposed by our research group, presents novel characteristics when compare to other model rhizobia: (i) the regulatory cascade of *fix* genes starts with an atypical FixL protein (hFixL) and with the absence of a FixJ response regulator; (ii) the response regulator that activate the expression of *fixKf* and is probably the cognate regulator of hFixL, belongs to the family of regulators PhoB/OmpR; the proteins that regulate BNF are encoded in at least three different replicons.

The establishment of an effective symbiotic association between rhizobia and legumes requires the expression of several bacterial and plant genes. In nitrogen-fixing bacteria, oxygen concentration regulates expression of genes related to microaerobic and symbiotic life styles. Although symbiotic nitrogen-fixing bacteria are aerobic organisms, they are exposed to an oxygen-limited environment inside the nodules, which allows nitrogenase activity to be preserved. The high-energy demand for nitrogen fixation is fulfilled through the expression of a terminal oxidase with a high oxygen affinity, the *cbb3*-type oxidase, encoded by the *fixNOQP* operon. The expression of *fixNOQP* is induced microaerobically by a regulatory protein

belonging to the CRP/FNR family. FNR is a protein that contains an O<sub>2</sub>-sensitive [4Fe-4S]<sup>2+</sup> cluster that directly senses oxygen. In *Escherichia coli*, it functions as a global regulator that controls the expression of up to 100 genes in response to oxygen limitation. The protein binds by a helix-turn-helix (HTH) motif to the promoter region of target genes, repressing the expression of genes for aerobic respiration and inducing genes involved in alternative forms of respiration. The consensus DNA binding site for *E. coli* FNR is a symmetrical motif (TTGAT-N<sub>4</sub>-ATCAA) called the FNR box or anaerobox.

FNR homologs have been identified in a wide number of bacteria. A growing number of Fnr homologues, particularly among the Dnr, FixK and NnrR subfamilies, lack the FeS cluster or reactive Cys residues, indicating that these proteins do not respond to molecular oxygen but may respond to different environmental signals. Based on genome analysis, the number of members of the CRP/FNR family now includes 369 members distributed in 14 phylogenetic branches. The FnrN group of regulators includes putative proteins with a slight modification of the conserved cysteine motif of FNR, allowing the assembly of a [4Fe-4S]<sup>2+</sup> cluster and thus redox sensing. On the other hand, regulators belonging to the FixK branch are structurally homologous to FnrN but lack the N-terminal cysteine-rich motif. A characteristic frequently found in sequenced bacterial genomes is the existence of multiple members of the CRP/FNR regulators in the same host. FnrN regulators are key components in the expression of oxygen respiratory pathways in the rhizobia. They are embedded in complex regulatory circuits as exemplified by the interrelationship of chromosomally and plasmid-encoded FnrN regulators with the FixK regulator in *Rhizobium etli*. Our model organism, *Rhizobium etli* CFN42 (strain CFN42 Sm resistant derivative) fixes nitrogen in association with bean plants (*Phaseolus vulgaris* L), its genome contains a chromosome and six large plasmids (pRet42a to pRet42f) whose sizes range from 184.4 to 642.5 kb. Plasmid d corresponds to the symbiotic one (pRet42d or pSym) and contains several genes involved in nodulation and nitrogen-fixation processes. However, some important regulatory elements present on the pSym in other *Rhizobium* species, such as *fixL* and *fixJ*, are not encoded on this replicon in *R. etli* CFN42. A novel FixL-FixKf regulatory cascade participates in microaerobic expression of *R. etli* *fix* genes. The complete genome sequence of this organism has revealed the existence of six CRP/FNR-type proteins (FixKf, FnrNd, FnrNChr, StoRd, Storf and NnrR) whose functions have been studied previously in the context of the microaerobic growth,

regulation of nitrogen fixation and denitrification processes by our research group.

In *R. etli* CFN42, there are two *fixNOQP* operons; one is located in the symbiotic plasmid (*fixNOQPd*), and the other is located in a cryptic plasmid called pRet42f (*fixNOQPf*). Only the *fixNOQPd* operon is required for establishment of an effective symbiosis. Regulators of *fixNOQP* expression are located in plasmid pRet42f, an *hfixL* gene, encoding an unusual homolog of FixL, as well as the *fixKf* gene and the recently described *fixkR* response regulator. None of the regulatory genes identified so far are indispensable for symbiotic nitrogen fixation.

The functional characterization of the two *R. etli* *fnrN* homologs, *fnrNd* and *fnrNchr* (located on pSym and chromosome, respectively) indicated that both proteins participate, together with FixL and FixKf, in the transcriptional control of the *fixNOQPd* operon. Participation of these genes is also seen during the symbiotic process, in which mutations in *fnrNd* and *fnrNchr*, either singly or in combination, lead to reductions in nitrogen fixation.

Two additional regulators belong to the CRP/FNR family. StoRd and StoRf are part of the *fixGHIS* reiterated operons in *R. etli*. These proteins conserve the aminoacid residues required to contact the consensus-binding site of the regulatory targets of FNR from *Escherichia coli*.

The *stoR* genes are positively regulated by FixKf, both copies of StoR affect negatively the expression of *fixNd* and *fixNf* under microaerobic free-living conditions. A differential role for these genes was proposed based on the observation that a mutation in *stoRd* but no in *stoRf* enhanced the nitrogen-fixing capacity of *R. etli* CFN42

Inactivation of either of these genes enhances the microaerobic expression of both *fixNOQP* reiterations increasing also the synthesis of the *cbb3*-type oxidase in nodules. Despite their structural similarity, a differential role of these genes was also revealed, since a mutation in *stoRd* but not in *stoRf* enhanced both the expression of *fixKf* and the nitrogen-fixing capacity of *R. etli* CFN42.

Therefore, *R. etli* employs a regulatory circuit for induction of the *fixNOQPd* operon that involves at least five transcriptional regulators of the CRP/Fnr family. This regulatory circuit may be important for ensuring optimal production of the *cbb3*, terminal oxidase during symbiosis.

Downstream of the pRet42f *fix* region, there is a gene cluster related with the denitrification process that includes genes encoding for the Cu-containing nitrite reductase (*nirK*), a cytochrome-*c* type nitric oxide reductase (*norCBQD*), and a pseudoazurin (*azuPf*). An additional

gene, *nnrR*, is also present in the *nirK-norC* region. NnrR, belongs to the CRP/FNR type regulators, was described as a transcriptional regulator for *nirK* and *norC* genes in the presence of N oxides. *R. etli* CFN42 is a nondenitrifying bacteria, unable to use nitrate for respiration and lacks nitrate reductase activity as well as the *nap* or *nar* genes encoding respiratory nitrate reductase. Therefore, the presence of NirK and NorC coding regions in an otherwise nondenitrifying bacterium can be explained by proposing that these enzymes have an N oxide–detoxifying role in *R. etli*, thus preventing accumulation of NO inside the cell. We demonstrated that in *R. etli* CFN42, the product of *norC* is required in vivo to detoxify NO and that the balance between the activities of NirK and NorC determine the level of tolerance to NO. The particular genomic arrangement in *R. etli* of *nirK* and *nnrR* genes in a single operon suggests that NnrR controls its own expression in response to NO. Nitrite reductase activity and *norC* expression are totally dependent on NnrR. Therefore, gene expression in response to NO is tightly regulated in this bacterium to prevent deleterious effects by the expression of the nitrite reductase.

To our knowledge, the functional characterization of the *R. etli* CFN42 FNR type regulators, conducted by our group, represents the only example in rhizobia that described the function of all these regulators.

The main objective of this work was to describe the global regulatory networks that operate in *R. etli* in response to changes in oxygen concentration in the environment, and gain insight into the participation of the FNR regulatory proteins in the control of the expression of additional genes. We focused our experimental approach in the functional and phenotypic characterization of a complete *R. etli* FNR mutant. From this perspective, we analyzed the genes whose expression is dependent on the FNR regulators through transcriptomic and bioinformatics analysis. *R. etli* gene expression profiling was measurement using an microarray containing 70-mer oligonucleotides representing the 6,034 predicted *R. etli* open reading frames (ORFs) spotted in duplicate.

Our expression analysis allowed us to propose that the FNR regulators in *R. etli* control the expression of more that 100 genes involved in different cellular processes such as production of virulence factors, enzymes degradation compounds, nitrogen fixation, different types of respiration and amino acid synthesis.

The regulatory region of the potential FNR target genes were analyzed using the RSA tools web server (<http://rsat.ulb.ac.be/rsat/>) to predict FNR-binding motifs in promoters of regulated genes. We found that in approximately 35% of the regulated genes there is an FNR-binding sequence. It is important to know, that one of the most important challenge in this work was to be able to decide the methodology to analyzed the transcriptome data. Besides this experience, we consider the use of high-throughput sequencing technologies (RNA-Seq) as a better tool for transcriptomics.

## ÍNDICE GENERAL

### INTRODUCCIÓN

Fijación biológica de nitrógeno-----	1
Nitrogenasa-----	1
Paradoja del oxígeno-----	3
Establecimiento de la relación simbiótica leguminosa-rhizobio-----	4
Proteínas detectoras de oxígeno-----	6
Regulación genética de la fijación de nitrógeno-----	9
La familia de reguladores CRP/FNR-----	10
<i>Rhizobium etli</i> como modelo de estudio-----	13

<b>OBJETIVO</b> -----	18
-----------------------	----

<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> -----	18
-------------------------------------	----

<b>JUSTIFICACIÓN</b> -----	18
----------------------------	----

### METODOLOGIA

Crecimiento de cepas bacterianas y medios de cultivo-----	20
Análisis del perfil de plásmidos de <i>Rhizobium</i> en geles tipo Eckhardt-----	20
Conjugación bacteriana-----	20
Crecimiento de <i>R. etli</i> en medio mínimo y con diferentes concentraciones de O <sub>2</sub> -----	21
Determinación de la actividad β-glucuronidasa-----	22
Hibridación tipo “Southern”-----	22
Microarreglos -----	23
Cultivo de bacterias para la extracción de RNA-----	23
Extracción de RNA (KIT RNeasy QIAGEN 74104)-----	23
Marcaje del RNA-----	23
Microarreglo de <i>R. etli</i> -----	24
Pretratamiento de la laminilla-----	24
Hibridación -----	24
Fabricación y procesamiento de imágenes de microarreglos-----	25

Análisis de los datos de microarreglos-----	26
Método GenArise-----	27
Método productos de rango-----	27
Coefficiente de correlación simple de Pearson Cy3 vs Cy5-----	28
Métodos bioinformáticos-----	28

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Construcción de una mutante FNR de <i>R. etli</i> -----	30
Análisis de la expresión microaeróbica de <i>fixNd</i> y <i>nifH</i> -----	32
Análisis del crecimiento de <i>R. etli</i> en diferentes condiciones-----	34
Análisis comparativo de expresión microaeróbica de <i>R. etli</i> CFN42 por microarreglos---	35
Implementación de métodos estadísticos para determinar reproducibilidad-----	36
GenArise-----	36
Productos de rango-----	37
Los reguladores tipo FNR en la expresión microaeróbica de <i>R. etli</i> -----	40
Interpretación biológica de los datos experimentales-----	40
Predicción de cajas de anerobiosis en los genes regulados por FNR en <i>R. etli</i> -----	48

<b>CONCLUSIONES</b> -----	51
---------------------------	----

<b>REFERENCIAS</b> -----	53
--------------------------	----

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### FIGURAS.

Figura 1. Estructura de la nitrogenasa-----	2
Figura 2. Distribución del oxígeno dentro del nódulo fijador de nitrógeno-----	3
Figura 3. Biogénesis del nódulo-----	5
Figura 4. Modelos de regulación de los genes <i>nif</i> y <i>fix</i> en <i>S. meliloti</i> y <i>B. japonicum</i> -----	10
Figura 5. Organización estructural de las proteínas FNR-----	12
Figura 6. Modelo de promotores activados por FNR-----	13
Figura 7. Modelo de regulación de los genes <i>fix</i> en <i>R. etli</i> CFN42-----	17
Figura 8. Desarrollo del experimento de microarreglos-----	25
Figura 9. Análisis de mutantes-----	31
Figura 10. Análisis de transconjugantes-----	33
Figura 11. Expresión microaeróbica de <i>fixNd</i> y <i>nifH</i> -----	33
Figura 12. Curvas de crecimiento de <i>Rhizobium</i> -----	34
Figura 13. Imágenes de microarreglos-----	35
Figura 14. Diagrama de Venn -----	39
Figura 15. Clasificación por COG's de los genes expresados diferencialmente-----	43
Figura 16. Esquema de la fosforilación oxidativa-----	44
Figura 17. Esquema de la ruta de biosíntesis de leucina, isoleucina y valina-----	45
Figura 18. Estructura y biogénesis de ribosomas -----	47
Figura 19. Logo del sitio de unión de los reguladores tipo FNR en <i>R. etli</i> -----	49

### TABLAS.

Tabla 1. Cuantificación de expresión por el método de GeneArise-----	37
Tabla 2. Cuantificación de expresión por el método de productos de rango -----	38
Tabla 3. Coeficiente de correlación simple de Pearson entre las muestras-----	40
Tabla 4. Genes regulados por FNR en los plásmidos pRet42d y pRet42f de <i>R. etli</i> -----	41
Tabla 5. Clasificación por COG's de genes regulados por FNR en <i>R. etli</i> -----	42
Tabla 6. Nuevos blancos de regulación de FNR con caja de anaerobiosis-----	50

## INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Genes Reprimidos en la cepa FNR-Método G.A.-----	60
Anexo 2. Genes Inducidos en la cepa FNR-Método G.A -----	68
Anexo 3. Genes con regulación positiva identificados por RP-----	74
Anexo 4. Genes con regulación negativa identificados por RP-----	78
Anexo 5. Genes con regulación positiva identificados, por los dos métodos de análisis-----	80
Anexo 6. Genes con regulación negativa identificados por los dos métodos de análisis-----	84
Anexo 7. Genes regulados positivamente con cajas de anaerobiosis-----	86
Anexo 8. Genes regulados negativamente con caja de anaerobiosis -----	91
Anexo 9. Tabla de Cepas-----	93

## ABREVIATURAS.

ATP	Adenosín trifosfato	NO <sub>3</sub>	Nitrato
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico	<i>orf</i>	Marco abierto de lectura
BSA	Albúmina de suero bovino	<i>oriT</i>	Origen de transferencia
Ca <sup>+</sup> .	Calcio	pb	Pares de bases
CRP	Receptor de AMPc	PNPG	4-nitrofenil β-D-glucorónido
Cy3-dCTP	Cianina, Cy3 verde	PY	Peptona-extracto de levadura
Cy5-dCTP	Cianina, Cy5 roja	r.p.m.	Revoluciones por minuto
DO	Densidad óptica	RP	Productos de Rango
DTT	Ditiotreitol	SDS	N-dodecilsulfato, sal disódica
EDTA	Acido etilendinitrilo tetra acético	Sm	Estreptomina
FAD	Flavín adenín dinucleótido	Sp	Espectinomicina
FBN	Fijación biológica de nitrógeno	SSC	Solución de lavado
FNR	Regulador Nitrato y Fumarato	T.A.	Temperatura ambiente
GA	GenArise	dH <sub>2</sub> O-DEPC	H <sub>2</sub> O-Dietilpirocarbonato
Kb	Kilobase		
Km	Kanamicina		
Mg	Microgramos		
Min	Minutos		
mL	Mililitros		
MMY	Medio mínimo		
N <sub>2</sub>	Nitrógeno		
Nal	Ácido nalidíxico		
NH <sub>3</sub>	Amoníaco		
nm	nanómetros		
nmol	nanomol		
NO-	Oxido nítrico		

## INTRODUCCIÓN

### **Fijación biológica de nitrógeno**

El nitrógeno es un elemento esencial para los seres vivos, ya que forma parte de macromoléculas importantes para la vida como son los ácidos nucleicos y las proteínas. El nitrógeno molecular ( $N_2$ ) es el componente principal de la atmósfera terrestre, representando el 78% de su composición. Sin embargo, esta forma químicamente inerte, no puede ser utilizada por la mayoría de los organismos (Lance *et al.*, 2009).

La entrada de  $N_2$  en el ciclo biogeoquímico del nitrógeno ocurre por la reducción de este, produciendo dos moléculas de amoníaco ( $NH_3$ ) mismas que se convierten posteriormente en otras formas utilizables como nitrato ( $NO_3$ ). Este proceso de reducción del  $N_2$  es conocido como fijación de nitrógeno la cual puede ser llevada a cabo química o biológicamente a través del mismo mecanismo.

Cerca del 60% de la reducción de  $N_2$  se realiza a través de la fijación biológica de nitrógeno (FBN). Los sistemas biológicos capaces de fijar nitrógeno son clasificados como no-simbióticos y simbióticos, dependiendo del requerimiento de uno o más de un organismo para llevar a cabo el proceso. Pertenecen al grupo alfa de proteobacterias y son denominados diazotrofos. La reducción de  $N_2$  restante se lleva a cabo por el proceso Haber-Bosch en el sector industrial, proceso que requiere un catalizador metálico,  $H_2$ , y altas presiones y temperaturas (Lance *et al.*, 2009).

### **Nitrogenasa**

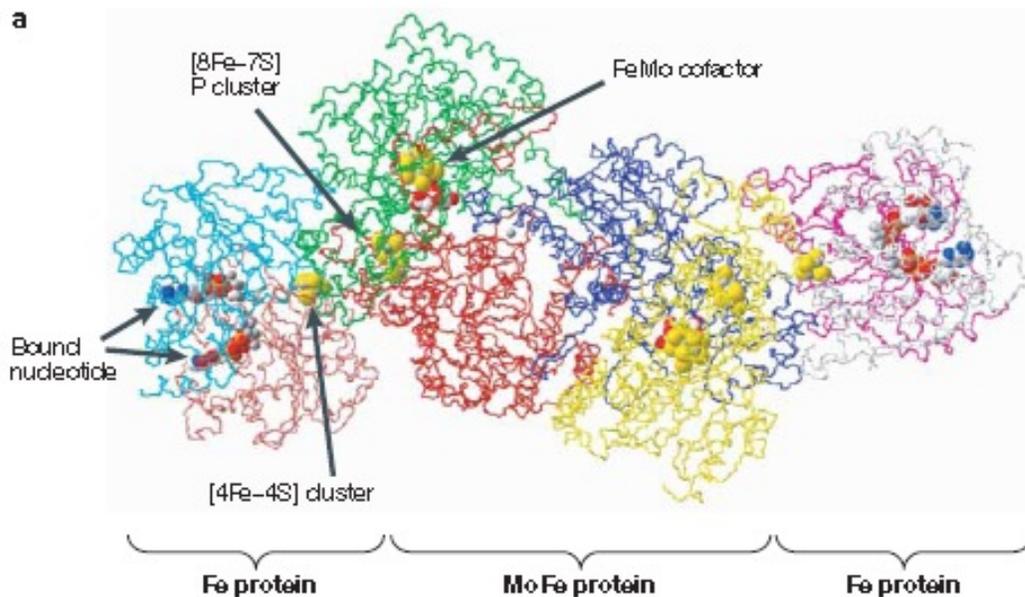
La enzima responsable de la FBN es la enzima nitrogenasa, un complejo enzimático que requiere un catalizador metálico y un alto consumo de energía en forma de ATP. Hay tres tipos de nitrogenasas distintos bioquímica y genéticamente. Cada una está codificada por un único grupo de genes y cada una con una combinación diferente de metales en el sitio activo: la más ampliamente distribuída y mejor caracterizada es la que contiene molibdeno (Mo-nitrogenasa), una nitrogenasa que contiene vanadio (V-nitrogenasa) y una que solo contiene Fe. (Lance *et al.*, 2009; Masukawa *et al.*, 2009). Las nitrogenasas contienen dos componentes que son nombrados de acuerdo con la composición de sus centros metálicos. Un componente dimérico pequeño, conocido como proteína de hierro, que se encarga en donar electrones, de

una forma dependiente de ATP, hacia el componente mayor, un heterotetrámero que contiene el sitio catalítico de la enzima (Fig. 1). En condiciones de escasez de molibdeno algunas bacterias son capaces de usar un cofactor de vanadio-hierro o de hierro-hierro para llevar a cabo la reducción del dinitrógeno (Eady, 1996; Dixon y Kahn, 2004).

De manera general, la reacción catalizada por la nitrogenasa para la fijación de nitrógeno en condiciones óptimas, está representada en la siguiente ecuación:



Los electrones son cedidos a la proteína de hierro a través de donadores como la ferredoxina o la flavodoxina. La proteína de hierro transfiere uno a uno los electrones al sitio activo de la proteína. En cada ciclo catalítico el complejo se asocia y se disocia (Hagemany Burris, 1978; Dixon y Kahn, 2004).



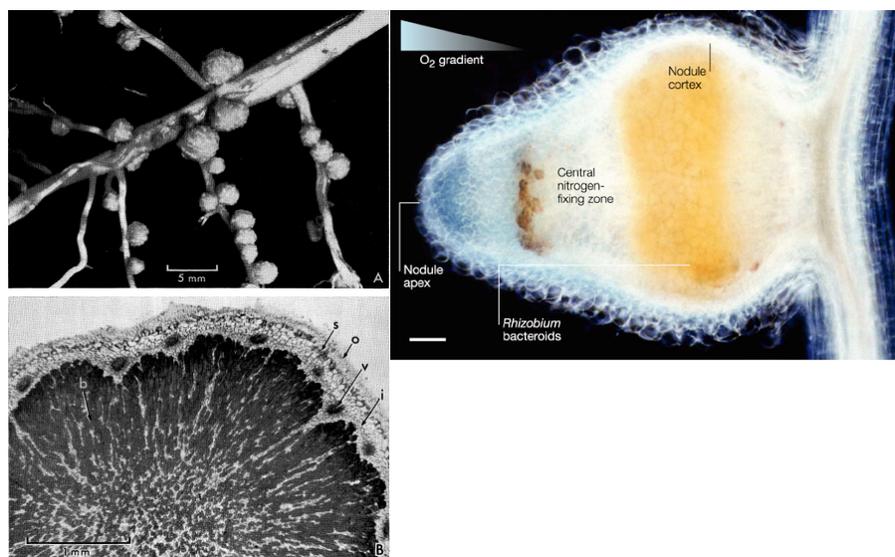
**Figura 1.** Estructura de la nitrogenasa

La presencia de centros metálicos en sus dos componentes hace de la nitrogenasa una enzima altamente sensible al oxígeno, por la tanto, la síntesis de la nitrogenasa está estrictamente regulado a nivel transcripcional en respuesta a la concentración de oxígeno (Einsle *et al.*, 2002; Dixon y Kahn, 2004; Seefeldt *et al.*, 2004). Esto, junto con el alto gasto en energía necesario para la reducción de un mol de  $N_2$  a  $NH_3$ , obliga a que los circuitos regulatorios ejerzan un fino control en su síntesis para proteger a la enzima del daño por oxígeno.

### Paradoja del oxígeno.

La estequiometría de la reacción de reducción de nitrógeno demuestra que el proceso de la fijación de nitrógeno es energéticamente muy costoso, por lo que se requiere un metabolismo activo capaz de suministrar el ATP necesario para que se lleve a cabo la reacción. El metabolismo de los organismos aerobios es el más eficiente en este aspecto, pero en ellos el oxígeno es el último aceptor de electrones en la cadena respiratoria.

Existen diferentes estrategias para que la fijación de nitrógeno se lleve a cabo a pesar de los factores negativos que la limitan. Por ejemplo, algunas bacterias facultativas o capaces de respirar o crecer en ausencia de oxígeno pueden fijar nitrógeno en ambientes anaerobios. Otros, fijadores aerobios estrictos, limitan el oxígeno capaz de reaccionar con la nitrogenasa optimizando su reducción en la cadena respiratoria a través de citocromo oxidetasas de alta afinidad. Otro ejemplo es el que ocurre en la simbiosis leguminosa-rhizobio. Los rhizobios son capaces de colonizar estructuras especializadas en la raíz de las leguminosas conocidos como nódulos cuya estructura limita la difusión de oxígeno (Fig. 2).



**Figura 2.** Izquierda. Nódulo determinado de soja  
Derecha. Distribución del oxígeno dentro de un nódulo indeterminado de medicago.

Estas estructuras forman una barrera de difusión cortical que permite la formación de un gradiente longitudinal de oxígeno, que se traduce en una caída en su concentración menor a 50 nM en la zona central del nódulo, en la cual se encuentran los Rhizobios diferenciados en bacteroides. La difusión del oxígeno requiere de un sistema de transporte intracelular que garantice su llegada a los bacteroides; esta función la cumple una proteína de la planta llamada leghemoglobina. Así mismo, la respiración del bacteroide es posible por la inducción de una oxidasa terminal de alta afinidad por el oxígeno tipo *cbb<sub>3</sub>*. (Dixon y Kahn, 2004).

Al tratarse de un proceso de alto costo energético, la célula cuenta con mecanismos para garantizar que éste se lleve a cabo exclusivamente cuando las condiciones ambientales sean favorables y cuando el producto de la reacción sea necesario. Es por ello que la detección de una concentración de oxígeno favorable para la reacción y el monitoreo del reservorio intracelular de nitrógeno son puntos clave para la regulación del proceso.

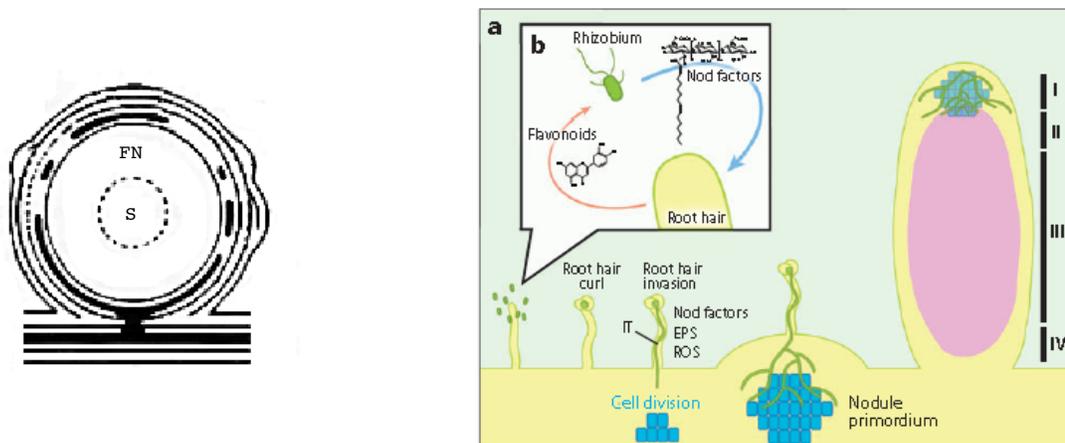
### **Establecimiento de la relación simbiótica leguminosa-rhizobio**

Los rhizobiales son un grupo de alfa proteo-bacterias fijadoras de nitrógeno que comparten características en común y se agrupan de forma cercana en los análisis filogenéticos. Son capaces de colonizar órganos especializados en las leguminosas, colonización que es de tipo especie - específico: por lo general, una especie de leguminosa es colonizada por un número limitado de especies de rhizobios (Gibson *et al.*, 2008).

A los órganos especializados donde se lleva a cabo la colonización por los rhizobiales se les conoce como nódulos. El desarrollo de los nódulos se da en células corticales de la raíz de las leguminosas en estado G<sub>0</sub>. Un subconjunto de células del meristemo entran en un programa modificado del ciclo celular en el cual existe endoreduplicación y dan origen a células endoploides alargadas, en las cuales se lleva a cabo la invasión inicial del nódulo (primordio del nódulo), el cual posteriormente se convertirá en el nódulo maduro (Stracke *et al.*, 2002; Gibson *et al.*, 2008). Las bacterias infectan las raíces de la leguminosa, provocando cambios morfológicos que permiten que queden atrapadas en la raíz. Posteriormente se internalizan en las mismas a través de una estructura formada por la hidrólisis de la pared celular de la planta, conocida como hilo de infección. Es a través de este hilo como las bacterias son transportadas hacia las células endoploides del meristemo, donde son endocitadas hacia el citoplasma de las

mismas, sitio en el cual se diferencian hacia bacteroides capaces de llevar a cabo la fijación de nitrógeno (Fig. 3) (Gage *et al.*, 2004; Gibson *et al.*, 2008).

La comunicación química entre la planta y la bacteria se da principalmente a través de dos tipos de moléculas: los flavonoides y los factores de nodulación. Como ya se mencionó anteriormente, esta interacción es especie-específico; la especificidad se debe a que los rizobiales son capaces de identificar una limitada variedad de flavonoides y la variedad de flavonoides secretada es específica para cada leguminosa. Los rizobiales poseen una proteína detectora de flavonoides llamada NodD. NodD es un regulador transcripcional de la familia LysR, capaz de detectar flavonoides compatibles y en respuesta activar la expresión de los genes que permiten la producción de los factores de nodulación. La estructura de los factores de nodulación está conformada por un esqueleto de quitina (polímero de  $\beta$ -(1,4)-N-acetil-D-glucosamina-L-glucosamina), modificado en el residuo terminal no reductor (carbono C2) por un ácido graso cuyo tamaño y estado de saturación varía de una especie a otra. Los anillos del esqueleto de quitina también pueden ser modificados por sustituyentes químicos, como los grupos fucosilo, acetilo, sulfurilo, metilo, carbamoilo y, arabinosilo. Estas modificaciones juegan un papel importante en el reconocimiento por el hospedero y en etapas subsecuentes de la invasión (Fig. 3). (Gibson *et al.*, 2008).



**Figura 3.** (Izquierda) Nódulo determinado FN: zona de fijación de  $N_2$ , S: senescencia (Derecha) Biogénesis del nódulo. (a) Raíces de la leguminosa infectada por rizobios y desarrollo del nódulo. Los números I, II, III y IV representan las diferentes zonas de

organización en un el nódulo indeterminado. (b) comunicación química entre la planta y la bacteria (Gibson *et al.*, 2008).

Por lo general, los nódulos se clasifican morfológicamente en dos clases: nódulos determinados y nódulos indeterminados. Esta clasificación se basa en el patrón de crecimiento del meristemo. El número de divisiones de las células del meristemo es limitado en los nódulos determinados, mientras que la capacidad de las células del meristemo en nódulos indeterminados es ilimitada. A diferencia de los nódulos determinados, en los nódulos indeterminados existe una organización espacial de células bacterianas y de la planta en diferentes estadios del desarrollo. En esta clase de nódulos se pueden identificar cuatro zonas y una inter-zona nombradas por su cercanía a la raíz, la zona más proximal es la I (que es el meristemo), le sigue la zona II, conocida como zona de infección, la interzona II/III, la zona III, que es el sitio donde se lleva a cabo la fijación de nitrógeno y la zona IV que es la zona de senescencia (Fig. 3) (Gibson *et al.*, 2008).

### **Proteínas detectoras de oxígeno**

Las bacterias fijadoras de nitrógeno tienen la capacidad de responder a cambios en la concentración de oxígeno a través de diferentes tipos de sistemas de regulación. Se reconocen cuatro proteínas detectoras: FixL, NifA, NifL y RegB.

Los dominios estructurales de FixL y NifL son análogos, a excepción del dominio de cinasa de histidinas, ausente en NifL. Las dos proteínas poseen uno o dos dominios PAS en el extremo amino terminal, un tipo de dominios que se ha visto asociado con proteínas detectoras de oxígeno, estado redox, voltaje y luz, tanto en organismos procariontes como eucariontes (Taylor y Zhulin, 1999). El mecanismo de detección es diferente para las dos proteínas: el dominio PAS de FixL posee un grupo prostético hemo, mientras que el dominio PAS de NifL tiene como grupo prostético un grupo FAD (flavin adenin dinucleótido) (Gilles-González *et al.*; 1991; Hill *et al.*, 1996).

La unión reversible del oxígeno al grupo hemo en FixL regula la actividad del dominio de cinasa de histidinas: en ausencia de oxígeno, FixL se autofosforila y es capaz de transferir el fosfato al regulador de la respuesta FixJ (Tuckerman *et al.*, 2002). Se han reportado las

estructuras de FixL de *Sinorhizobium meliloti* y *Bradyrhizobium japonicum*, con y sin ligando, lo que ha permitido sugerir un modelo estructural para *B. japonicum*. En él se propone que la Arg220 forma un puente salino con el propionato del grupo hemo, el cual se rompe en presencia de oxígeno, ya que este residuo de la Arg 220 forma un puente de hidrógeno con ésta molécula (Hao *et al.*, 2002). No está claro aún cómo se da el mecanismo de regulación alostérica del dominio de cinasa de histidina.

Por su parte, NifL es un antiactivador del regulador NifA, y su efecto regulador depende de la capacidad de interactuar con dicho blanco. En su estado oxidado, el grupo FAD en el dominio PAS permite la interacción entre estas dos proteínas. Sin embargo, en el estado reducido se ha visto que el complejo FADH<sub>2</sub> NifL de *Azotobacter vinelandii* es incapaz de reprimir la actividad de NifA (Hill *et al.*, 1996). NifL posee un dominio de HATPasa en el dominio carboxilo terminal que pertenece a la misma familia del dominio HATPasa de las cinasas de histidina; sin embargo, es incapaz de hidrolizar ATP. A pesar de ello, este dominio tiene la capacidad de unir nucleótidos de adenina y es fundamental para la interacción con NifA (Söderbäck *et al.*, 1998). Aún se desconoce si los cambios estructurales existentes en el dominio PAS en respuesta al estado redox pueden ser transmitidos al dominio carboxilo terminal de NifL. Se ha propuesto al oxígeno como la molécula oxidante en condiciones fisiológicas y al reservorio de quinonas reducidas como la fuente de transporte de electrones al grupo FAD en *Klebsiella pneumoniae*. La reducción de NifL está asociada con su unión reversible a la membrana: el hecho de que NifA permanezca siempre en el citoplasma hace suponer que éste es un mecanismo adicional para evitar que NifA y NifL interactúen en condiciones anaeróbicas (Grabbe y Schmitz, 2003).

NifA es el regulador transcripcional encargado de activar la expresión de genes cuyos productos son importantes para el proceso de fijación de nitrógeno. Este regulador pertenece a la familia EBP (“enhancer binding proteins”) y funciona en conjunto con el factor sigma 54 de la RNA polimerasa. El diseño de los dominios de NifA es similar a la de otros miembros de la familia, con un dominio central AAA<sup>+</sup> ATPasa flanqueado por un dominio regulador en el extremo amino terminal y un dominio de unión a DNA del tipo HTH en el extremo carboxilo terminal, dominio que le permite contactar las cajas UAS típicas para este tipo de reguladores. En el extremo amino terminal se encuentra también un dominio GAF, dominios que son

capaces de interactuar con pequeñas moléculas, como los nucleótidos cíclicos (Ho *et al.*, 2000). El papel de este dominio en proteínas NifA de diferentes diazotrofos es variable: por ejemplo, NifA de *A. vinelandii* une 2-oxoglutarato a través del dominio GAF y esto permite la interacción con el antiactivador NifL, mientras que la unión de 2-oxoglutarato no se ha observado para NifA de *K. pneumoniae* (Little y Dixon, 2003). En organismos en los cuales NifL no se encuentra codificada en el genoma, la proteína NifA posee una región de alrededor de 100 residuos, entre el dominio central AAA<sup>+</sup> y el dominio de unión a DNA, en la que se localiza un motivo invariable del tipo Cys-X<sub>4</sub>-Cys. Además, otra cisteína conservada se localiza en el dominio de unión a DNA (Fischer *et al.*, 1994). La presencia de cada una de estas cisteínas es fundamental para la función de NifA. La presencia de metales, en particular Fe<sup>2+</sup>, es también necesaria para la actividad de esta proteína, lo que sugiere un mecanismo de coordinación de hierro por parte de estas cisteínas conservadas (Fischer *et al.*, 1988).

El sistema de dos componentes sensible al estado redox RegB-RegA, inicialmente descrito en alfa proteobacterias fotosintéticas, es capaz de regular la expresión del regulador NifA en diferentes diazotrofos. En *Rhodobacter capsulatus*, este sistema (en conjunto con NtrC) activa la expresión de *nifA2*. En *B. japonicum*, los homólogos RegS-RegR controlan la expresión de *nifA* durante la simbiosis (Bauer *et al.*, 1998; Emmerich *et al.*, 2000; Elsen *et al.*, 2000).

La cinasa de histidinas RegB y sus homólogos poseen una cisteína conservada en la región que une el dominio de autofosforilación y el dominio de unión de ATP. Este aminoácido es fundamental para detectar el estado redox: en su estado oxidado, esta cisteína forma un puente disulfuro intermolecular que convierte a la proteína de un estado dimérico activo a un estado tetramérico inactivo. La formación de este puente disulfuro es dependiente de un metal en RegB; lo más probable es que en condiciones fisiológicas el cofactor sea el cobre (Swem *et al.*, 2003). En el homólogo de RegB (PrrB) de *Rhodobacter spheroides*, el flujo de electrones a través del complejo *cbb<sub>3</sub>* (una oxidasa terminal de alta afinidad por el oxígeno) regula la actividad de fosfatasa de esta proteína. Cuando la concentración de oxígeno es alta, la actividad de fosfatasa de PrrB se incrementa sin influir en la actividad de cinasa (Oh *et al.*, 2004). Esto sugiere que la capacidad de detección de este tipo de proteínas depende tanto de la cisteína conservada como de la regulación por la *cbb<sub>3</sub>*.

## Regulación genética de la fijación de nitrógeno

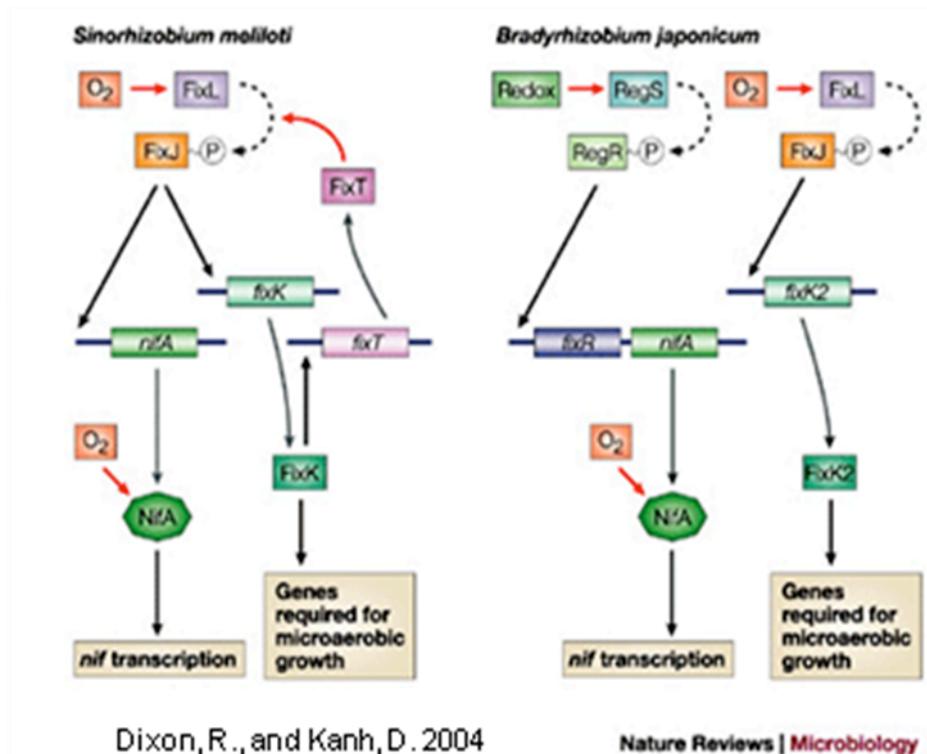
Como se mencionó anteriormente, el proceso de fijación de nitrógeno es regulado de manera jerárquica. Las principales moléculas reguladoras son el nitrógeno y el oxígeno. La detección de los niveles de nitrógeno es particularmente determinante para la fijación de nitrógeno en diazótrofos de vida libre, como *K. pneumoniae*, mientras que para diazótrofos simbióticos la señal clave la da el oxígeno. La regulación por oxígeno en bacterias diazótroficas de vida libre se da a nivel de NifA o de NifL, como ya se ha mencionado en párrafos anteriores (Dixon y Kahn, 2004).

En organismos simbióticos fijadores de nitrógeno, como *S. meliloti* y *B. japonicum*, una de las señales principales de regulación es el oxígeno, sin embargo los mecanismos de regulación a la respuesta son diferentes en cada modelo (figura 4). Los genes importantes en el proceso de la fijación de nitrógeno son básicamente de dos tipos: los genes *nif* y los genes *fix*, los primeros codifican para el complejo de la nitrogenasa y proteínas accesorias, mientras que los genes *fix* en su mayoría codifican para genes que permiten mantener un metabolismo activo en condiciones microaeróbicas. En *S. meliloti*, los genes *nif* y los genes *fix* están bajo el control de un solo sistema de dos componentes, el sistema FixL-FixJ.

El regulador de la respuesta FixJ activa la expresión de los reguladores NifA y FixK. NifA es el regulador de los genes *nif* y es sensible a oxígeno, en estos organismos no hay un gen que codifique para el regulador NifL.

El regulador FixK pertenece a la familia CRP/FNR y activa la expresión de los operones *fixNOQP* y *fixGHIS*, entre otros blancos. El primero de esos operones codifica para la oxidasa terminal tipo *cbb<sub>3</sub>* y el segundo codifica para un complejo que permite el ensamblaje adecuado de la *cbb<sub>3</sub>* y, probablemente, el transporte de su cofactor de cobre.

Una peculiaridad del sistema de *S. meliloti* es la presencia de la proteína FixT, que regula negativamente la actividad de la cinasa de histidinas FixL. La expresión de este regulador está controlada positivamente por el sistema FixL-FixJ. En *B. japonicum* los genes *nif* y los genes *fix* están regulados por sistemas de dos componentes independientes. El regulador NifA está bajo el control del sistema de dos componentes RegS-RegR, mientras que el regulador FixK2 es regulado por el sistema de dos componentes FixL-FixJ (Fig. 4) (Dixon y Kahn, 2004).



**Figura 4.** Modelos de regulación de los genes *nif* y *fix* en *S. meliloti* y *B. japonicum*, en respuesta a la concentración de O<sub>2</sub>

### La familia de reguladores CRP/FNR

Las familias de reguladores transcripcionales agrupan proteínas que comparten características estructurales y/o funcionales o que tienen una relación filogenética entre ellas. La familia CRP/FNR está conformada por proteínas relacionadas con los reguladores CRP (*cyclic-AMP receptor*) y FNR (*anaerobic fumarate and nitrate reduction*) de *Escherichia coli*. El primero es un regulador global, que es activado por el segundo mensajero AMPc y que participa en el fenómeno de represión catabólica, mientras que el segundo es un regulador transcripcional de proteínas fundamentales para la respiración anaeróbica.

La estructura tridimensional de CRP y el complejo CRP-DNA ya está descrita y analizada (Schultz *et al.*, 1991; Parkinson *et al.*, 1996 a y 1996b; Passner y Steitz, 1997), Este regulador transcripcional funciona como un homodímero que se une simétricamente a una secuencia

específica de sus genes blancos. El sitio de unión de CRP al DNA corresponde a una secuencia palindrómica con el siguiente consenso: AAATGTGATCTAGATCACATTT (Busby y Ebright, 1999).

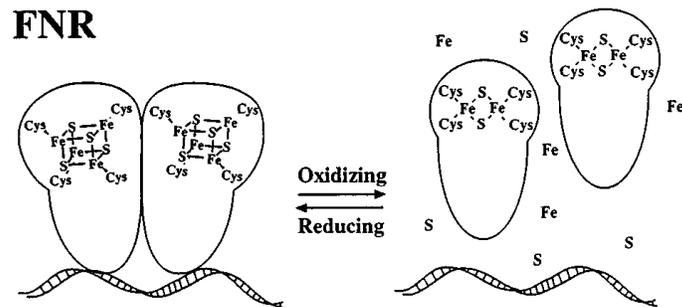
Los promotores de genes regulados por CRP se agrupan en tres clases:

Los promotores de clase I, como el promotor del operón *lac*, se caracterizan por la presencia de un sitio de unión de CRP localizado cerca de la posición -62 con respecto al sitio de inicio de la transcripción. El sitio de unión de CRP en los promotores de clase II se centra cerca de la posición -41.5, translapando con la caja -35.

Los promotores de clase III tienen más de un sitio de unión para CRP, y uno puede estar localizado en la posición típica de los de clase I y el otro en la posición típica de los de clase II, o los dos en la posición de los de clase I (Busby y Ebright, 1999).

FNR es otro regulador global estudiado en *E. coli*, cuya estructura tridimensional no ha sido determinada. Sin embargo, y debido a la similitud de su secuencia con la de CRP, se han podido generar modelos tridimensionales utilizando a CRP como molde de alineamiento (Schultz *et al.*, 1991; Green *et al.*, 1996).

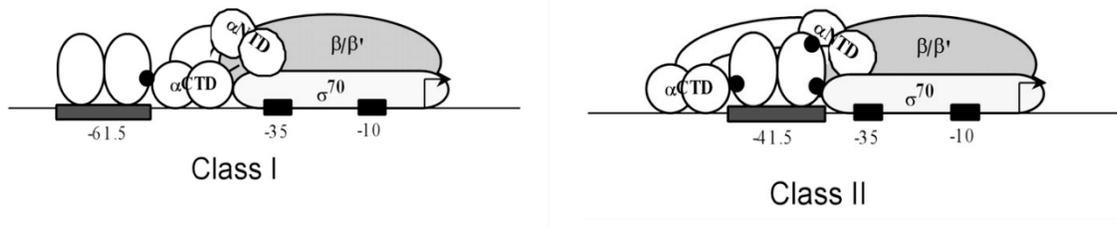
FNR es un monómero en condiciones aeróbicas, y es incapaz de activar la transcripción de sus blancos. En condiciones anaeróbicas, la proteína dimeriza y puede unirse específicamente a una secuencia palindrómica imperfecta conocida como “caja de anaerobiosis” con el consenso TTGAT-N4-ATCAA, activando o reprimiendo la transcripción de sus blancos de regulación. En condiciones anaeróbicas, cada monómero de FNR posee un centro metálico de ([4Fe-4S]) coordinado por cisteínas conservadas, localizadas en el dominio amino-terminal (Fig. 5). La presencia de estos centros metálicos permite detectar la presencia de oxígeno, y su oxidación (en condiciones aeróbicas) promueve su desensamblaje y la formación de la apoproteína (Jervis y Green, 2007; Crack *et al.*, 2008). Otros residuos importantes para la actividad de la proteína se encuentran en la hélice de dimerización (glutamina 150 y aspartato 154) y otros cerca de las cisteínas conservadas (serina 24, por ejemplo). (Moore y Kiley 2001; Jervis *et al.*, 2009).



**Figura 5.** Organización estructural de las proteína FNR con su *cluster* de ([4Fe-4S]) en su forma activa (forma dimérica) e inactiva (forma monomérica) (Bauer *et al.*, 1999).

De manera análoga a los blancos de CRP, las regiones reguladoras de los blancos de FNR se agrupan en tres clases dependiendo de la posición de la caja de anaerobiosis con respecto al sitio de inicio de la transcripción. En los de clase I, la caja FNR se localiza cerca de la posición -61 con respecto al inicio de la transcripción, mientras que en los de clase II, la caja FNR se localiza aproximadamente a -41 nucleótidos con respecto al inicio de la transcripción, translapando con la caja -35. Los promotores de clase III tienen más de un sitio de unión para FNR, y puede localizarse una caja en la posición para los promotores de clase I y otra en la posición para los de clase II o las dos en la posición para los promotores de clase I (Busby y Ebright, 1999).

El contacto entre FNR y la RNA polimerasa (RNAP) involucra dos regiones expuestas de la proteína denominada región activadora I (AR<sub>1</sub>), que contacta el dominio C-terminal de la subunidad  $\alpha$  de la RNAP ( $\alpha$ -CTD) y la región activadora III (AR<sub>3</sub>), la cual contacta al factor  $\sigma^{70}$ . El contacto que se establece entre FNR y la RNAP depende de la arquitectura de cada promotor. En los promotores clase I, el contacto se establece entre la región AR<sub>1</sub> de la subunidad río abajo del dímero de FNR y  $\alpha$  CTD. Mientras que en los promotores clase II, es la subunidad río arriba del dímero de FNR la que hace el contacto con  $\alpha$  CTD. En este caso FNR tiene una segunda interacción con la RNAP: AR<sub>3</sub> de la subunidad río abajo del dímero de FNR contacta una pequeña región de la subunidad  $\sigma^{70}$  de la RNAP como se muestra en la figura 6 (Wing *et al.*, 1995; Ralph *et al.*, 1998; Weber *et al.*, 2005).



**Figura 6.** Modelo de promotores activados por FNR. En este modelo se muestran los puntos de contacto entre el factor sigma 70 de la polimerasa y la proteína FNR de acuerdo al tipo de promotor regulado (Weber *et al.*, 2005).

Se han reportado proteínas tipo FNR en diversas bacterias, con base en su capacidad para compensar una mutación existente en el regulador FNR de *E. coli*, a que pueden unirse a la misma secuencia consenso que esta proteína o a que poseen el motivo conservado EXXSR en la hélice de reconocimiento al DNA. Se ha hecho poco trabajo para caracterizar los determinantes estructurales que controlan la actividad reguladora de estas proteínas, a pesar del hecho de que muchas de ellas poseen elementos de detección novedosos, de su diferente sensibilidad al oxígeno y de que algunas de ellas carecen de las cisteínas conservadas en el dominio amino terminal.

### ***Rhizobium etli* como modelo de estudio**

*Rhizobium etli* es un bacilo aeróbico Gram-negativo, que es capaz de fijar nitrógeno atmosférico en simbiosis con las raíces del frijol (*Phaseolus vulgaris*). Esta bacteria mide de 0.5 a 1 micras de ancho y de 2 a 3 micras de largo; las colonias que forma son circulares, convexas y opacas. El tamaño de las colonias es por lo general de 2 a 4 mm de diámetro cuando se cultivan de dos a tres días en medio rico (PY) con agar y son translucidas cuando la bacteria se cultiva en medio YM. La bacteria es incapaz de crecer en medio LB o en ausencia de calcio. Como la mayoría de los rhizobios, *R. etli* es resistente al ácido nalidíxico. Puede utilizar medio mínimo que contenga malato o succinato como fuente de carbono, pero no medios mínimos que contengan arginina, hipoxantina o sorbitol como única fuente de

esqueletos carbonados. La temperatura óptima de crecimiento es de 30° C (Segovia *et al.*, 1993).

Generalmente, en las especies de *Rhizobium* el genoma está constituido por dos tipos de replicones: el cromosoma y plásmidos de alto peso molecular. El tamaño y el número de plásmidos en las especies de *Rhizobium* es muy variable. En el caso particular de *Rhizobium etli* CFN42, el material genético consiste de un cromosoma de 4.7 Mpb y seis plásmidos (pRet42a a pRet42f), cuyo tamaño oscila entre 180 y 600 kpb, y que en conjunto suman 2.3 Mpb (Brom *et al.*, 1988; González *et al.*, 2006).

En organismos de la familia de los *Rhizobiales* se han identificado algunas proteínas tipo FNR. Por la relación filogenética que guardan entre ellas y con los miembros de la familia CRP-FNR, se han agrupado en diferentes subfamilias: la subfamilia FixK, la subfamilia FnrN, la subfamilia NnrR y la subfamilia DNR (Körner *et al.*, 2003).

Las proteínas tipo FnrN de los *Rhizobiales* conservan las cuatro cisteínas en una localización similar a la de la proteína FNR de *E. coli*. Los miembros de la subfamilia FixK son capaces de unirse a cajas de anaerobiosis pero carecen de las cuatro cisteínas conservadas en los homólogos más cercanos a FNR. El estado oligomérico de FixK<sub>2</sub>, una proteína reguladora clave del proceso de fijación de nitrógeno de *B. japonicum*, ha sido analizado *in vitro*. Esta proteína no posee centros de hierro-azufre y es capaz de activar la transcripción *in vitro* en presencia de oxígeno (Mesa *et al.*, 2005).

Se ha demostrado que FnrN de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* es capaz de activar la transcripción de algunos blancos de FNR en el fondo genético heterólogo de *E. coli*, aunque sólo en condiciones anaeróbicas (Schlüter *et al.*, 1992). Esto sugiere que este tipo de proteínas son capaces de detectar los niveles de oxígeno, quizás mediante un mecanismo similar al de FNR.

Las proteínas de tipo NnrR controlan la transcripción de genes involucrados en la vía de desnitrificación. Se ha demostrado en diferentes modelos biológicos que esta clase de proteínas son capaces de detectar óxido nítrico, aunque el mecanismo de detección se desconoce (Mesa *et al.*, 2003; Hartsock y Shapleigh, 2010).

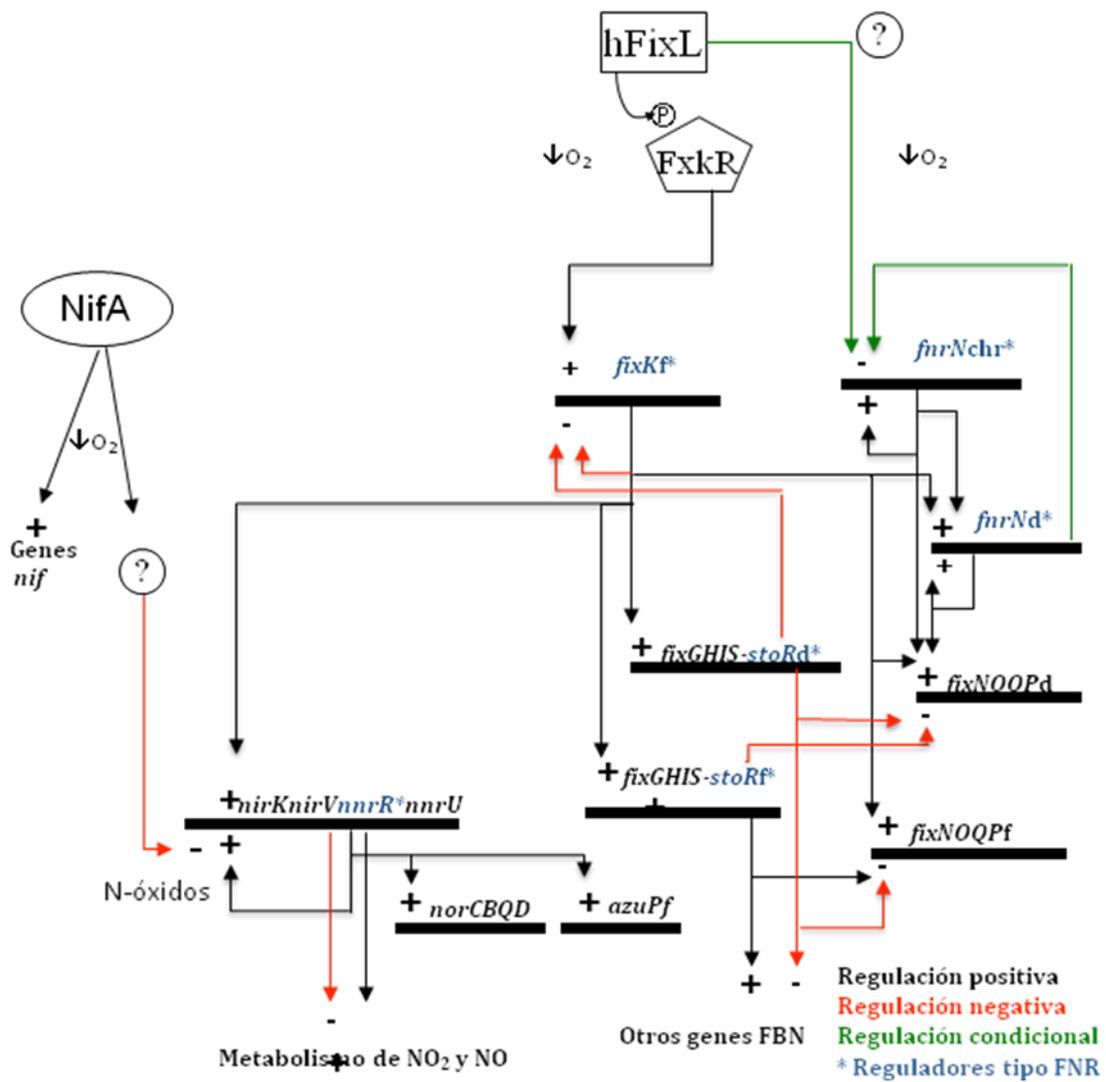
A pesar de que la similitud a nivel de secuencia es baja entre estas proteínas, los miembros de las diferentes subfamilias son capaces de unir secuencias muy similares y conservan el motivo de unión a DNA de FNR.

*R. etli* CFN42 posee seis genes que codifican para proteínas tipo FNR funcionales. Dos de ellos son del tipo FnrN, y están localizados, uno en el cromosoma (FnrNchr) y el otro en el plásmido simbiótico (FnrNd), conservando un 82% de similitud. El regulador maestro de los genes de fijación de nitrógeno FixKf, está codificado por el ORF RHE\_PF00508, en la región que hemos denominado “región *fix*”. Está localizado río arriba de *hfixL* y en dirección divergente a las reiteraciones de los operones *fixNOQP* y *fixGHIS* de este replicón. Formando parte de los operones *fixGHISd* y *fixGHISf*, se encuentran los genes *stoRd* y *stoRf* que codifican para dos reguladores de la subfamilia DNR. Finalmente, el ORF RHE\_PF00527 codifica para el regulador tipo FNR perteneciente a la subfamilia NnrR (González *et al.*, 2003 y 2006).

El análisis funcional inicial de estos reguladores mostró que en *R. etli* CFN42, la inducción del operón *fixNOQPd*, que codifica para la oxidasa terminal requerida para la fijación de nitrógeno, requiere de la participación de los reguladores FixKf, FnrNd y FnrNchr (Girard *et al.*, 2000; López *et al.*, 2001). Estudios posteriores mostraron que la oxidasa terminal simbiótica en *R. etli* está sujeta a regulación tanto positiva como negativa de un complejo circuito regulatorio que involucra 5 reguladores tipo FNR. La integración a este circuito regulatorio de las reiteraciones StoRd y StoRf en *R. etli*, descritos en esta bacteria por su papel de represión de la *cbb<sub>3</sub>* (*symbiotic terminal oxidase regulators*), fue determinada utilizando un esquema experimental de mutación-expresión. Estas proteínas de manera similar a FixKf carecen de las cisteínas que coordinan el centro hierro-azufre en FNR, sin embargo poseen cinco cisteínas y se desconoce si estas son capaces de formar puentes disulfuro inter o intra moleculares o puedan servir para coordinar centros metálicos. Su expresión microaeróbica es dependiente de FixKf. StoRd ejerce un efecto negativo sobre la expresión de *fixNd*. Una mutación nula en este gen promueve un incremento en la capacidad de fijación de nitrógeno y causa de un incremento en los niveles de *cbb<sub>3</sub>* y por consecuencia de la capacidad respiratoria del bacteroide (Granados-Baeza *et al.*, 2007).

En *B. japonicum* NnrR participa como regulador de las reductasas implicadas en el proceso de desnitrificación en presencia de óxidos de nitrógeno (Mesa *et al.*, 2003). La desnitrificación es un proceso de gran importancia en la rizosfera ya que es una forma alternativa de respiración cuando las concentraciones de oxígeno son limitantes. En este caso, las bacterias reducen secuencialmente nitrato o nitrito hasta óxidos de nitrógeno (NO- y N<sub>2</sub>O) y nitrógeno molecular (N<sub>2</sub>). Los intermediarios de este proceso, como el nitrito y el óxido nítrico (NO-), son compuestos con un gran poder citotóxico ya que pueden dañar macromoléculas como proteínas y DNA. En simbiosis, estos compuestos pueden ser generados por la planta o por el microsimbionte y pueden dañar a enzimas tan esenciales para la fijación de nitrógeno como la nitrogenasa o la leghemoglobina (Zumft *et al.*, 1997; Murphy, 1999). Sin embargo, la desnitrificación no es una vía común entre los organismos de la familia Rhizobiaceae y sólo se ha demostrado la capacidad de desnitrificar en unos pocos organismos como en *B. japonicum*, el simbiote de la soya, en este organismo se ha demostrado que es capaz de reducir el nitrato a amonio o a nitrógeno molecular simultáneamente (Mesa *et al.*, 2003; Bedmar *et al.*, 2005). Aún cuando existen Rhizobios que contienen los genes que codifican para cada una de las enzimas responsables de llevar a cabo dicho proceso, son incapaces de desnitrificar. Es el caso de *R. etli* CFN42. Esta bacteria es incapaz de utilizar el nitrato para respirar y carece de la actividad de nitrato reductasa, por lo que no desnitrifica. Sin embargo, posee genes que codifican proteínas relacionadas con las enzimas de desnitrificación, los operones *norCBQD* y *nirKVnnrRnnrU*, en este último se encuentra el gen que codifica para NnrR. no desnitrifica ni tiene la capacidad de respirar por nitrato (Bueno *et al.*, 2005; Gómez-Hernández *et al.*, 2011). La respuesta de *R. etli* a la presencia de óxido nítrico es regulada por NnrR vía la expresión microaeróbica de *fixKf*. La reducción de nitrito y óxido nítrico en esta bacteria requiere de las reductasas NorCB y Nir. El análisis funcional de estas reductasas demostró que en nódulos de frijol, NorC protege de manera importante al microsimbionte del óxido nítrico e indica que la nitrato reductasa bacteriana contribuye a la formación de éste óxido en nódulos en respuesta a la presencia de nitrato (Gómez-Hernández *et al.*, 2011).

La caracterización funcional de estos reguladores por nuestro grupo de investigación ha permitido proponer un modelo de regulación de los genes *fix* en *R. etli*CFN42 (Fig. 7).



**Figura 7.** Modelo de regulación de los genes *fix* en *R. etli*CFN42

## OBJETIVO

Analizar la respuesta de expresión genética global (transcriptómica) de *R. etli* CFN42 en vida libre mediada por los reguladores tipo FNR

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar si la ausencia de reguladores tipo FNR afecta la capacidad de crecimiento de *R. etli* en limitación de oxígeno.
2. Analizar el patrón de expresión microaeróbico global de *R. etli* dependiente de las proteínas tipo FNR, utilizando la técnica de microarreglos.
3. Inferir por la presencia de cajas de anaerobiosis la regulación directa de genes blanco por estas proteínas.

## JUSTIFICACIÓN

La asociación intracelular de las bacterias del género *Rhizobium* con las plantas leguminosas para llevar a cabo la FBN contribuye significativamente a la producción agrícola. La importancia agronómica de esta asociación simbiótica es la justificación de una extensa investigación desarrollada en los últimos 100 años. La FBN es un proceso que representa una excelente alternativa al uso de fertilizantes nitrogenados, cuyo costo económico y ambiental es muy elevado. Ofrece, además, un sistema de estudio a nivel molecular de gran relevancia, ya que cada uno de los simbioses puede ser estudiado a nivel genético y molecular de forma independiente.

En la actualidad, gracias al desarrollo de metodologías genómicas, el siguiente paso en el avance del conocimiento es la integración de la información de la estructura de los genomas con la funcionalidad de los mismos. Como se mencionó anteriormente, se han descrito importantes diferencias en la integración de los modelos de regulación de los genes de fijación de nitrógeno, siendo quizás *R. etli* el microorganismo que más características novedosas presenta, con un alto grado de complejidad. Por lo tanto, conocer las vías de regulación que operan en esta bacteria, tanto durante el proceso de fijación de nitrógeno como en la fase de vida libre, es de gran importancia para el entendimiento de los mecanismos por medio de los cuales la bacteria responde a su medio ambiente. Se sabe que una baja concentración de

oxígeno es la principal señal requerida para la activación de los genes simbióticos de fijación de nitrógeno. Adicionalmente, la planta ejerce un control metabólico sobre los bacteroides. Si bien, las cascadas de regulación descritas hasta el momento podrían estar involucradas en la transducción de “señales simbióticas” hasta hoy desconocidas, es de gran importancia conocer cuáles son las señales ambientales importantes que regulan la respuesta a nivel de expresión genética en la bacteria. Una vez que se conozcan los mecanismos moleculares de respuesta de la bacteria, se tendrá una visión integral del complejo fenómeno que es la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. Los reguladores de la familia CRP/FNR regulan la expresión de los genes bacterianos en respuesta a un amplio rango de estímulos tanto intracelulares como exógenos: controlan factores de virulencia, enzimas de degradación de compuestos aromáticos, fijación de nitrógeno, fotosíntesis y varios tipos de respiración (Körn et al., 2003). Por lo tanto, los resultados de este proyecto de investigación incidirán en el conocimiento general de la regulación de la respuesta de *Rhizobium* a la concentración de oxígeno, principal señal del medio ambiente en el proceso de fijación de nitrógeno, proceso de gran importancia agronómica.

## METODOLOGIA.

### **Crecimiento de cepas bacterianas y medios de cultivo.**

Las cepas de *Rhizobium* fueron crecidas a 30°C en medio rico PY (Noel *et al.*, 1984) o en medio mínimo Y (MMY) (Bravo y Mora, 1988) con ácido succínico 10 mM y cloruro de amonio 10 mM como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente. Cuando fué necesario, se adicionaron antibióticos en los medios de cultivo. Ácido nalidíxico (Nal) 20 µg ml<sup>-1</sup>, estreptomina (Sm) 200 µg ml<sup>-1</sup>, espectinomicina 100 µg ml<sup>-1</sup>, kanamicina (Km) 30 µg ml<sup>-1</sup>. Para la selección de dobles recombinantes se utilizó sacarosa al 12.5 % . Para la determinación cuantitativa de la actividad de β-glucuronidasa, se utilizó como sustrato 1.25 mM de PNPG (4-nitrofenil β-D-glucoronido (Girard *et al.*, 2000) (ver anexo 9. tabla de cepas)

### **Análisis del perfil de plásmidos de *Rhizobium* en geles tipo Eckhardt**

La técnica de Eckhardt fue originalmente desarrollada en 1978 y nos permite detectar la presencia de plásmidos de gran tamaño en la bacteria mediante electroforesis en gel, sin necesidad de aislar previamente el o los plásmidos.

### **Conjugación bacteriana.**

La transferencia de material genético que se establece entre bacterias y que requiere del contacto entre las células donadora y receptora se denomina conjugación. El material que se transfiere por este proceso puede ser de origen plasmídico, cromosómico o ser del tipo de transposones conjugativos. En este apartado se hará referencia preferentemente a la conjugación de plásmidos entre bacterias gram-negativas. Para que la conjugación se lleve a cabo se requieren genes que participan en el proceso, desde el acercamiento de las células hasta la transferencia del DNA, así como de una determinada secuencia nucleotídica a partir de la que se realiza la transferencia. Los genes que se requieren para la conjugación muchas veces se localizan en el mismo plásmido que será transferido, pero también pueden residir en el cromosoma de la célula donadora o en otro plásmido corresidente en la bacteria donadora. En los plásmidos movilizables por conjugación existe una secuencia nucleotídica que se conoce como el origen de transferencia (*oriT*). Esta región es reconocida por una enzima que

corta una de las dos cadenas complementarias de DNA. La cadena cortada es posteriormente acarreada hacia la célula receptora, donde se sintetiza la cadena complementaria y se sella la ruptura. El plásmido transferido sólo puede ser conservado por las células hijas de la célula bacteriana que originalmente recibió al plásmido si tiene una secuencia específica (*oriV*) que sea reconocida por los sistemas de replicación de plásmidos de la bacteria.

Cuando la conjugación se lleva a cabo con la participación de dos cepas, una donadora y otra receptora se conoce como biparental. La conjugación triparental se da en el caso en el que participa una cepa receptora, una cepa donadora que no porta los genes *tra* para la conjugación y una tercera cepa que porta un plásmido con los genes necesarios para que la conjugación se lleve a cabo. Es muy común utilizar como cepa donadora la cepa *Escherichia coli* S17-1, la cual tiene integrado en el cromosoma el plásmido conjugativo RP4; esta región proporciona los productos necesarios para la transferencia de otros plásmidos que utilizan el mismo sistema. La integración del RP4 en el cromosoma dificultaría su transferencia a otras bacterias.

### **Crecimiento de *R. etli* en medio mínimo y con diferentes concentraciones de O<sub>2</sub>**

Para crecer las cepas de *R. etli*, silvestre y mutantes, se siguió el protocolo estandarizado y reportado por nuestro laboratorio (Girard *et al.*, 2000). Brevemente, inocular 3 mL de PYCa+, con las cepas provenientes de caja recién sembradas. Incubar 12 horas a 30°C y 200 rpm. Tomar 1.0 mL de los precultivos e inocular 50 mL de PYCa+. Incubar 10 horas a 30°C y 200 rpm. Cosechar las células por centrifugación a 7,000 rpm por 10 min a 4°C. Lavar la pastilla celular con 20 mL de MMY. Centrifugar nuevamente. La pastilla celular se resuspende en 2.5 mL de MMY. Medir densidad óptica del cultivo (diluído 10 veces en MMY) a 540 nm. Inocular el volumen adecuado de MMY a 0.05 D.O. Los crecimientos en condiciones microaeróbicas se hicieron inoculando 30 y 50 mL de medio MMY en botellas selladas. Para crear una atmósfera de oxígeno al 1%, estos fueron gaseados con una mezcla oxígeno-argón 1 : 99 v/v. Los cultivos aeróbicos se hicieron inoculando 50 mL de MMY en matraces de 125 mL. Para los experimentos de cinética de crecimiento, se midió la D.O a 540 nm cada 2 h. Para el caso de la determinación de la actividad de la β- glucuronidasa, las células fueron cultivadas en las mismas condiciones por 10 horas.

### **Determinación de la actividad de $\beta$ -glucuronidasa.**

Las bacterias son cultivadas en las condiciones adecuadas para inducir la expresión del gen reportero (*uidA* o *gusA*) bajo el control del promotor a estudiar. En este caso fueron crecidas en MMY (como se describió anteriormente) a 30°C durante 10 horas, en condiciones de limitación de oxígeno (1%).

La actividad GUS se midió por un método colorimétrico, en presencia del sustrato PNPG, el cual desarrolla un color amarillo por la acción de la  $\beta$ -glucuronidasa. Se midió la absorbancia a 405 nm. Para calcular la actividad específica de la  $\beta$ -glucuronidasa, se toma una alícuota de los cultivos y se hace una determinación de proteínas totales por el método de Lowry. Por lo tanto, la velocidad en nanomolas de producto formado por minuto por miligramo de proteína se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$R = S / (0.02 \times V \times \text{mg proteína/ml}) = \text{nmol/min/mg proteína}$$

donde V = volumen ensayado (0.02 mL) y S = Unidades de absorbancia a 405 nm por minuto.

De acuerdo al coeficiente de extinción molar, en un volumen de 0.9 ml, 1 nmol de producto formado da una  $A_{405} = 0.02$

### **Hibridación tipo “Southern”.**

La presencia de una secuencia particular de DNA puede ser llevada a cabo por la técnica de hibridación tipo Southern. El DNA es digerido con enzimas de restricción y los fragmentos resultantes son separados de acuerdo a su tamaño por electroforesis en geles de agarosa. El DNA es entonces desnaturalizado *in situ* y transferido a un soporte sólido (comúnmente a membranas de nylon o nitrocelulosa). El DNA unido al filtro es hibridado con DNA de cadena sencilla marcado radiactivamente (sonda de hibridación). Para visualizar la sonda unida al fragmento de DNA, se expone el filtro a una película de rayos X.

## **Microarreglos**

### Cultivo de bacterias para la extracción de RNA.

Las cepas silvestre y FNR mutante de *R. etli* fueron crecidas por 10 h en medio mínimo y en condiciones de bajo oxígeno como se describió anteriormente. Se cosecharon las bacterias de 90 mL de cultivo en botellas de 500 mL en presencia de 1 mL de un inhibidor de RNAsas (RNAlater). La pastilla celular se congeló con nitrógeno líquido y se almacenó a -70°C hasta su uso (Salazar *et al.*, 2010).

### Extracción de RNA (KIT RNeasy QIAGEN 74104).

RNA total se purificó utilizando el Rneasy minikit (Qiagen). La pastilla celular se resuspendió en 100 µL de amortiguador tris-EDTA 10/1 (preparado con agua destilada tratada con dietil pirocarbonato 0.1% , dH<sub>2</sub>O-DEPC) en presencia de 5 µL de lisozima (20 mg/mL). La muestra se transfirió a con pipeta a un tubo Eppendorf y se incubó 5 min a 37°C. Se agregaron 1.5 µL de proteinasa K (19.4 mg/mL) y se incubó 3 min a 37°C. Se añadieron 350 µL de buffer RLT y 3.5 µL de β-mercaptoetanol, preparado en el momento.

La concentración RNA obtenido por este método se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm, y su integridad fue evaluada por electroforesis en geles desnaturalizantes.

### Marcaje del RNA.

El RNA se marcó utilizando el kit de marcaje CyScribe first-strand cDNA Cyscript (Amersham RPN620. 10 µg de RNA fueron transcritos con transcriptasa reversa y marcados diferencialmente con Cy3-dCTP y Cy5-dCTP. Se utilizaron nonameros al azar, a en un volúmen final de 11 µL. La mezcla de reacción se incubó 5 minutos a 70°C, 10 minutos a 25°C y 1 minuto a 4°C. Posteriormente, se centrifugó durante 30 segundos y se adicionó a cada tubo buffer CyScript, 0.1 M DTT, dCTPCy3 para un RNA y Cy5 para el otro, y transcriptasa reversa para tener un volumen final de 20 µL. La reacción se incubó durante 90 minutos a 42°C. La incorporación se cuantificó por un método espectrofotométrico electroforético y se purificó utilizando columnas CyScribe GFX (GE Healthcare). A cada tubo se le agregaron 500µL de buffer de captura, se mezcló y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro Spectra Max utilizando buffer como blanco. La muestra se pasó por la

columna y se centrifugó a 10,000 rpm durante 60 segundos. La solución excluída se pasó nuevamente por la columna y se midió la absorbancia en la solución de salida. Se agregaron 600  $\mu$ L de buffer de lavado, se centrifugo 30 segundos a 13000 rpm y se hicieron tres lavados más. Las muestras se eluyeron aplicando 70  $\mu$ L de buffer de elución a la columna, se incubó durante 3 min a T.A. y se centrifugó en un tubo Eppendorf nuevo durante 1 minuto. Las muestras se secaron durante 90 minutos en una centrífuga de tipo speed-back.

### **Microarreglo de *R. etli* CFN42.**

El microarreglo de *R. etli* CFN42 representa los 6034 marcos de lectura abiertos anotados en la secuencia de esta bacteria en oligonucleótidos de 70pb, sintetizados por MWG-Biotech e impresos por duplicado en una laminilla de 25 x 75 mm utilizando un robot de alta velocidad en el Insituto de Fisiología Celular de la UNAM (Salazar et al, 2010) (figura 8).

#### Pretratamiento de la laminilla.

La laminilla es el soporte donde están impresos por duplicado los 70mrs correspondientes a los 6034 marcos de lectura abiertos del genoma de *R. etli*. La laminilla se hidrató tres veces con vapor de agua a 60°C durante 10 segundos, y se fijó con dos ciclos de luz U.V. (1200 Joules). Enseguida, se sumergió durante 2 minutos en agua desionizada hirviendo y un minuto en una solución de etanol al 95%. La laminilla se secó por centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos y se prehibridó durante una hora a 45°C con una solución de SSC 5X, SDS al 0.1% y BSA al 1%. Posteriormente, la laminilla se sumergió un minuto en agua desionizada estéril a temperatura ambiente y se secó por centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos.

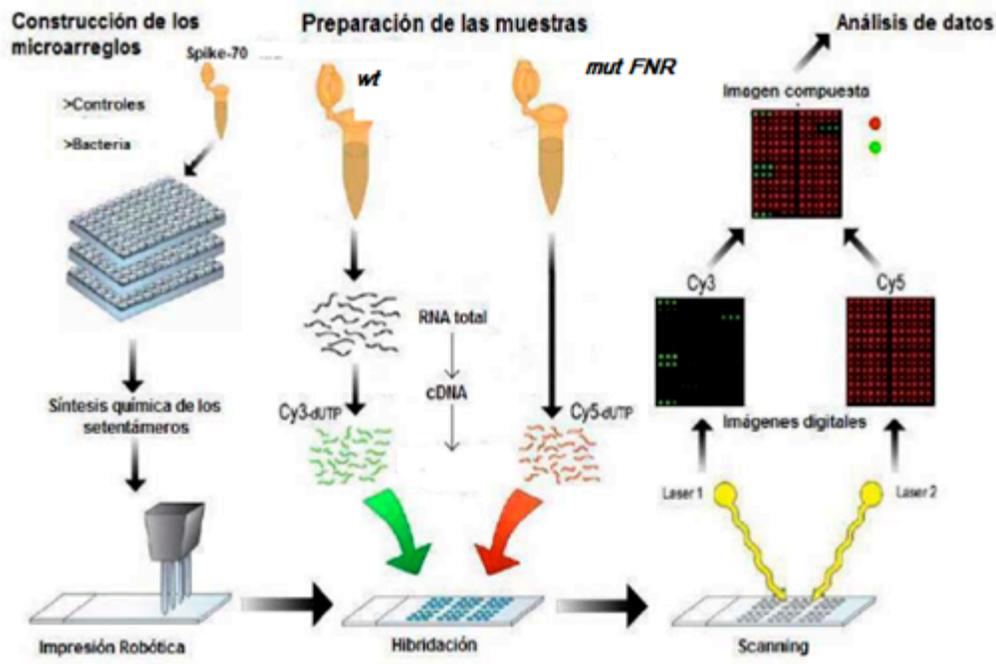
#### Hibridación

Las muestras marcadas se resuspendieron en una mezcla que contiene: 2.5  $\mu$ L de agua desionizada estéril y 10  $\mu$ L de solución de hibridación. Se mezclaron dando un volumen final de 25  $\mu$ L. Esta mezcla se aplicó al microarreglo y se cubriendo la superficie con un cubreobjetos. Se colocó en una cámara para hibridación, incubándose durante 16 horas a 45°C en la oscuridad. Después de la hibridación se hicieron lavados a temperatura ambiente de 2 minutos con una solución que contiene SSC 1X y SDS 0.05% y dos lavados de 2 minutos

con una solución de SSC 0.06X. La laminilla se secó por centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos.

La laminilla fue escaneada con un tamaño de pixel de 10  $\mu\text{m}$  en un Scan Array Lite microarray scanner (Perkin-Elmer, Boston, MA). El procesamiento de las imágenes y la determinación de las intensidades de señal así como su cuantificación se hizo con el software Array-Pro Analyzer 6.5.1 (Salazar et al., 2010).

Proceso de fabricación y procesamiento de la imagen de microarreglos.



**Figura 8.** Desarrollo del experimento de microarreglos.

## **Análisis de los datos de microarreglos**

En este trabajo se utilizaron dos tipos de métodos para el análisis de los microarreglos, con el objetivo de generar datos confiables y con valores de significancia. Los datos crudos obtenidos a partir del análisis de la imagen por Array-Pro Analyzer 6.5.1

### Método GenArise

Los datos obtenidos del análisis por Array-Pro Analyzer 6.5.1 se normalizaron con el software de genArise, que se desarrolló en la Unidad de Informática del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Este es un paquete que contiene funciones específicas para desarrollar un análisis de los datos obtenidos de un microarreglo con la finalidad de seleccionar los genes que están siendo expresados significativamente entre muestras. Antes de este análisis, genArise ejecuta cierto número de transformaciones sobre los datos para eliminar medidas de baja calidad y para ajustar las intensidades medidas para facilitar comparaciones

Funciones de transformación que contiene el paquete genArise:

#### 1. Corrección del background

La corrección del background, simplemente restando a cada valor de la intensidad (Cy3 o Cy5) el valor del background correspondiente a cada una, por cada spot en el microarreglo.

#### 2. La normalización de los datos

La normalización de los datos se puede aplicar con dos métodos: haciendo la normalización por “grids” o haciendo simplemente una normalización global sobre todos los datos del microarreglo. Para cada uno de estos métodos existe una función diferente y pueden regresar resultados distintos aún si se le pasa como argumento el mismo objeto de la clase “spot” (punto). Hay que mencionar que la normalización por “grids” solo puede ser utilizada si los datos correspondientes a todos los spots en el microarreglo están presentes en el objeto al cual se le aplica a la transformación. En ambos métodos de la normalización, los datos de los spots que tengan un valor de R igual a cero son eliminados.

#### 3. Eliminación de duplicados

Otro paso del análisis es la eliminación de los datos que tienen el identificador duplicado. genArise cuenta con la función spotUnique que calcula la media geométrica de los duplicados

para promediar los valores. De esta manera, los valores ajustados para cada gen pueden ser usados para llevar a cabo fases posteriores del análisis.

#### 4. Zscore

El enfoque que se utiliza requiere calcular la media y la desviación estándar de la distribución de los valores  $\text{Log}_2(\text{ratio})$  así mismo define un rango de confianza. (<http://www.ifc.unam.mx/genarise/>)

5. “Fold Change” FC es un número que describe el nivel de cambio de un gen (inducción, represión) respecto a la condición experimental en comparación a la condición silvestre. se calcula  $\text{Log}_2(\text{cambio/control})$ . En el caso de este trabajo el “fold change” se calculo de la siguiente manera.  $\text{Log}_2(\text{FNR}/\text{Wt})$

#### Método productos de rango

Una de las metodologías de análisis de microarreglos utilizada fue la propuesta por Breitling en 2004, llamada “Rank Products” (RP) o productos de rango. Esta técnica está diseñada para microarreglos de expresión, de uno o dos canales, aunque cuenta con una versión para microarreglos de alta densidad. Se basa en identificar aquellos genes expresados de manera diferencial con un modelo estadístico sencillo, pero con un trasfondo biológico importante. Para calcular los valores de rango es necesario tener réplicas de los experimentos (el método sugiere al menos 3). Este método también provee de un valor estadístico estricto, capaz de determinar el nivel de significancia para la intensidad obtenida de cada gen, permitiendo un control flexible en la tasa de detección de falsos positivos. Esta técnica ha demostrado un comportamiento más confiable y consistente que las variantes no paramétricas de la prueba-t (Breitling *et al.*, 2004), principalmente porque no asume una distribución normal en los datos. Además, los resultados obtenidos con este método son confiables aún en presencia de datos muy ruidosos. El modelo asume que serán pocos los genes que darán intensidades altas, que las réplicas representan experimentos independientes, que los cambios son independientes unos de otros y que la variación en las mediciones es la misma para todos los genes. Sin profundizar demasiado, la estadística detrás del modelo de RP es la siguiente: para un experimento con  $n$  genes y  $k$  réplicas, si se ordenan los genes detectados de mayor a menor intensidad, se puede asegurar que la probabilidad de que cierto gen aparezca en el primer

lugar/rango en cada una de las réplicas es  $1/nk$  si la lista fuera totalmente al azar. Dicho de otra manera, es poco probable observar un mismo gen en las primeras posiciones de las listas de todas las réplicas si se tratara de un experimento al azar. De manera general, para cada gen  $g$  en  $k$  réplicas, cada una examinando  $n_i$  uno puede calcular la probabilidad combinada correspondiente como un producto de rangos  $RP_{g,i} = \prod_{i=1}^k (rup_{i,g}/n_i)$ , donde  $rup_{i,g}$  es la posición del gen  $g$  en la lista de genes en la  $i$ -ésima réplica ordenada de manera decreciente por la intensidad del gene ( $rup=1$  para el gen con mayor intensidad,  $rup=2$  para el segundo gen de la lista, y así consecutivamente). Estos valores RP de cada gen pueden ordenarse de acuerdo a la probabilidad de observarlos en esas posiciones de las listas por mero azar. Sin embargo el método va más allá, ya que busca la probabilidad combinada de que los patrones de hibridación sean similares para todas las réplicas del experimento. Hace también estimaciones basadas en permutaciones, puesto que un mismo valor de RP puede resultar de la multiplicación de más de un par de posiciones; este paso origina un valor similar al e-valor de BLAST (Breitling *et al.*, 2004) Es a partir de este parámetro cuando se puede estimar la tasa de falsos positivos (false discovery rate -FDR) lo que permite asignar un valor de significancia a cada uno de los genes.

### **Coefficiente de correlación simple de Pearson Cy3 vs Cy5**

Se realizó un coeficiente de correlación simple de Pearson entre los resultados con Cy3 vs Cy5, con el objetivo de conocer cuánto del genoma de *R. etli* depende de la regulación directa o indirecta de FNR. Para la correlación se tomaron los valores normalizados de las intensidades de Cy3 y Cy5, para cada una de las réplicas biológicas independientes.

El coeficiente de correlación es una medida de asociación entre dos variables Este coeficiente de correlación varía entre 1 (genes perfectamente correlacionados) y -1 (correlación negativa perfecta: cuando uno sube, el otro baja), pasando por el 0 (no hay correlación lineal entre ellos). La distancia es  $1 - cor$  de forma que si la correlación es alta, la distancia será mínima y viceversa (Montgomery 2007)

### **Métodos bioinformáticos.**

Herramientas de análisis de secuencias regulatorias (RSA Tools, (<http://rsat.ulb.ac.be/rsat/>).

*Análisis de diadas* (“*dyad analysis*”). Se utilizó para generar una matriz de peso utilizando la región reguladora de los blancos de regulación de factores transcripcionales tipo FNR conocidos (referidos en este trabajo como controles, tabla 4).

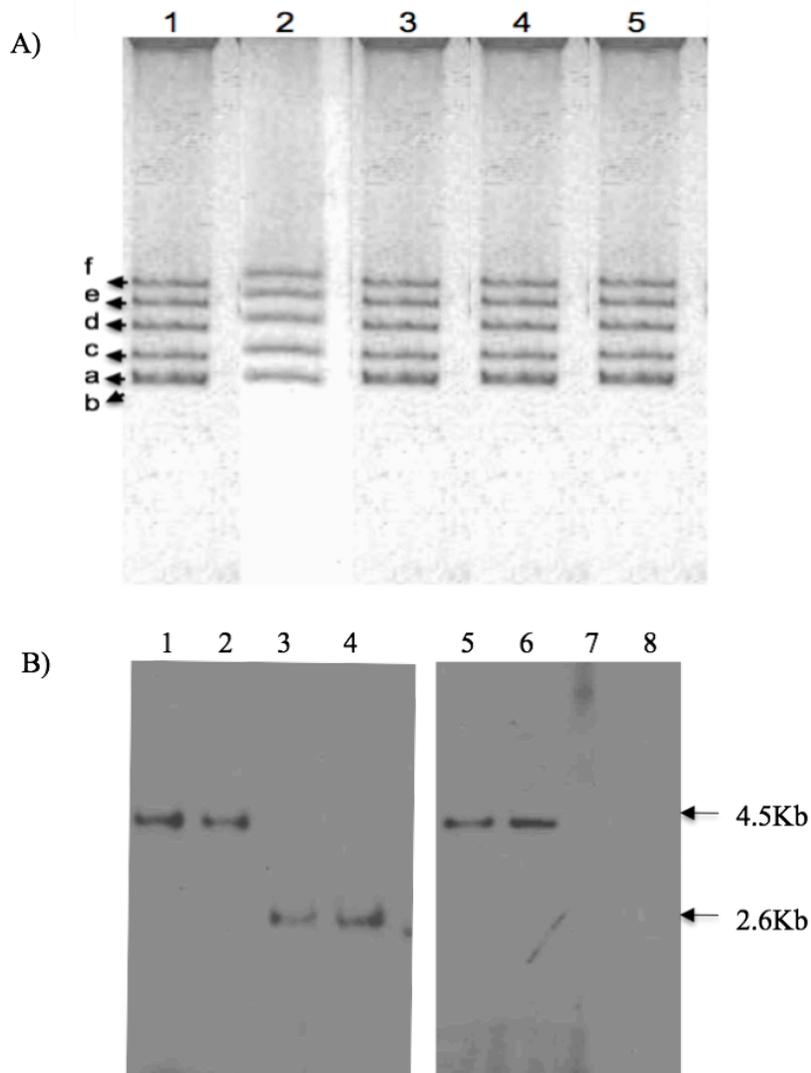
*Matrix-scan*. Utilizamos una región de 400 pb río arriba del inicio de la traducción de los genes diferencialmente expresados.. Se utilizó la matriz de peso que representa el sitio de reconocimiento de las proteínas tipo FNR y se fijó como límite un score mayor o igual a 4. La representación gráfica de este sitio de reconocimiento se obtuvo utilizando MEME ([http://meme.nbcr.net/meme4\\_7\\_0/](http://meme.nbcr.net/meme4_7_0/))

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Construcción de una triple mutante *fixLfnrNdfnrNchr* de *R. etli* (mutante FNR).

Una de las características del genoma de algunas especies de *Rhizobium*, es la ocurrencia frecuente de rearrreglos. Algunos de estos rearrreglos son fácilmente identificados ya que afectan la capacidad simbiótica de la cepa (Romero *et al.*, 1991). En otros las consecuencias fenotípicas no son detectadas tan fácilmente. Por lo tanto, para iniciar con los experimentos necesarios para cumplir con los objetivos del proyecto, hicimos un análisis del perfil de plásmidos de la cepa de *R. etli* IBTOL18 (López *et al.*, 2001), que se va a utilizar. Como se muestra en la figura 9, la cepa IBTOL18 (carril 2) perdió el pRet42a. Dado que nuestro objetivo principal es el de analizar el patrón global de expresión dependiente de los reguladores tipo FNR de *R. etli*, iniciamos el trabajo experimental generando nuevamente una mutante *fixL::loxP-fnrNd::ΩKm-fnrNchr::ΩSp*. Para ello utilizamos la cepa IBTOL17 (*fixL::loxP-fnrNd::Ω Km*) como receptora del alelo *fnrNchr::ΩSp*, el cual está presente en la cepa de *E. coli* que lleva el plásmido pOL18 (pJQ200SK+:: *fnrNchr::ΩSp*) (López *et al.*, 2001) . Las derivadas, candidatas a dobles recombinantes (*fixL::loxP-fnrNd::ΩKm-fnrNchr::ΩSp*) fueron analizadas en geles tipo Eckhardt (Fig. 9A) y por experimentos de hibridación tipo Southern (Fig. 9B) para comprobar la ausencia de rearrreglos genómicos y el intercambio del alelo silvestre por el mutado, respectivamente. Como se muestra en figura 9A, tanto la cepa IBTOL17 (carril 3) como la nueva mutante FNR, construida en este trabajo (carril 4), presentan un perfil de plásmidos silvestre (ver controles, carriles 1 y 5). El DNA total de las derivadas resistentes a espectinomicina digeridos con *Bam*HI fue sometido a electroforesis en geles de agarosa e hibridados con el  $\Omega$ Sp y con *fnrNChr* como detectores. En la figura 9B, se muestra una región de hibridación de 4.5 Kb en las derivadas dobles recombinantes *fixL::loxP-fnrNd::ΩKm-fnrNchr::ΩSp* correspondiente al fragmento *Bam*HI mutado, indicando la sustitución del alelo silvestre de *fnrNchr* por el alelo mutado (*fnrNChr::ΩSp*). La región de hibridación que este detector revela en el DNA de las cepas silvestre (carril 3) y en la cepa IBTOL17 (carril 4) contiene la región codificante de *fnrNChr* y corresponde a un fragmento *Bam*HI de 2.6 Kb. El tamaño del fragmento revelado por el  $\Omega$ Sp

es también de 4.5Kb en las mutantes (carriles 5 y 6); mientras que en las cepas control no hay señal de hibridación (7 y 8).



**Figura 9.** Análisis de mutantes. (A) Perfil de plásmidos en geles tipo Eckhardt: (1) Cepa CFN42; (2) IBTOL18; (3) IBTOL17; (4) Nueva mutante FNR- (*fixL::loxP fnrNchr::ΩSp fnrNd::ΩKm*); (5) CFNX636. Las letras minúsculas señalan los plásmidos nativos de la cepa CFN42. (B) Patrón de hibridación con *fnrNChr* de DNA de (1 y 2) *R. etli* FNR-, (3) CFN42 WT y (4) IBTOL17; y con  $\Omega$ Sp de DNA de (5 y 6) *R. etli* FNR-, (7) CFN42 WT y (8) IBTOL17. Del lado derecho se indican los pesos moleculares de cada una de los fragmentos *Bam*HI revelados.

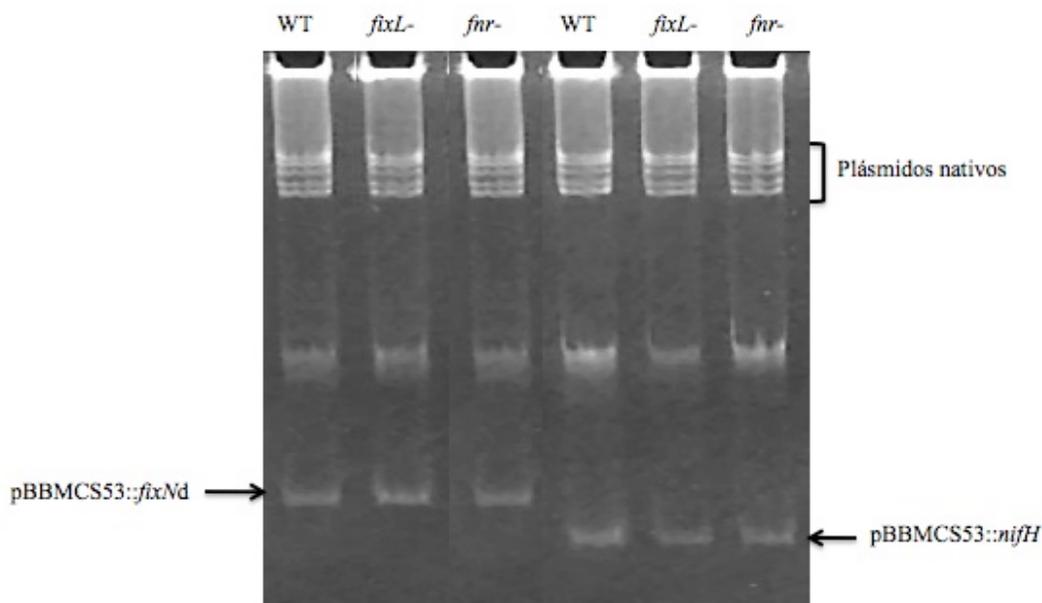
## **Análisis de la expresión microaeróbica de *fixNd* y *nifH* por medio de fusiones transcripcionales con *gusA*.**

Como se mencionó anteriormente, resultados de nuestro laboratorio mostraron que la regulación de la oxidasa simbiótica de *R. etli* CFN42 está bajo el control transcripcional de varios reguladores tipo FNR. La ausencia de los reguladores FNR provoca una drástica disminución en la expresión microaeróbica de este gen (Girard *et al.*, 2000; López *et al.*, 2001; Granados-Baeza *et al.*, 2007). Por lo tanto, con el objetivo de analizar que en la mutante FNR generada para este estudio la expresión de *fixNd* es afectado de manera similar a la reportada por López y colaboradores 2001, analizamos su expresión en esta nueva mutante. Como un control adicional, analizamos la expresión del gen *nifH*, cuya expresión no es controlada por estos reguladores.

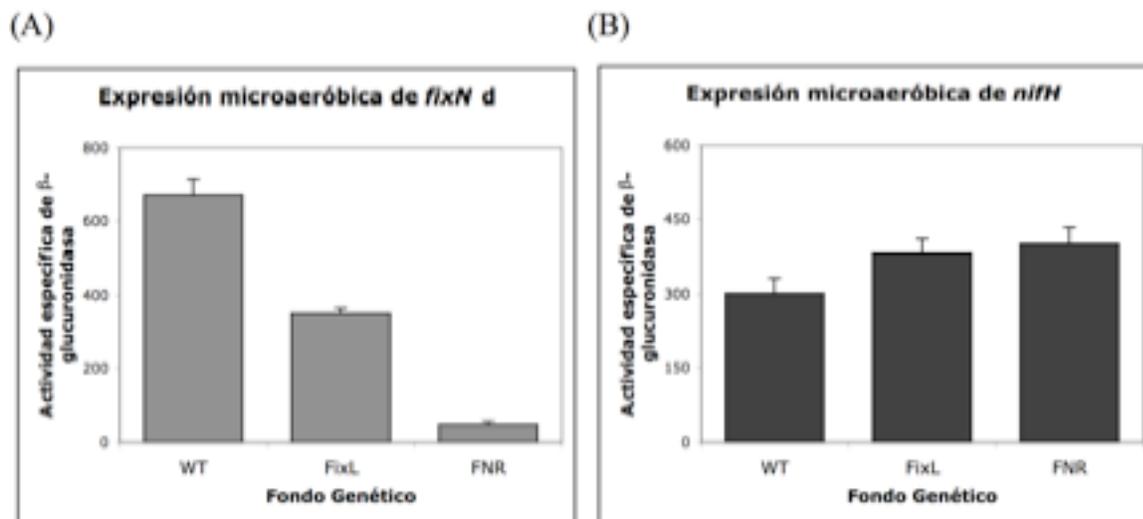
Para esto, utilizamos las fusiones transcripcionales construídas en nuestro laboratorio en las que el gen reportero *uidA*, el cual codifica para la  $\beta$ -glucuronidasa, está bajo el control de los promotores de *fixNd* y *nifH* de *R. etli*, en los plásmidos pBBMCS53::*fixNd* y pBBMCS53::*nifH* respectivamente. Estos plásmidos fueron introducidos por conjugación en la cepa silvestre de *R. etli* (CFN42) y en las mutantes *fixL::loxP*QSp (CFNX636) y la triple mutante *fixL::loxP-fnrNd:: $\Omega$ Km-fnrNchr:: $\Omega$ Sp*.(Fig. 10) La presencia del plásmido con la fusión transcripcional respectiva y la ausencia de rearrreglos a nivel de pérdida de plásmidos nativos de la cepa fue analizada por geles tipo Eckhardts.

Como se muestra en la figura 11, la expresión microaeróbica de *fixNd* depende de la presencia de los reguladores FNR. El nivel de expresión es prácticamente nulo en esta mutante cuando se compara con el nivel observado en la cepa silvestre. La expresión de *fixNd* observada en la mutante FixL depende de la presencia de los genes *fnrNch* y *fnrNd*. Como se esperaba, el resultado mostró que la expresión de *nifH* no está afectada en la mutante y que esta expresión no depende de los reguladores tipo FNR.

Con ello concluimos que la cepa equivalente a la IBTOL18, construída nuevamente presenta las mismas característica fenotípicas a la descrita por López *et al.*, 2001.



**Figura 10.** Análisis de transconjugantes. Perfil de plásmidos de las derivadas de *R. etli* CFN42 silvestre y mutantes utilizadas para el análisis de expresión de *fixNd* y *nifH*.

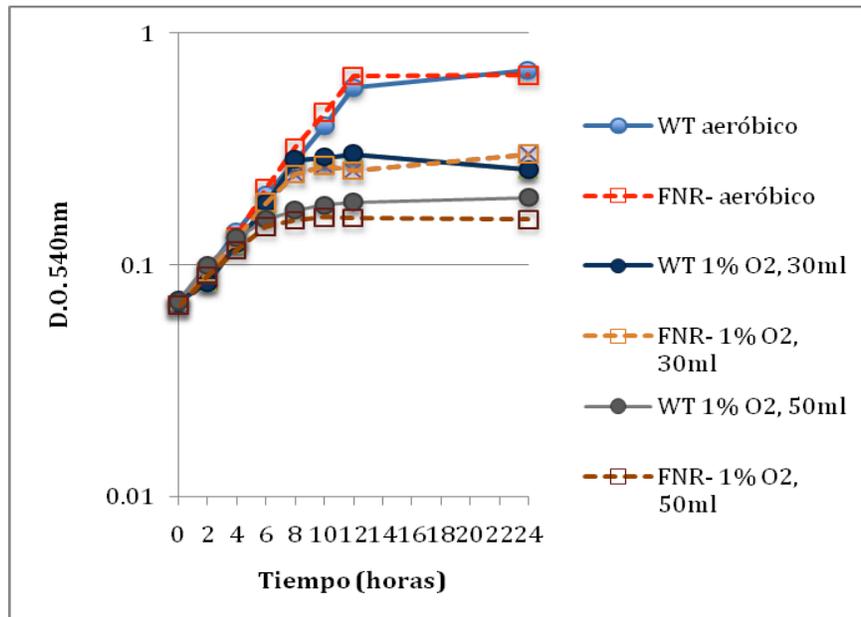


**Figura 11.** Análisis de expresión microaeróbica de *fixNd* y *nifH* en diferentes fondos genéticos. La actividad específica de  $\beta$ -glucuronidasa está expresada en nmoles por minuto por microgramo de proteína.

### Análisis del crecimiento de *R. etli* en diferentes condiciones.

Como un parámetro adicional de caracterización de la mutante FNR de *R. etli* CFN42, se analizó la capacidad de crecimiento de esta cepa comparada con la cepa silvestre en diferentes concentraciones de oxígeno.

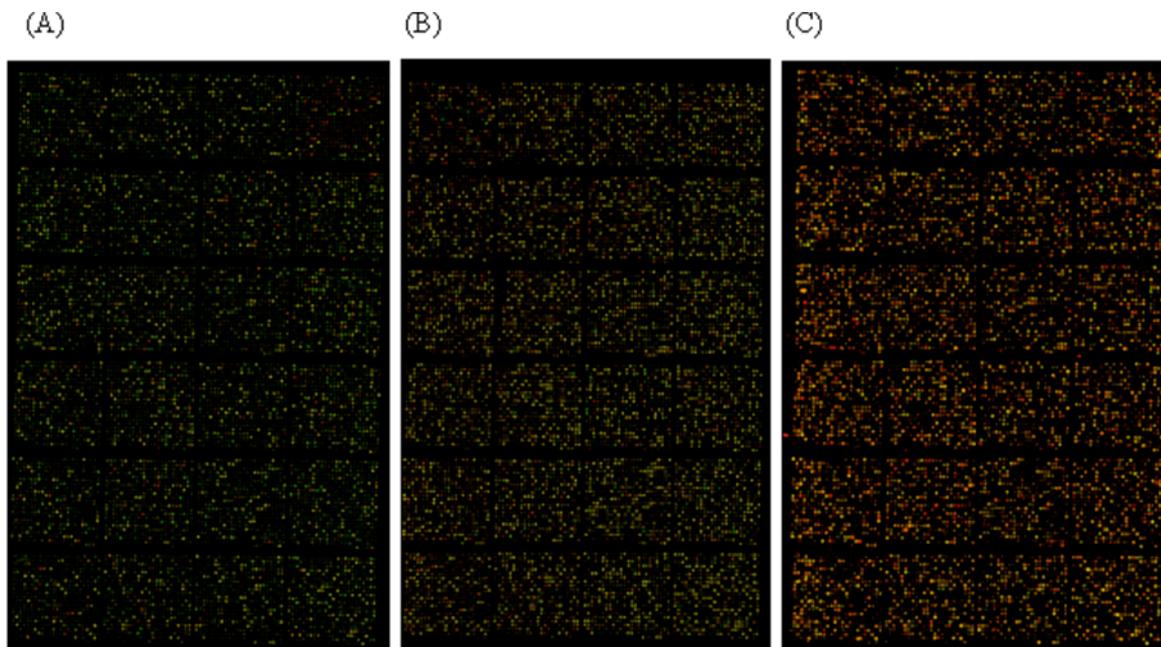
Cultivos de MMY, inoculados a 0.05 D.O. de cada una de las cepas, fueron incubados durante 24 horas a 30°C y 200 r.p.m. Para lograr condiciones de baja concentración de oxígeno, se inocularon 30 y 50 mL de medio en botellas de 120 mL, herméticamente cerradas con tapones de hule. En ambos casos, se inyectó una mezcla de 1% oxígeno, 90% argón. Como condición control, ambas cepas fueron incubadas en condiciones aeróbicas, en cultivos de 50 mL en matraces de 125 mL. Durante las primeras 12 horas, se tomaron alícuotas de 1 mL para leer su absorbencia a 540nm. La gráfica de la figura 12 muestra que, en las condiciones probadas, la ausencia de reguladores tipo FNR no afecta a la velocidad de crecimiento de *R. etli* CFN42.



**Figura 12.** Curvas de crecimiento de *Rhizobium*. Cepa silvestre CFN42 y la cepa mutante FNR (FixLFnrNdFnrNchr) en diferentes concentraciones de O<sub>2</sub>.

### **Análisis comparativo del transcriptoma de *R. etli* CFN42 silvestre vs mutante FNR en microaerobiosis**

Con el objetivo de obtener datos estadísticamente representativos de la expresión microaeróbica de *R. etli* que dependan de los reguladores FNR, se realizaron tres experimentos de hibridación independientes, en los cuales el RNA utilizado provino de tres incubaciones diferentes, es decir, se usaron tres réplicas biológicas. La figura 13 muestra las imágenes obtenidas en estos experimentos. De acuerdo con las diferentes metodologías reportadas para minimizar las variaciones debidas a precipitación de las cianinas, el fluoróforo utilizado para marcar cada una de las muestras debe ser intercambiado en una de las réplicas. De tal manera, los paneles A y B son imágenes obtenidas con las muestras marcadas en la misma forma, mientras que el panel C corresponde a la muestra con el intercambio de fluoróforo. Las lecturas se hicieron, como ya se comentó, con el equipo Scan Array Lite microarray scanner (Perkin-Elmer, Boston, MA), con un tamaño de pixel de 10  $\mu\text{m}$ . La ganancia del laser fue de 65% y 60% para Cy3 y Cy5, respectivamente, para cada una de las replicas biológicas.



**Figura13.** Imágenes de microarreglos. Imágenes obtenidas en el Scan Array Lite microarray scanner.

## **Implementación de los métodos estadísticos para determinar la reproducibilidad de los experimentos.**

El análisis que aquí se presenta tiene como finalidad la comparación de dos métodos estadísticos GenArise y Rank Products (productos de rango). Las dos son metodologías afines para el análisis de datos de microarreglos de expresión de dos canales, con el objetivo de encontrar aquellos genes que son expresados diferencialmente con un valor de significancia estadística y una tasa de falsos positivos muy cercana al cero. Ambos métodos parten de los valores normalizados, con el software GenArise (véase capítulo de metodología).

### GenArise

Es una herramienta fácil de usar para el análisis de los datos de un microarreglo. Lo primero que supone es que los datos cuentan con una distribución normal, por lo que se requiere calcular la media y la desviación estándar de la distribución de los valores  $\log_2$  (*ratio*) de la intensidad de cada “spot” (punto) de hibridación. Así es como el programa define un intervalo de confianza y utiliza la función Zscore, el cual es un valor de desviación estándar calculada a partir de una ventana de 50 datos alrededor de cada spot de hibridación (Salazar *et al.*, 2010). Resaltando de esta manera aquellos “spots” con una intensidad mayor, asumiendo que son estos los genes diferencialmente expresados. Los datos mostrados en el presente trabajo son aquellos que obtuvieron un Z-score  $\geq 1.5$  y  $\leq -1.5$ ; obteniéndose 192 genes reprimidos en la cepa FNR<sup>-</sup> (corresponden a una regulación positiva por FNR en el fenotipo silvestre) y 114 inducidos en la cepa FNR<sup>-</sup> (corresponden a una regulación negativa por FNR en el fenotipo silvestre) (Anexos 1 y 2). En la tabla 1 se muestran los 10 genes con los valores más altos de inducción  $\uparrow$  y represión  $\downarrow$  en la cepa mutante con respecto a la cepa silvestre cuyos valores de Zscore son los más altos

**Tabla1. Cuantificación de expresión por el método de GeneArise. Genes con mayor**

**Zscore** ↑ inducción ↓ represión

D	Symbol	Zscore
RHE_CH01778	yhch00511	↓ -5.162658
RHE_PE00163	yhe00059	↓ -4.36102
RHE_CH01244	ypch00425	↓ -4.139872
RHE_PF00525	nirK	↓ -4.109345
RHE_CH00479	yhch00115	↓ -4.008699
RHE_CH00168	ypch00060	↓ -4.008414
RHE_CH00355	fpg	↓ -3.96029
RHE_CH03795	tIpA	↓ -3.816903
RHE_PF00515	norC	↓ -3.799071
RHE_CH02912	yhch00865	↓ -3.704837
RHE_PF00550	yhf00163	↑ 2.8597003
RHE_CH01670	rpsL	↑ 2.9098619
RHE_PF00546	ypf00267	↑ 2.9203993
RHE_PE00401	yhe00134	↑ 3.008812
RHE_PE00007	actP	↑ 3.0268438
RHE_PF00540	ypf00264	↑ 3.0344103
RHE_CH00546	yhch00132	↑ 3.0683384
RHE_PA00178	trbB	↑ 3.1254843
RHE_PF00537	yhf00158	↑ 3.1919096
RHE_CH00192	deoD	↑ 3.6405291
RHE_CH02231	yhch00658	↑ 4.0053668

Productos de Rango.

Esta técnica mostró tener un comportamiento más confiable y consistente que las variantes no paramétricas de la prueba-t, principalmente porque no supone una distribución normal en los datos. Además, los resultados obtenidos con este método son confiables aún en presencia de datos muy ruidosos. Los datos mostrados en el trabajo son todos aquellos que a partir de su valor normalizado se sometieron a análisis de RP, siendo la tasa de falsos positivos (FDR) menor o igual a 0.001. De esta forma se identificaron 123 genes reprimidos en la cepa mutante FNR (corresponden a una regulación positiva por FNR en el fenotipo silvestre) y 43 inducidos en la cepa mutante FNR<sup>-</sup> (corresponden a una regulación negativa por FNR en el fenotipo silvestre). (Anexos 3 y 4)

En la tabla 2 se muestran los 20 genes más destacados en base a la tasa de falsos positivos (FRD) <0.1 En azul los genes inducidos y en rojo los reprimidos en la cepa FNR

**Tabla2. Cuantificación de expresión por el método de Productos de Rango de los genes con un valor FRD de  $\leq 0.01$**

ID	fold	RP	ev	FRD
RHE_CH00328	0.30542669	4.8354E-13	0	0
RHE_CH00355	0.24099841	2.7774E-13	0	0
RHE_CH00479	0.29727121	7.0261E-13	0	0
RHE_CH01244	0.3178528	1.5208E-12	0	0
RHE_CH01762	0.46412076	5.7473E-11	0	0
RHE_CH01778	0.19345339	9.9644E-14	0	0
RHE_CH02012	0.37688973	1.2513E-11	0	0
RHE_CH02221	0.4296573	2.2412E-11	0	0
RHE_CH02503	0.38435705	3.0217E-12	0	0
RHE_CH02521	0.42910389	4.1232E-11	0	0
RHE_CH02817	0.44988836	2.7479E-11	0	0
RHE_CH00546	-3.2397697	5.5889E-11	0	0
RHE_CH00721	-2.99965221	2.4271E-11	0	0
RHE_CH01837	-3.10433999	4.7995E-11	0	0
RHE_PE00401	-3.31027696	6.8407E-12	0	0
RHE_PF00546	-6.25724735	1.8049E-13	0	0
RHE_CH03890	-8.27682885	1.6074E-10	0.1	0.01666667
RHE_PC00042	-3.79958446	1.2191E-09	0.2	0.02222222
RHE_CH00996	-3.50173611	8.7473E-10	0.2	0.025
RHE_PF00540	-3.03853472	8.7104E-10	0.2	0.02857143
RHE_CH00439	-2.41925879	2.2083E-09	0.3	0.03
RHE_CH02231	-2.42875698	3.0771E-09	0.4	0.03333333

Una forma de visualizar la interacción de ambos métodos consiste en la agrupación de los resultados obtenidos en los dos métodos mediante la elaboración de diagramas de Venn que permite la integración de los dos métodos estadísticos (Fig. 14).



**Figura 14.** Diagrama de Venn obtenido a partir del análisis de los resultados de microarreglos realizados en este trabajo. En el cual se muestra el número de genes obtenidos con cada uno de los análisis realizados, tanto para la regulación positiva como negativa y en la región de intersección se muestra el número de genes que de acuerdo con cada uno de los métodos de análisis de los datos se comportan igual.

**Participación de los reguladores tipo FNR en la expresión microaeróbica de *R. etli* CFN42.**

Con el objetivo de evaluar el porcentaje del genoma que es dependiente de la regulación por FNR se determinó el coeficiente correlación de Pearson. La tabla 3 muestra el coeficiente de correlación simple de Pearson entre la hibridación con Cy3 y Cy5, para cada replica independiente. La correlación de los datos es de 0.96, lo que representa que el 96% del

genoma de *R. etli* no cambia. Dicho de otra forma, aproximadamente 4% del genoma de *R. etli* se encuentra regulado por proteínas del tipo FNR.

**Tabla 3. Coeficiente de correlación simple de Pearson entre las muestras.**

	<i>cy5_1</i>	<i>cy5_2</i>	<i>cy5_3</i>
<i>cy3_1</i>	0.96639404		
<i>cy3_2</i>		0.96774966	
<i>cy3_3</i>			0.946866

### **Interpretación biológica de los datos derivados de nuestros ensayos de microarreglos.**

El objetivo principal de este trabajo fue el de conocer los genes cuya expresión depende de los reguladores tipo FNR. Para ello, y dada la poca experiencia en nuestro grupo para el análisis de datos de expresión derivados de microarreglos, en este trabajo se utilizaron diferentes métodos para el mismo, para conocer los niveles de expresión diferencial con un nivel de significancia estadística que diera certeza sobre la reproducibilidad de los datos. Estos resultados deben a su vez integrarse en un contexto del conocimiento biológico previo, de forma que se puedan proponer nuevos blancos de regulación de los factores transcripcionales de tipo FNR en *R. etli*.

En nuestro laboratorio, se han determinado previamente por métodos de mutación-expresión de la actividad específica de  $\beta$ -glucuronidasa diferentes blancos de regulación de estos genes. La tabla 4 muestra los controles internos del experimento que están conformados por genes de los cuales se tiene evidencia que son regulados por al menos una de las proteínas tipo FNR en las condiciones de estudio (González *et al.*, 2003 y 2006; López *et al.*, 2001; Granados-Baeza *et al.*, 2007; Gómez-Hernández *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos en este trabajo, son coincidentes con los datos de genes blanco reportados previamente, en los que la dependencia de expresión se observó en los ensayos de microarreglos, lo que da mayor soporte a los resultados obtenidos (Tabla 4). Por lo tanto, la expresión de estos genes fue usada como control interno del experimento.

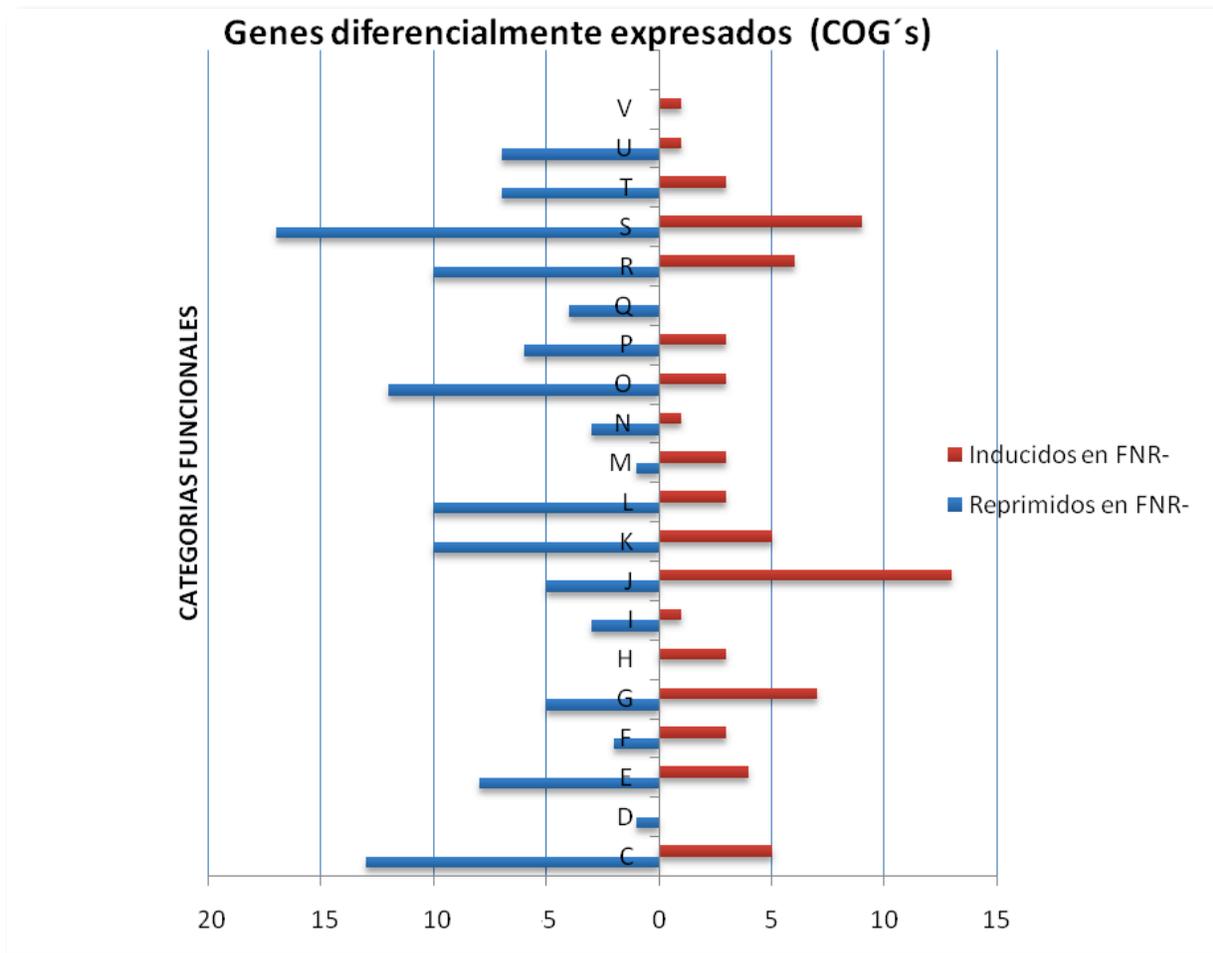
**Tabla 4. Genes regulados por FNR en los plásmidos simbiótico (pRet42d) y pRet42f de *R. etli*.**

Symbol	Funcion	Referencia	Fold Change	Zscore
fixKd	nitrogen_fixation_transcriptional_regulation_truncated_protein_Fnr/Crp_family	Girard <i>et al.</i> , 2000	-0.84012454	-1.55593453
azuPd	pseudoazurin_blue-copper_protein	Granados-Baeza <i>et al.</i> , 2007	-1.07743995	-2.05908574
fixNd	cytochrome-c_terminal_oxidase_(cbb3)_subunit_I_protein	Girard <i>et al.</i> , 2000	-0.59496256	-1.78432647
fixOd	cytochrome-c_terminal_oxidase(cbb3)_subunit_II_protein	Girard <i>et al.</i> , 2000	-1.36714281	-2.81435085
fixQd	cytochrome-c_terminal_oxidase_(cbb3)_subunit_protein	Girard <i>et al.</i> , 2000	-0.79566755	-1.91576408
fixSd	nitrogen_fixation_protein_FixS	Granados-Baeza <i>et al.</i> , 2007	-0.08265425	-1.88892228
fixId	cation_transport_ATPase_protein	Granados-Baeza <i>et al.</i> , 2007	-1.02358491	-4.04013108
Symbol	Funcion	Referencia	Fold Change	Zscore
azuPf	pseudoazurin_blue-copper_protein	Granados-Baeza <i>et al.</i> , 2007	-0.83650127	-2.37975269
fixGf	ferrodoxin_oxidase_protein	Granados-Baeza <i>et al.</i> , 2007	-0.83316411	-1.73902964
fixHf	cation_pump_membrane_protein	Granados-Baeza <i>et al.</i> , 2007	-1.56896471	-3.27650877
fixIf	cation_transport_ATPase_protein	Granados-Baeza <i>et al.</i> , 2007	-1.54611157	-3.46571751
fixKf	nitrogen_fixation_transcriptional_regulation_truncated_protein_Fnr/Crp_family	Girard <i>et al.</i> , 2000	-0.39951691	-1.52833289
fixL	two-component_sensor_histidine_kinase_protein	Girard <i>et al.</i> , 2000	-1.66662052	-2.65027109
fixNf	cytochrome-c_terminal_oxidase_(cbb3)_subunit_I_protein	Girard <i>et al.</i> , 2000	-0.62803122	-1.88579377
nirK	copper-containing_nitrite_reductase_precursor_protein	Gómez-Hernández <i>et al.</i> , 2011	-3.08655174	-4.109345
nnrR	denitrification_regulator_protein	Gómez-Hernández <i>et al.</i> , 2011	-0.6197033	-1.77545188
norC	nitric_oxide_reductase_protein	Gómez-Hernández <i>et al.</i> , 2011	-1.42206477	-3.7990709

El análisis global de expresión realizado por metodologías globales como la efectuada en el presente trabajo, permite enriquecer la información del contexto biológico de la expresión de cada uno de los genes. Por lo tanto, los genes diferencialmente expresados se agruparon por categorías funcionales (COGs) de acuerdo a la clasificación de grupos ortólogos del National Center for Biotchnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.gov/COG/>) (Anexos 1 y 2).

**Tabla 5. Clasificación de genes regulados por FNR en *R. etli* de acuerdo a Grupos de Ortologos (COG's)**

		<b># DE GENES</b>	
<b>CATEGORIA FUNCIONAL</b>	<b>CODE</b>	<b>Reprimidos en FNR<sup>-</sup></b>	<b>Inducidos en FNR<sup>-</sup></b>
Producción y conversión de energía	<b>C</b>	<b>13</b>	<b>5</b>
Control del ciclo celular, división celular, partición del cromosoma	<b>D</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
Transporte y metabolismo de aminoácidos	<b>E</b>	<b>8</b>	<b>4</b>
Transporte y metabolismo de nucleótidos.	<b>F</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
Transporte y metabolismo de carbohidratos	<b>G</b>	<b>5</b>	<b>7</b>
Transporte y metabolismo de coenzimas	<b>H</b>	<b>0</b>	<b>3</b>
Transporte y metabolismo de lípidos	<b>I</b>	<b>3</b>	<b>1</b>
Traducción, estructura y biogénesis de ribosomas	<b>J</b>	<b>5</b>	<b>13</b>
Transcripción	<b>K</b>	<b>10</b>	<b>5</b>
Replicación, recombinación y reparación	<b>L</b>	<b>10</b>	<b>3</b>
Formación de la pared y membrana celular	<b>M</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
Motilidad celular	<b>N</b>	<b>3</b>	<b>1</b>
Modificaciones postraduccionales, chaperonas y plegamiento de proteínas	<b>O</b>	<b>12</b>	<b>3</b>
Transporte y metabolismo de iones inorgánicos	<b>P</b>	<b>6</b>	<b>3</b>
Transporte, catabolismo y metabolismo de metabolitos secundarios	<b>Q</b>	<b>4</b>	<b>0</b>
Función General por predicción.	<b>R</b>	<b>10</b>	<b>6</b>
Función desconocida	<b>S</b>	<b>17</b>	<b>9</b>
Mecanismos de transducción de señales	<b>T</b>	<b>7</b>	<b>3</b>
Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular	<b>U</b>	<b>7</b>	<b>1</b>
Mecanismos de defensa	<b>V</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
S/C	<b>S/C</b>	<b>69</b>	<b>41</b>
<b>TOTAL</b>		<b>193</b>	<b>115</b>

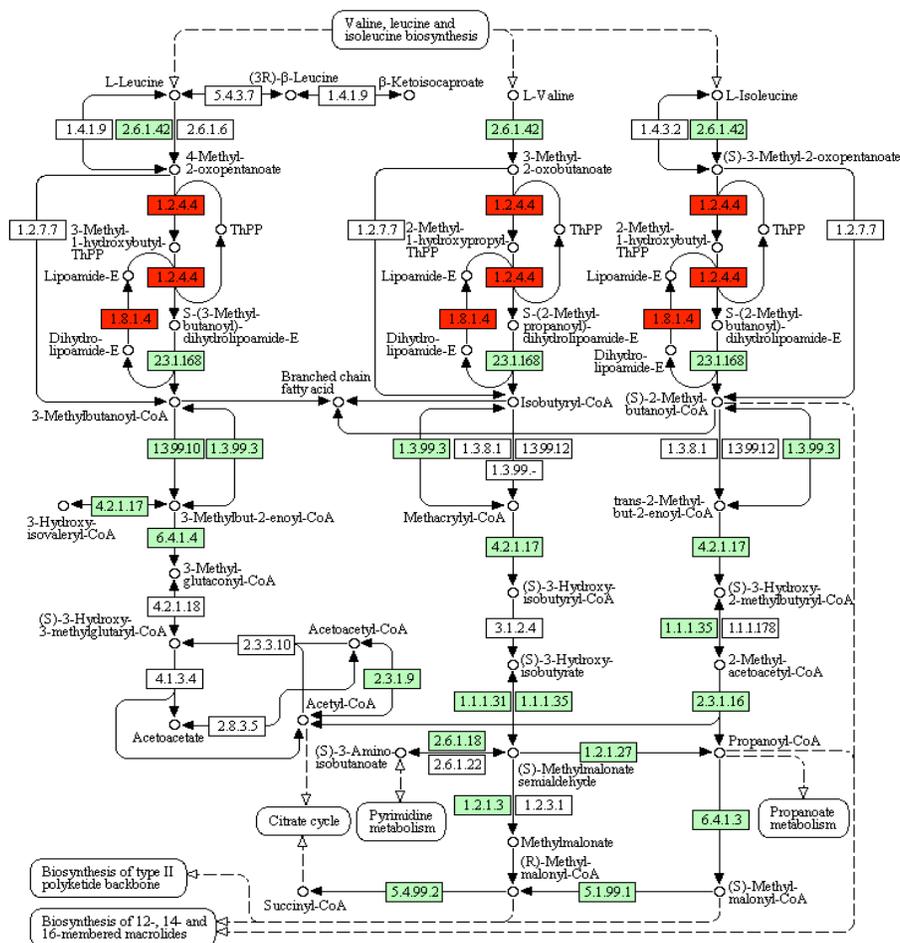


**Figura 15.** Clasificación de genes expresados diferencialmente de acuerdo a Grupos de Ortologos (COG's) de *R. etli*. En rojo, genes mostraron inducción y en azul genes que muestran represión en la condición de FNR.

Se sabe que FNR es un regulador global en *E. coli*, del cual dependen más de 120 genes. FNR es uno de los reguladores responsables de la transición de un estado aeróbico a uno anaeróbico, regulando el ciclo de los ácidos tricarbónicos a través de la succinato deshidrogenasa y la isocitrato deshidrogenasa y controlando la generación de energía a nivel de la fosforilación oxidativa (Bauer et al., 1999). En *R. etli*, la función que desempeñan estas proteínas en vida libre y en simbiosis no ha sido estudiada a fondo. Los resultados del presente trabajo muestran la implicación que tienen estos reguladores en diferentes procesos metabólicos, realizados con una tensión baja de oxígeno.



Otros genes identificados por su expresión diferencial en este trabajo son los genes *bkdA1* y *lpdAc*, estos codifican para las enzimas deshidrogenasa (E.C. 1.8.1.4) y dihidrolipoamina deshidrogenasa (E.C.1.2.4.4), respectivamente. Estas enzimas están involucradas en el metabolismo de tres de los aminoácidos ramificados: leucina, isoleucina y valina (Fig. 17). En *Sinorhizobium meliloti*, otra bacteria fijadora de nitrógeno, se ha reportado que mutantes en los genes implicados en la biosíntesis de estos aminoácidos son incapaces de inducir la formación de nódulos en las plantas hospederas mostrando la interconexión entre la biosíntesis de la cadena ramificada de los aminoácidos y el proceso de nodulación. (Peltzer *et al.*, 2008).



**Figura 17.** Esquema de la ruta de biosíntesis de leucina, isoleucina y valina. En verde se representan los genes de la vía presentes en *R. etli* y en rojo los genes reprimidos en nuestros ensayos (genes *bkdA1*, E.C. 1.8.1.4 y *lpdAc* E.C.1.2.4.4).

Nuestros resultados sugieren que algunos de los genes implicados en el metabolismo y el transporte en *R. etli* son controlados por los reguladores tipo FNR en microaerobiósis. Entre ellos, *gcvH* que forma parte del complejo multienzimático de proteínas que catalizan la oxidación de la glicina para producir dióxido de carbono; o *metA* que participa en la ruta de biosíntesis de metionina y cisteína. También destacan genes anotados como transportadores de carbohidratos, *frcA* y *thuK* que codifican para transportadores de fructosa y trehalosa. Algunos genes hipotéticos como *ypd00030*, *ypf00252* y *yhch01004*, cuya función sugerida es la de un transportador de azúcares, una proteína precursora de gluconolactona y una proteína de membrana, respectivamente; podrían participar en procesos fisiológicos como la interacción entre los microorganismos y raíces de las plantas en la rizosfera. Un estudio en *R. leguminosarum* propone que además de los factores Nod, el intercambio de carbono y nitrógeno entre el citosol de la planta y los rizobios son un factor determinante en la morfogénesis del nódulo, sugiriendo la posible existencia de complejos sistemas de transporte de carbohidratos durante el proceso de interacción. (Ramachandran *et al.*, 2011)

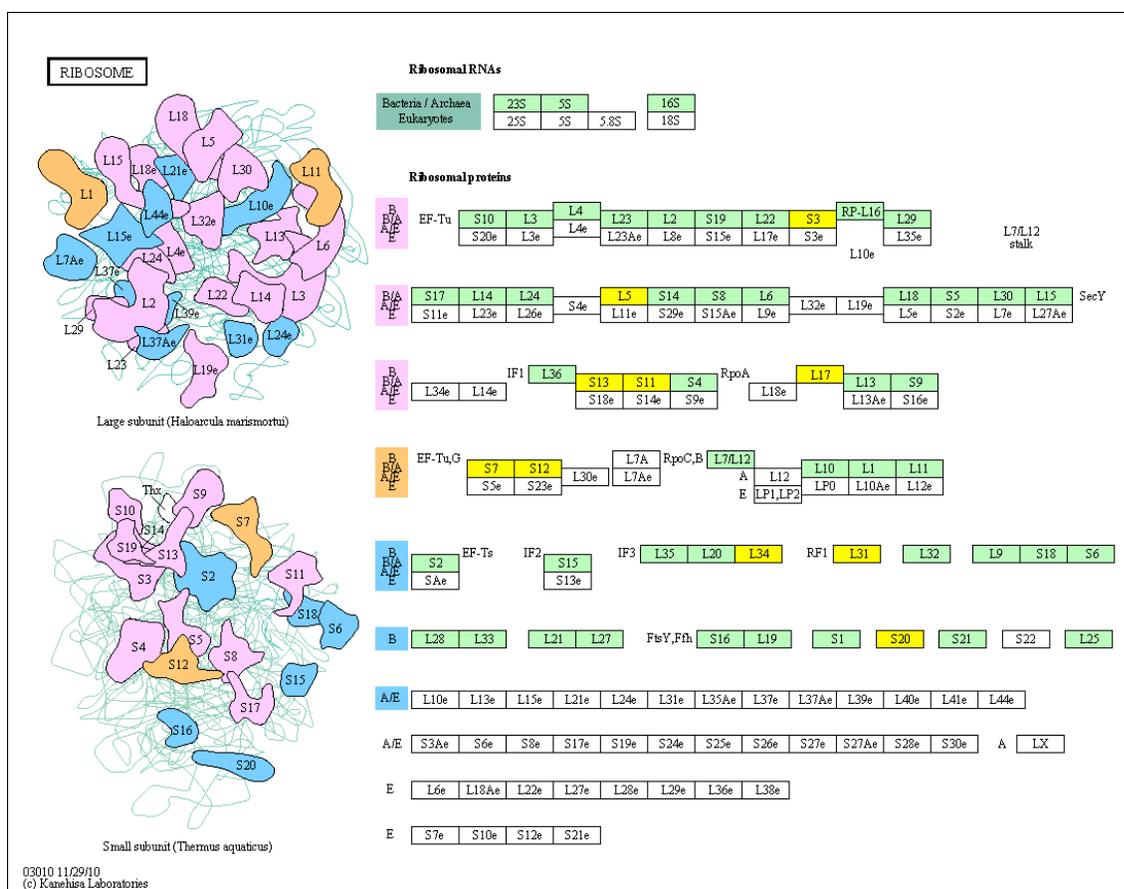
Se sabe que los reguladores tipo FNR, pueden también ejercer un efecto de represión génica. Los datos reportados en la tabla 5 y en la figura 15, indican que las categorías funcionales con mayor número de genes inducidos, correspondientes a una regulación negativa en una condición silvestre, estos son: traducción, estructura y biogénesis de ribosomas, transcripción, metabolismo de nucleótidos, transporte y metabolismo de coenzimas.

Genes como *cyoB*, *fbcB* y *fbcC*, que son genes que codifican para citocromos tipo *b* y tipo *C* de baja afinidad por oxígeno son componentes esenciales en la cadena respiratoria en estas bacterias, pueden representar alternativas para garantizar la utilización óptima del oxígeno a diferentes tensiones. Sugiriendo entonces que la represión de estos citocromos garantiza el transporte de los electrones desde las quinonas hacia las oxidasas terminales de alta afinidad que son inducidas en los bacteroides o en el metabolismo microaeróbico (Thony-Meyer *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1996; Garcia-Horsman *et al.*, 1991).

Otros genes identificados en este trabajo codifican para proteínas que se ligan a solutos iones y funcionan conjuntamente con transportadores tipo ABC o con receptores quimiotácticos para la detección y adquisición de azúcares (*glnK*, *mdeAf*, *ypb00078*, *ypc00025*, *aptch*, *deoD*, *hpt*, *gap*, *tkl*, *ypch01044*, *ypch01222*, *ypch01400*, *ype00192*, *yhf00163*, *metK*, *nada*, *ypch01413*,

*ypf00264*). También encontramos genes que codifican para enzimas catabólicas que degradan complejos moleculares en compuestos más simples fáciles de transportar hacia la membrana interna, o enzimas detoxificantes que cumplen funciones protectoras para la célula (Anexos 1 y 2).

Entre los genes que se encuentran inducidos en FNR<sup>-</sup>, encontramos genes que participan en la biogénesis de ribosomas, entre ellos *fusA2*, *rplE*, *rplQ*, *rpmE*, *rpmH*, *rpsC*, *rpsG*, *rpsK*, *rpsL*, *rpsM*, *rpsT*, *tufA*, *tufB* (Fig. 18). Es factible pensar que *Rhizobium*, diferenciado a bacteroide dentro de los nódulos fijadores de nitrógeno, no requiera la síntesis *de novo* de proteínas.



**Figura 18.** Estructura y biogénesis de ribosomas. En amarillo se destacan los genes cuya expresión en condiciones microaeróbicas es reprimida por FNR (*fusA2*, *rplE*, *rplQ*, *rpmE*, *rpmH*, *rpsC*, *rpsG*, *rpsK*, *rpsL*, *rpsM*, *rpsT*, *tufA*, *tufB*).

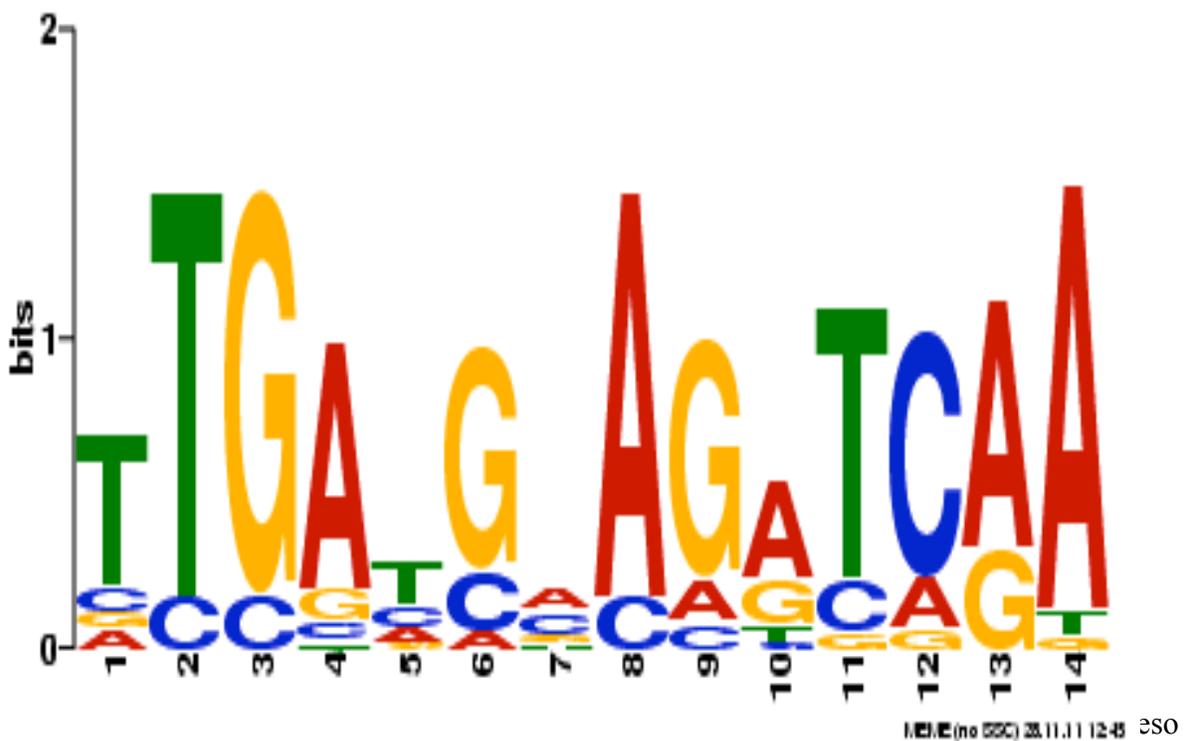
### **Predicción de cajas de anaerobiosis en los genes regulados por FNR en *R. etli*.**

Como se mencionó anteriormente, se ha reportado que diferentes proteínas tipo FNR pueden unirse a la misma secuencia consenso reportada para *E. coli* (TTG-N<sub>8</sub>-CAA), conocida como caja de anaerobiosis, ya que estas proteínas poseen el motivo conservado EXXSR en la hélice de reconocimiento al DNA. Interesantemente, se ha visto que factores transcripcionales homólogos son capaces de regular diferencialmente a un gen blanco. Ejemplo de ello lo tenemos en la regulación de *fixKf* de *R. etli* por los factores transcripcionales StoRd y StoRf. Estos reguladores, a pesar de su similitud estructural, tienen un papel diferencial en la regulación de la expresión de *fixKf*. Una mutación en *stoRd*, pero no en *stoRf*, incrementa la expresión de este gene y de la capacidad fijadora de *R. etli* en plantas de frijol (Granados-Baeza et al., 2007). El análisis funcional de las cajas de anaerobiosis importantes para regular la expresión de *nirK* en *R. etli*, reveló que la activación de este gene depende de la presencia de FixKf y de la caja de anaerobiosis situada en la posición -42.5 con respecto al inicio de la transcripción. Sitio que también es requerido para la máxima expresión de este gene de manera dependiente de NnrR y de la presencia de óxidos de nitrógeno (Gómez-Hernández et al., 2011).

La predicción de las probables cajas de anaerobiosis en la región reguladora de los genes cuya expresión es regulada por los reguladores tipo FNR, hecha mediante el uso de las herramientas del servidor RSA Tools (<http://rsat.ulb.ac.be/rsat/>) reveló que en 46 de los genes reprimidos y en 15 de los genes inducidos en la cepa FNR<sup>-</sup>, hay una secuencia similar a una caja de anaerobiosis (Anexo 7 y 8). Con estos resultados podemos concluir que los reguladores tipo FNR de *R. etli* regulan de manera indirecta al resto de los genes identificados en este trabajo. La representación gráfica obtenida de este sitio de reconocimiento, se muestra en la figura 18. ([http://meme.nbcr.net/meme4\\_7\\_0/](http://meme.nbcr.net/meme4_7_0/)).

Se ha reportado que en *E. coli* FNR hace contacto directo con la primera timina de la caja de anaerobiosis (Cherfils J. et al., 1989), el Logo obtenido en este trabajo se asemeja a la caja de anaerobiosis consenso. Sin embargo, la primera timina aparece con menor frecuencia, lo que sugiere una diferente especificidad de unión de los diferentes reguladores tipo FNR presentes en esta bacteria. En apoyo a esta hipótesis, podemos mencionar los resultados obtenidos en un análisis realizado en nuestro laboratorio, en el cual el Logo de especificidad de unión de los

modelos StoR presenta algunas diferencias con el Logo de FixKf, principalmente en la primera mitad de la caja. La primera timina del consenso no es detectada, además los modelos de estas proteínas sugieren que se unen con una mayor especificidad a la segunda mitad de la caja. En un modelo de FNR de *E. coli* se propuso que la valina que antecede al glutamato del motivo de unión a DNA, facilita la interacción de la serina con la primer timina (Cherfils J. y *et al.*, 1989). En los modelos para las proteínas StoR la interacción entre la serina y la primer timina no es detectada. (Zamorano-Sánchez, datos no publicados).



generada por medio del uso de las herramientas RSA Tools.

Utilizando esta metodología identificamos genes del regulón FNR en *R. etli*, en los que la presencia de una caja de anaerobiosis nos permite sugerir que son blanco directo de regulación de proteínas tipo FNR. Estos genes y sus niveles de expresión se muestran en la tabla 6.

**Tabla 6. Nuevos blancos de regulación de FNR identificados en este trabajo, en cuya región reguladora identificamos una caja de anaerobiosis.**

ID	GENE	FUNCION	FC	Z-score	star	end	Anaerobox	score	COG	CODE
RHE_PA00044	virB3a	transport_secretion_system_IV_VirB3_protein	-0.7395863	-2.60098109	-172	-151	CCGTTGACTTGATCAAGGAG	13	COG3702	[U]
RHE_PC00106	adhA2	alcohol_dehydrogenase_protein	-1.0071776	-2.98732319	-96	-75	CTCTTTCGATAGCTCAATGAG	12.9	COG1064	[R]
RHE_PD00022	yhd00013	hypothetical_conserved_protein	-1.1633602	-3.29502307	-76	-55	GTGCTTGATGAAGATCAACGAC	10.8	COG2823	[R]
RHE_CH01778	yhch0051	hypothetical_protein	-2.3842288	-5.16265758	-32	-11	ATCCATGATGAAAATCAAAGGA	8.1		
RHE_PD00016	ypd00003	putative_universal_stress_UspA_protein	-1.5487423	-3.42802589	-159	-138	GGGGTTGATCTCCGTCAAGATTG	8	COG0589	[T]
RHE_PD00103	mcpAd	methyl-accepting_chemotaxis_protein	-0.6209418	-2.12272601	-74	-53	ATGTCGTTTCAGGCTCAAACAT	7.9	COG0840	[NT]
RHE_CH01779	ypch0060	putative_hydrolase_protein_haloacid_dehalogenase-like_family	-0.4743716	-2.00882143	-302	-281	TCCTTTGATTTTCATCATGGAT	7.2	COG0637	[R]
RHE_CH00389	tme	NADP-depende_malic_enzyme_protein	-0.4082801	-1.78947103	-47	-26	GCAATTTGAGGAAGAGCGAAGCG	7.1		
RHE_CH01939	yhch0056	hypothetical_conserved_membrane_protein	-0.7941588	-1.8492365	-287	-266	GAAGGTGATCTTCGACAAGGAAG	7.1	COG2261	[S]
RHE_PA00046	virB5a	transport_secretion_system_IV_VirB5_protein	-1.44885	-3.27828215	-172	-151	GAATTTGATCTGCGCGAAATGC	7.1		
RHE_PF00493	yhf00145	hypothetical_conserved_protein	-0.7481277	-2.29210916	-311	-290	ATGCTTGATCGTCTTCAACCAA	6.8		
RHE_PF00493	yhf00145	hypothetical_conserved_protein	-0.7481277	-2.29210916	-67	-46	CTGATTTTCGGACAGCAAAGAA	6.5		
RHE_CH00546	yhch0013	hypothetical_conserved_protein	2.95238095	2.95238095	-28	-7	CTCGCTGAGCCACAAAGGAG	8.5	COG2128	[S]
RHE_CH02231	yhch0065	hypothetical_conserved_membrane_protein	2.73733195	2.73733195	-181	-160	GAAGATGCTGCGCAACAAGGAT	8.3	COG2259	[S]
RHE_CH01700	rplQ	50S_ribosomal_protein_L17	2.0651801	2.0651801	-243	-222	GTCGCTGAACGAAATCAAGGAA	8	COG0203	[S]
RHE_PB00083	yypb00047	putative_serine/threonine-specific_phosphatase_protein	1.37876387	1.37876387	-107	-86	GTGAATGGTCGCCATCAAAGAC	6.6	COG0420	[S]
RHE_CH01670	rpsL	30S_ribosomal_protein_S12	1.70476191	1.70476191	-212	-191	GAAGTTCACCTCAAACAAGGTT	6.5	COG0048	[P]
RHE_CH00231	yhch0005	hypothetical_protein	1.78863636	1.78863636	-133	-112	GATCTTCCCGAGATCAATAT	5.9		[P]
RHE_CH00231	yhch0005	hypothetical_protein	1.78863636	1.78863636	-200	-179	ATAATTAAGCAAATCAATGGT	5.6		[S]
RHE_CH00878	mntH	manganese_transport_protein	2.91721582	2.91721582	-100	-79	GCGTTTGC AAAACATCAGGGAT	5.4	COG1914	[J]

## CONCLUSIONES

Para conocer el regulón global de las proteínas FNR de *R. etli*, utilizamos la metodología de microarreglos. Esta técnica hace uso de varias herramientas bioinformáticas y estadísticas que dan robustez a la misma. Hasta donde se sabe, la combinación de estas herramientas no se ha utilizado en reportes anteriores. Es precisamente el acoplamiento de diversas herramientas lo que le da ventaja a la validación del análisis de las hibridaciones. En este trabajo utilizamos dos algoritmos (GeneArise y Productos de Rango) para, a partir de las replicas muestran un nivel superior de hibridación. Este análisis también permitió determinar la reproducibilidad de los resultados al momento de hibridar material genético, aun cuando la metodología de microarreglos presenta un alto nivel de ruido inherente. Es preciso resaltar que ésta es una técnica que requiere de un diseño experimental muy bien cimentado, de un desarrollo muy controlado y de un análisis estadístico sólido que permita conocer una mayor diversidad de los grupos de genes mayormente expresados, de forma que estos sean estadísticamente representativos y se cuente con una buena interpretación y un contexto biológico que le dé una coherencia a este tipo de metodologías.

Nuestros resultados muestran que, en conjunto, los 6 reguladores tipo FNR presentes en la *R. etli* CFN42, participan como reguladores globales mediando la expresión de genes en respuesta a un amplio rango de estímulos, tanto intracelulares como exógenos. Además de controlar genes del metabolismo microaeróbico de la bacteria, de suma importancia para el la sobrevivencia de la bacteria en el microambiente del nódulo, controlan genes implicados en importantes rutas metabólicas. Estos resultados reflejan la complejidad de la red de regulación mediada por FNR.

A lo largo de la sección de resultados y discusión, fueron presentadas nuestras conclusiones. Aquí queremos puntualizar algunas de ellas:

- La cepa equivalente a la IBTOL18, construída nuevamente presenta las mismas característica fenotípicas a la descrita por López *et al.*, 2001.
- El análisis de los datos por GeneArise muestra a 192 genes reprimidos y 114 inducidos en la cepa FNR<sup>-</sup>.
- El análisis de los datos por Productos de Rango muestra a 123 genes reprimidos y 43 inducidos en la cepa de FNR<sup>-</sup>.

- La comparación de ambos métodos de análisis confirma que la metodología de productos de rango es más estricta. Sin embargo, el número de genes que de acuerdo con cada uno de los métodos de análisis de los datos se comportan igual es muy alto.
- El 4% del genoma de *R. etli* se encuentra regulado por proteínas del tipo FNR.
- El regulón FNR en *R. etli* está formado por más de 100 genes.
- La predicción de cajas de anaerobiosis en la región reguladora de estos genes, sugiere que el 36% son blancos directos.
- El Logo obtenido del probable sitio de unión de estas proteínas sugiere una diferente especificidad de unión a sus blancos de los diferentes reguladores tipo FNR presentes en esta bacteria.

Como consecuencia del análisis realizado en este trabajo, consideramos que una mejor alternativa para el análisis de perfiles transcripcionales es la metodología conocida como RNA-Seq. Este es un método desarrollado recientemente que utiliza tecnologías de secuenciación masiva. Los estudios que han utilizado este método ya han alterado el punto de vista general acerca de la magnitud y complejidad de los transcriptomas. RNA-Seq también proporciona una medición mucho más precisa que otros métodos para el análisis global del transcriptoma (Wang *et al.*, 2009).

## REFERENCIAS.

1. Bauer E., Kaspar, Fischer, Hennecke H. (1998) **Expression of the *fixR-nifA* operon in *Bradyrhizobium japonicum* depends on a new response regulator, RegR.** J. Bacteriol. 180: 3853–63
2. Bauer C., Elsen, Bird T. (1999) **Mechanisms for Redox control of gene Expression.** **Annu.Rev.Microbiol.** 53:495-523
3. Bedmar E. J., Robles, Delgado, M. J. (2005) **The complete denitrification pathway of the symbiotic, nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*.** Biochem. Soc. Trans. 33:141-144
4. Breitling R., Armengaud, Amtmann, Herzyk P. (2004) **Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments.** FEBS. Lett. 573:83-92
5. Brom S., Martinez, Dávila, Palacios R. (1988) **Narrow- and Broad-Host-Range Symbiotic Plasmids of *Rhizobium* spp. Strains That Nodulate *Phaseolus vulgaris*.** Appl Environ Microbiol. 54(5):1280-3
6. Bueno E., Gómez-Hernández, Girard, Bedmar, Delgado, M. J. (2005) **Function of the *Rhizobium etli* CFN42 *nirK* gene in nitrite metabolism.** Biochem. Soc. Trans. 35:166-167
7. Busby S., Ebright RH. (1999) **Transcription activation by catabolite activator protein (CAP).** J. Mol. Biol. 293(2):199-213
8. Crack J.C., Jervis, Gaskell, White, Green, Thomson, Le Brun NE. (2008) **Signal perception by FNR: the role of the iron-sulfur cluster.** Biochem Soc Trans. 36:1144-8
9. Dixon R, Kahn D. (2004) **Genetic regulation of biological nitrogen fixation.** Nat. Rev. Microbiol. 2(8):621-31
10. Einsle O., Tezcan, Andrade, Schmid, Yoshida, Howard, Rees D.C. (2002) **Nitrogenase MoFe-protein at 1.16 Å resolution: a central ligand in the FeMo-cofactor.** Science 297(5587):1696-700
11. Eady R.R. (1996) **Structure–function relationships of alternative nitrogenases.** Chem. Rev. 96:3013–30

12. Elsen S., Dischert, Colbeau, Bauer C.E. (2000) **Expression of uptake hydrogenase and molybdenum nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus* is coregulated by the RegB–RegA two-component regulatory system.** J. Bacteriol. 182: 2831–37
13. Emmerich R., Hennecke, Fischer H.M. (2000) **Evidence for a functional similarity between the two-component regulatory systems RegSR, ActSR, and RegBA (PrrBA) in  $\alpha$ -Proteobacteria.** Arch. Microbiol. 174:307–313
14. Fischer H.M., Bruderer, Hennecke H. (1988) **Essential and non-essential domains in the *Bradyrhizobium japonicum* NifA protein: identification of indispensable cysteine residues potentially involved in redox reactivity and/or metal binding.** Nucleic. Acids. Res. 16:2207–2224
15. Fischer H.M. (1994) **Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia.** Microbiol. Rev. 58:352–86
16. Gage D.J. (2004) **Infection and invasión of root sbysymbiotic,nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes.** Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68:280–300.
17. Grabbe R., Schmitz R.A. (2003) **Oxygen control of nif gene expression in *Klebsiella pneumoniae* depends on NifL reduction at the cytoplasmic membrane by electrons derived from the reduced quinone pool.** Eur. J. Biochem. 270:1555–66
18. Green J., Bennett, Jordan, Ralph, Thomson, Guest J.R. (1996) **Reconstitution of the [4Fe-4S] cluster in FNR and demonstration of the aerobic-anaerobic transcription switch in vitro.** Biochem. J. 316:887-92
19. Gibson K.E., Kobayashi, Walker G.C. (2008) **Molecular determinants of a symbiotic chronic infection.** Annu. Rev. Genet. 42:413-41.
20. Gilles MA., Ditta, Helinski D.R. (1991) **A haemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *Rhizobium meliloti*.** Nature 350:170–172.
21. Girard L., Brom, Dávalos, López, Soberón, Romero D. (2000) **Differential regulation of fixN-reiterated genes in *Rhizobium etli* by a novel fixL-fixK cascade.** Mol. Plant. Microbe. Interact. 13:1283-92.
22. Gómez-Hernández N., Reyes-González, Sánchez, Mora, Delgado, Girard L. (2011). **Regulation and Symbiotic Role of nirK and norC Expression in *Rhizobium etli*.** MPMI 24: 233–45

23. González V., Santamaría, Bustos , Hernández-González, Medrano-Soto, Moreno-Hagelsieb, Janga, Ramírez, Jiménez-Jacinto, Collado-Vides, Dávila G. (2006) **The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons.** Proc. Natl. Acad. Sci. 10:3834-9
24. González V., Bustos, Ramírez-Romero, Medrano-Soto, Salgado, Hernández-González, Hernández-Celis, Quintero, Moreno-Hagelsieb, Girard, Rodríguez, Flores, Cevallos, Collado-Vides, Romero, Dávila G. (2003) **The mosaic structure of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 and its relation to other symbiotic genome compartments.** Genome. Biol. 4:R36
25. Grabbe R., Schmitz RA. (2003) **Oxygen control of *nif* gene expression in *Klebsiella pneumoniae* depends on NifL reduction at the cytoplasmic membrane by electrons derived from the reduced quinone pool.** Eur. J. Biochem. 270:1555–66
26. Granados-Baeza M., Gómez-Hernández, Mora, Delgado, Romero, Girard L. (2007) **Novel Reiterated Fnr-Type Proteins Control the Production of the Symbiotic Terminal Oxidase *cbb3* in *Rhizobium etli* CFN42.** MPMI 20:1241–49
27. Hageman RV., Burris RH. (1978) **Nitrogenase and nitrogenase reductase associate and dissociate with each catalytic cycle.** Proc. Natl. Acad. Sci. 75:2699–2702.
28. Hartsock, A., Shapleigh J. P. (2010) **Identification, functional studies, and genomic comparisons of new members of the NnrR regulon in *Rhodobacter sphaeroides*.** J. Bacteriol. 192: 903-911
29. Hao B., Isaza, Arndt, Soltis, Chan MK. (2002) **Structure-based mechanism of O<sub>2</sub> sensing and ligand discrimination by the FixL heme domain of *Bradyrhizobium japonicum*.** Biochemistry. 41:12952–58
30. Hill S., Austin, Eydmann, Jones, Dixon R. (1996) ***Azotobacter vinelandii* NifL is a flavoprotein that modulates transcriptional activation of nitrogen-fixation genes via a redox-sensitive switch.** Proc. Natl Acad. Sci. 93:2143–48.
31. Ho YS., Burden, Hurley JH. (2000) **Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor.** EMBO. J. 19:5288–99.
32. Jervis AJ., Crack, White, Artymiuk, Cheesman, Thomson, Le Brun, Green J. (2009) **The O<sub>2</sub> sensitivity of the transcription factor FNR is controlled by Ser24 modulating the kinetics of [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion.** Proc. Natl. Acad. Sci. 106(12):4659-64.

33. Jervis A.J., Green J. (2007) **In vivo demonstration of FNR dimers in response to lower O<sub>2</sub> availability.** J. Bacteriol. 189(7):2930-2.
34. Körner H., Sofia, Walter, Zumft G. (2003) **Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs.** FEMS Microbiol. Rev. 27:559-592
35. Lance C., Seefeldt, Hoffman, Dennis, Dean R. (2009) **Mechanism of Mo-Dependent Nitrogenase.** Annu. Rev. Biochem. 78:701
36. Little R., Dixon R. (2003). **The amino-terminal GAF domain of *Azotobacter vinelandii* NifA binds 2-oxoglutarate to resist inhibition by NifL under nitrogen-limiting conditions.** J. Biol. Chem. 278:28711–18.
37. Lopez O., Morera, Miranda-Rios, Girard, Romero, Soberón M. (2001). **Regulation of gene expression in response to oxygen in *Rhizobium etli*: role of FnrN in *fixNOQP* expression and in symbiotic nitrogen fixation.** J. Bacteriol. 183(24):6999-7006.
38. Masukawa H., Zhang, Yamazaki, Iwata, Nakamura, Mochimaru, Inoue, Sakurai H. (2009) **Survey of the distribution of different types of nitrogenases and hydrogenases in heterocyst-forming cyanobacteria.** Mar Biotechnol. 11(3): 397-409
39. Mesa S., Bedmar E.J, Chanfon A, Hennecke H, Fischer H.M. (2003) ***Bradyrhizobium japonicum* NnrR, a Denitrification Regulator, Expands the FixLJ-FixK2 Regulatory Cascade.** J. Bacteriol. 185: 3978–3982
40. Mesa S., Ucurum, Hennecke, Fischer H.M. (2005). **Transcription activation in vitro by the *Bradyrhizobium japonicum* regulatory protein FixK2.** J. Bacteriol. 187(10):3329-38.
41. Moore L.J, Kiley P.J. (2001). **Characterization of the dimerization domain in the FNR transcription factor.** J. Biol. Chem. 276(49):45744-50.
42. Montgomery D. **Experimentos comparativos simples. Diseño y Análisis de Experimentos.** 2<sup>a</sup>. ed México: Limusa Wiley 2007 pp.21-33
43. Murphy M.P. (1999) **Nitric oxide and cell death.** Biochem. Biophys. Acta. 1411:401-414.
44. Oh J., Ko, Kaplan S. (2004) **Reconstitution of the *Rhodobacter sphaeroides* *cbb3-PrrBA* signal transduction pathway in vitro.** Biochemistry. 43(24):7915-23.

45. Parkinson G., Gunasekera, Vojtechovsky, Zhang, Kunkel, Berman, Ebright RH. (1996 a) **Aromatic hydrogen bond in sequence-specific protein DNA recognition.** Nat. Struct. Biol. 3(10):837-41.
46. Parkinson G., Wilson, Gunasekera, Ebright, Ebright, Berman HM. (1996 b) **Structure of the CAP-DNA complex at 2.5 angstroms resolution: a complete picture of the protein-DNA interface.** J. Mol. Biol. 260(3):395-408.
47. Passner J.M., Steitz T.A. (1997) **The structure of a CAP-DNA complex having two cAMP molecules bound to each monomer.** Proc. Natl. Acad. Sci. 94(7):2843-7.
48. Peltzer M., Roques, Poinso, Aguilar, Batut, Capela D. (2008). **Auxotrophy Accounts for Nodulation Defect of Most *Sinorhizobium meliloti* Mutants in the Branched-Chain Amino Acid Biosynthesis Pathway.** MPMI. 21:1232–41
49. Salazar E., Díaz-Mejia, Moreno, Martinez-Batallar, Mora, Encarnación S. (2010) **Characterization of the NifA-RpoN Regulon in *rhizobium etli* in free life and in symbiosis with *phaseolus vulgaris*.** Appl. Environ. Microbiol. 76(13):4510-20
50. Noel K.D., Sánchez, Fernández, Leemans, Cevallos M.A. (1984) ***Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions.** J. Bacteriol. 158:148-155.
51. Ralph E.T., Guest, Green, J. (1998) **Altering the anaerobic transcription factor FNR confers a hemolytic phenotype on *Escherichia coli* K12.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95(18): 10449-52
52. Segovia L., Young, and Martinez-Romero, E. (1993) **Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* Biovar Phaseoli Type I Strains as *Rhizobium etli* sp. nov.** Int. J. Sist. Bacteriol. 43(2):374-77
53. Thony-Meyer L., Stax, Hennecke, H. (1998) **An unusual gene cluster for the cytochrome *bel* complex in *Bradyrhizobium japonicum* and its requirement for effective root nodule symbiosis.** Cell 57: 683-697
54. Schultz SC., Shields, Steitz TA. (1991) **Crystal structure of a CAP-DNA complex: the DNA is bent by 90 degrees.** Science. 253(5023):1001-7.
55. Seefeldt L., Dance, Dean DR. (2004) **Substrate interactions with nitrogenase: Fe versus Mo.** Biochemistry. 43:1401–1409.
56. Söderbäck E., Reyes-Ramirez, Eydmann, Austin, Hill, Dixon R. (1998). **The redox- and fixed nitrogen-responsive regulatory protein NIFL from *Azotobacter***

- vinelandii* comprises discrete flavin and nucleotide-binding domains. Mol. Microbiol. 28:179–192
57. Stracke S., Kistner, Yoshida, Mulder, Sato, Kaneko, Tabata, Sandal, Stougaard, Szczyglowski, Parniske M. (2002) **A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis.** Nature 417:959–62
58. Weber K.D., Vincent, Kiley P.J. (2005) **Additional determinants within *Escherichia coli* FNR activating region 1 and RNA polymerase alpha subunit required for transcription activation.** J. Bacteriol. 187(5): 1724-31
59. Swem LR., Kraft, Swem, Setterdahl, Masuda, Knaff, Zaleski, Bauer CE. (2003) **Signal transduction by the global regulator RegB is mediated by a redox-active cysteine.** EMBO. J. 22:4699–4708
60. Taylor B.L. and Zhulin I.B. (1999) **PAS domains: Internal sensors of oxygen, redox potential, and light.** Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63:479–506.
61. Tuckerman J.R., Gonzalez, Dioum, Gilles-Gonzalez MA. (2002) **Ligand and oxidation-state specific regulation of the heme-based oxygen sensor FixL from *Sinorhizobium meliloti*.** Biochemistry 41:6170–6177.
62. Wang Z., Gerstein, Snyder M. (2009). **RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics.** Nat. Rev. Genet. 10: 57–63
63. Wing H.J., Williams, Busby S.J. (1995) **Spacing requirements for transcription activation by *Escherichia coli* FNR protein.** J. Bacteriol. 177: 6704 -10
64. Rees D.C., Howard JB. (2000). **Nitrogenase: Standing at the crossroads.** Chem. Biol. 4(5):559-66.
65. Wu Q., Stewart V. (1998) **NasFED proteins mediate assimilatory nitrate and nitrite transport in *Klebsiella oxytoca (pneumoniae)* M5a1.** J. Bacteriol. 180(5): 1311-22