

Universidad Nacional
de La Plata – Facultad
de Ciencias Exactas –
Departamento de
Ciencias Biológicas

Trabajo de Tesis Doctoral
Año 2015

**La simbiosis fijadora de nitrógeno
Sinorhizobium meliloti - alfalfa (*Medicago sativa*):
Caracterización del rol biológico del ARN pequeño
Sm8 en la vida libre y simbiótica de los rizobios.**

Antonio Lagares (h)

**Director: Prof. Dr. Claudio Valverde
Co-director: Prof. Dr. Mariano Pistorio**

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata ha sido realizado en el Laboratorio de Bioquímica, Microbiología, e Interacciones Biológicas en el Suelo del Departamento de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes, bajo la dirección del Prof. Dr. Claudio Valverde y la co-dirección del Prof. Dr. Mariano Pistorio.

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

A Claudio Valverde, mi director, te agradezco especialmente por haberme brindado la posibilidad de emprender este proyecto juntos, haberme guiado y formado en lo humano y profesional durante estos 5 años. Aprecio enormemente el balance que has sabido establecer para otorgarme libertad para pensar e independencia para desenvolverme, a la vez estando siempre presente en cada detalle. Fue un placer compartir el trabajo con vos.

A Ana, el amor de mi vida. La vida ha sido muy generosa conmigo al permitirme compartir estos años a tu lado, vivir tantas experiencias, y proyectar de a dos para siempre. Sabés que este trabajo es en gran parte tuyo. Gracias por tu comprensión incondicional, por tolerar mis ausencias y postergaciones a lo largo de estos 5 largos años. Es invaluable lo que significás para mí. Te amo con el alma.

A toda mi familia, porque son el gran sostén, los quiero mucho. En primer lugar a mamá y papá, por servirme de ejemplo en la vida. Por enseñarme que no hay mejor ejemplo que dar el ejemplo, como han sabido hacer siempre. A ambos también por haberme enseñado el valor del estudio y del trabajo. A mami, porque todos quisieran tener una mamá como vos. Con eso lo digo todo! Por la compañía, el apoyo, el cariño. Todo lo que siempre me brindaste lo llevo siempre conmigo y guardo muy bien. A papi, mi gran referencia. Por cada momento que me regalaste para discutir un experimento o un resultado, por cada opinión crítica, por cada consejo, por tantas veces que me diste una mano cuando la necesité. Sinceramente GRACIAS!.

A Fede, Martín y Andrés, mis hermanos menores, y mayores compañeros y amigos. De ustedes aprendo cada día. Tincho, para vos va una mención especial. No me olvido aquella tarde de verano que pasaste ayudándome hasta altas horas de la noche a pesar todas las plantas. Gracias!! (véase Capítulo 5, Fig. 3 y 4).

A los abuelos, a los 4. La familia que tengo es a imagen y semejanza suya. Al abu Antonio, flor de abuelo me tocó! Te quiero mucho abuelo.

A la familia toda, tíos, tías, primos, primas, Ramona, Gachi, Rosita.

A mi nueva familia Rípodas-Rondi, especialmente a Laura, Adolfo, Caro, la abuela Baba, Gordita, Abel y Lidia. Gracias por estar siempre a nuestro lado y ayudarnos de modo incondicional. Me han acompañado continuamente en este proceso y se los agradezco de corazón.

A mis amigos de la vida Marian, Fer, Santi, Nico, Ana, May, Hernán, Ale, y las recientes incorporaciones conyugales Romi, Esteban, Pato. La familia por elección.

A mis amigos de la facu, Mauri, Cami, Emi, Eri, Daia, Maria, Seba, Cari, Leo, Luis, Boris, Maxi, Juan, Mancho. Gracias por los lindos momentos compartidos desde el 2004!

A Euge Salas por la gran predisposición de siempre para compartirnos las cepas, fagos, plásmidos.

A Marcos, Joha y Agus. La familia Coustet!

A mis compañeros y amigos del labo 9 y del LBS (en orden aleatorio!) Beti, Leo, Pato, Juan, Ger, Lucho, Dali, Lea, Indra, Flor, Belén, Tomás, Ale, Marian, Leticia y todos los que nos visitaron. Gracias porque han sido por sobre todo un soporte humano de excelencia durante todos estos 5 años. Por los momentos compartidos dentro y fuera del labo. Gracias en particular a los que estaban cuando yo llegué, porque siempre que necesité algo me brindaron ayuda sin límites, y a los que fueron sumándose, porque aportaron esa cuota de renovación al grupo que siempre es necesaria! Porque todos en conjunto, y cada uno en particular, ha sido fundamental para mi trabajo de Tesis. Los quiero mucho a todos.

A Luis Wall, el padre de esta gran familia que formamos en el laboratorio. Gracias Luis por los buenos consejos que siempre me has dado.

A Mariano Pistorio, por la enorme predisposición para formar parte de este Trabajo como co-director. Gracias Mariano!!

A la Dra. Anke Becker, por haberme abierto las puertas de su laboratorio tantas veces y haberme dado la libertad plena y el apoyo íntegro para llevar a cabo los experimentos que le planteé (que no fueron pocos!). Por estar siempre dispuesta a la discusión de mis resultados.

A los amigos que he hecho en el AG Becker, que son muchísimos y cada uno brindó toda su hospitalidad al recibirme y hacerme sentir como en casa; Benny, Stefan, Javi , Liza, Daniella, Matthew, Pornsri, Barbara, Marta, Alex, Jan, Werner, Betinna, Mona. A todos quiero agradecer porque además de la excelente recepción, cada uno me ha brindado su ayuda incondicional en el laboratorio desde su lugar. En particular a Stefan, por la gran compañía y asistencia técnica durante las noches que nos hemos quedado trabajando en el lab, por prestarse -y la primera vez casi sin conocerme!- a ocuparse de darme una mano para conseguir alquilar las habitaciones donde me hospedé. A Benny, porque fue el primero que conocí cuando fue a buscarme allá por el 2011 a la estación de Freiburg. A Javi, muchísimas gracias, porque tanto durante mi estancia allá como cuando tuvimos que coordinar ensayos a distancia siempre mostró una predisposición desinteresada y sumamente responsable. A Barbara porque tomó mis muestras casi a ciegas y sin haberme conocido, y me procesó los ¡25! microarrays que había dejado en Freiburg, porque entablamos una amistad muy linda y una vez más me mostró que, a pesar de la distancia cultural, en lo más importante no somos tan diferentes. A Ponsri, gracias por la cena Thai! A Dani, la representante latina del lab, gracias por la amistad y la compañía. A Marta y Alex, por la amistad y los lindos momentos compartidos allá y acá, gracias Marta por tu asistencia siempre. Todos forman parte de una linda familia de amigos. Vielen Dank an alle!

A mis compañeros de WGs, en Freiburg y en Marburg. Gracias por recibirme tan generosamente y por todos los momentos que compartimos juntos.

A los amigos del curso CABBIO, Paulo, João, Brenda, Mechi y Ximena. Qué lindo curso!

A Nancy López, gracias por prestarnos un poco de los colorantes para tinción de PHB! Fue sin dudas de gran ayuda!

A la gente del servicio de Microscopía electrónica de la Facultad de Cs. Veterinarias de la UNLP, en particular a la Dra. Susana Jurado, por su asesoramiento y ayuda para realizar las observaciones al micro que nos permitieron dar un quiebre fundamental en esta historia.

A Vale Segatori, un millón de gracias! Gracias porque me ayudaste siempre que te lo pedí y nunca me hiciste sentir que fuese un compromiso. Da gusto contar con compañeros así en el Departamento.

A los chicos de los pasillos del Depto. de CyT, gracias por el saludo de cada mañana!

A Mary, gracias inmensas por poner en órbita el labo cada mañana. Por los mates y las charlas tempranito.

A Bruno Frassanito, en primer lugar, agradecerle por esos asados festivos multitudinarios! Un fenómeno a cargo de la parrilla. Quiero darle las gracias muy particularmente porque siempre nos está brindando su asistencia técnica y demuestra su compromiso inmenso con el trabajo. Gracias Bruno!

A la gente del labo de Purificación y Plegado de Proteínas, por sacarme siempre de apuros cuando hacía falta alguna herramienta o utensilio raro.

A los compañeros de la Cátedra de Introducción a la Química y Qca. General. Fue un placer compartir con ustedes esos 3 años. A los alumnos, siempre uno aprende algo más de ustedes.

A la Universidad Nacional de Quilmes, especialmente al Dpto. de Ciencia y Tecnología, porque haberme otorgado el espacio y los medios para llevar a cabo este Trabajo.

A la Facultad de Cs. Exactas de la UNLP, por haberme brindado la formación académica.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por haberme brindado la posibilidad de desarrollar este Trabajo.

A la DAAD y al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la Nación por haberme otorgarme la beca que me permitió realizar la última estancia en Alemania.

ÍNDICE Y ABREVIATURAS

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE Y ABREVIATURAS	
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
I.1 El ciclo biológico del nitrógeno	3
I.2 Fijación biológica de nitrógeno. Microorganismos fijadores de nitrógeno.	3
I.3 La simbiosis rizobio-leguminosa.	5
I.4 La interacción benéfica <i>Sinorizobium meliloti</i> - <i>Medicago sativa</i> (alfalfa) como modelo de referencia para el estudio de las simbiosis entre rizobios y leguminosas.	6
I.5 Mecanismos de regulación mediados por ARN. Visión general. Riboregulación en bacterias. Historia de la investigación en área.....	13
I.6 Riboregulación en rizobios.	19
I.7 Estructura del transcriptoma de <i>S. meliloti</i> . Elementos no codificantes. Sm8.	20
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	23
CAPÍTULO 1	27
Distribución filogenética e inferencias evolutivas del gen <i>sm8</i>	
1.1 Introducción	29
1.2 Materiales y Métodos.....	30
1.2.1 Secuencias de referencia.....	30
1.2.2 Herramientas y métodos computacionales para la búsqueda de genes homólogos y construcción de la familia del sRNA Sm8.	30
1.2.3 Análisis filogenético de las especies de alfa-proteobacterias basado en la evolución de la secuencia del gen del ARN ribosomal 16S.	32
1.3 Resultados y Discusión	33
1.3.1 Búsqueda inicial por homología secuencial de genes homólogos de <i>sm8</i>	33
1.3.2 Extensión de la búsqueda de homólogos remotos a través de la implementación de modelos de covarianza.	35
1.3.3 Análisis de microsintenia de los genes homólogos de <i>sm8</i> . Nueva subfamilia de ARNs $\alpha 8s1$	37
1.3.4 Caracterización secuencial y estructural de la subfamilia $\alpha 8s1$	42
1.3.5 Reorganización genómica, duplicación génica y diversificación. Arquitectura de la familia de ARNs $\alpha 8$	45
1.4 Conclusiones	48

CAPÍTULO 2	49
Construcción y verificación de una cepa mutante $\Delta sm8$ y de cepas de sobreexpresión constitutiva e inducible del sRNA isogénicas de <i>S. meliloti</i> 2011	
2.1 Introducción	51
2.2 Materiales y Métodos.....	52
2.2.1 Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos.....	52
2.2.2 Medios y condiciones de cultivo	53
2.2.3 Síntesis del alelo mutante delecional del gen <i>sm8</i>	54
2.2.4 Transformación de <i>Escherichia coli</i> por electroporación.....	54
2.2.5 Movilización de plásmidos a <i>S. meliloti</i> por conjugación biparental	54
2.2.6 Manipulación del ADN. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	54
2.2.7 Extracción y purificación de ARN total de <i>S. meliloti</i>	55
2.2.8 Ensayos de <i>Northern blot</i>	55
2.2.9 Ensayos de RT-qPCR	56
2.3 Resultados y Discusión	57
2.3.1 Construcción del mutante isogénico de <i>S. meliloti</i> 2011 por delección parcial en el gen <i>sm8</i>	57
2.3.2 Complementación del mutante <i>sm8</i> . Construcción de cepa de sobreexpresión inducible de <i>Sm8</i> . Optimización de las condiciones de inducción.....	61
2.3.3 Construcción de cepa de sobreexpresión constitutiva de <i>Sm8</i>	64
2.4 Conclusiones	65
CAPÍTULO 3	67
Caracterización del rol biológico de <i>Sm8</i> en la vida saprofítica de <i>S. meliloti</i> 2011	
3.1 Introducción	69
3.2 Materiales y Métodos.....	70
3.2.1 Cepas bacterianas y plásmidos	70
3.2.2 Medios y condiciones de cultivo	70
3.2.3 Determinación de curvas de crecimiento planctónico bacteriano en <i>batch</i> mediante determinaciones de densidad óptica a 600 nm y recuento de células viables. .	70
3.2.4 Extracción y purificación de ARN. Ensayos de <i>Northern blot</i>	71
3.2.5 Medida de la actividad de fusión transcripcional <i>psm8</i> -GFP	71
3.2.6 Determinación cuantitativa del contenido celular de glucógeno.....	71
3.2.7 Determinación cuantitativa del contenido celular de PHB.....	72
3.2.8 Determinación del peso seco microbiano.....	72

3.2.9	Cuantificación de proteínas totales celulares.....	72
3.2.10	Microscopía electrónica de transmisión de células en cultivo líquido	73
3.3	Resultados y Discusión	74
3.3.1	Caracterización del efecto de la mutación del gen <i>sm8</i> sobre las características de crecimiento planctónico de <i>S. meliloti</i>	74
3.3.2	La inducción de Sm8 en la cepa $\Delta sm8$ complementa de forma completa el fenotipo mutante.	77
3.3.3	En condiciones de limitación de nitrógeno y exceso de carbono, <i>S. meliloti</i> $\Delta sm8$ acumula mayor biomasa celular que la cepa salvaje.	78
3.3.4	Sm8 y la acumulación de compuestos de reserva en <i>S. meliloti</i>	83
3.3.5	El análisis ultraestructural comparativo de <i>S. meliloti</i> salvaje y $\Delta sm8$ en fase estacionaria de crecimiento confirma diferencias en tamaño y forma de las células, y de los gránulos de reserva intracelulares de características compatibles con PHB.....	86
3.4	Conclusiones	87
CAPÍTULO 4		89
Caracterización del regulón del sRNA Sm8 a través del uso de herramientas transcriptómicas y proteómicas		
4.1	Introducción	91
4.2	Materiales y Métodos.....	92
4.2.1	Cepas bacterianas	92
4.2.2	Medios y condiciones de cultivo	92
4.2.3	Transcriptómica. Ensayos de microarreglos de ADNc	92
4.2.4	Ensayos de RT-qPCR	95
4.2.5	Ensayos de proteómica cuantitativa comparativa basada en marcación isotópica diferencial.	95
4.3	Resultados y Discusión	98
4.3.1	Impacto de la sobreexpresión de Sm8 sobre el transcriptoma de <i>S. mel</i> 2011	98
4.3.2	Alteraciones proteómicas derivadas de la mutación <i>sm8</i> en <i>S. meliloti</i> 2011	106
4.3.3	Exploración <i>in silico</i> de posibles determinantes moleculares de interacción directa entre Sm8 y los ARNs mensajeros vinculados a su regulón.....	112
4.3.4	Efecto de los cambios en la actividad de Sm8 sobre los componentes del modulón vinculado a la síntesis y degradación de PHB.....	115
4.3.5	Sm8 y la regulación del transportador de aminoácidos ramificados LivJ. Potencial relevancia simbiótica.	118
4.4	Conclusiones	121

CAPÍTULO 5	125
Impacto de la mutación en el gen <i>sm8</i> sobre la simbiosis entre <i>S. meliloti</i> y <i>M. sativa</i>	
5.1 Introducción	127
5.2 Materiales y Métodos.....	128
5.2.1 Cepas bacterianas	128
5.2.2 Esterilización de semillas en superficie y germinación.....	128
5.2.3 Cultivo axénico de plantas.....	128
5.2.4 Inoculación de plántulas	128
5.2.5 Determinación de biomasa seca aérea de las plantas y de nódulos	128
5.2.6 Ensayos de Reducción de Acetileno (ARA).....	129
5.2.7 Microscopía electrónica.....	129
5.3 Resultados y Discusión	130
5.3.1 Bacteroides de <i>S. meliloti</i> 2011 $\Delta sm8$ localizados en la zona simbiótica proximal de fijación de nitrógeno en nódulos de alfalfa presentan gránulos de morfología compatible con PHB.	130
5.3.2 Determinación del impacto de la mutación en el gen <i>sm8</i> sobre la actividad nitrogenasa específica en nódulos maduros mediante ensayos de ARA (ensayos de reducción de acetileno).	133
5.3.3 Caracterización de la simbiosis del mutante $\Delta sm8$ con alfalfa.....	134
5.4 Conclusiones	135
CONCLUSIONES GENERALES	137
ANEXO	143
BIBLIOGRAFÍA	147

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
Amp	Ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico
°C	Grados Celsius
CoA	Coenzima A
Cm	Cloranfenicol
CoIP	Co-inmunoprecipitación
dNTPs	Desóxirribonucleótidos trifosfato (<i>Deoxyribonucleotide triphosphates</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO ₆₀₀	Densidad óptica de la luz de $\lambda = 600$ nm
d.p.i.	Días post-inoculación
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPS	Exopolisacáridos
Fig.	Figura
FBN	Fijación biológica de nitrógeno
FSC	Dispersión frontal de la luz (<i>forward-scattered light</i>)
g	gramo
GFP	Proteína fluorescente verde (<i>Green fluorescent protein</i>)
Gm	Gentamicina
Hfq	Factor del huésped para la replicación del fago Q β (<i>Host factor for Qβ replication</i>)
hs	Horas
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
Kb	Kilobase
Km	Kanamicina
λ	Longitud de onda
l	Litro
LIV	Leucina, Isoleucina y Valina
M	Molar
MES	Ácido 2-(<i>N</i> -morfolino)etanosulfónico
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión
MOPS	Ácido 3-(<i>N</i> -morfolino)propansulfónico
mg	miligramo
min	minuto
ml	mililitro

mm	milímetro
mM	milimolar
mRNA	ARN mensajero
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
N ₂	nitrógeno molecular
ng	nanogramo
nm	nanómetro
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida (<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PHB	Polihidroxibutirato
pmol	picomol
pH	potencial de hidrógeno
RDM	Medio definido para rizobios (<i>Rhizobium Defined Medium</i>)
rpm	revoluciones por minuto
RT	Transcriptasa reversa
SDS	Dodecilsulfato de sodio
sRNA	ARN pequeño (<i>small RNA</i>)
SSC	Dispersión lateral de la luz (<i>side-scattered light</i>)
Str	Estreptomina
TBE	Buffer Tris-borato-EDTA
Tc	Tetraciclina
TY	Medio tripteína - extracto de levadura (<i>Tryptone Yeast</i>)
UFC	Unidades formadoras de colonias
UAF	Unidades arbitrarias de fluorescencia
URF	Unidades relativas de fluorescencia
UV	Ultravioleta
µg	Microgramo
µM	Micromolar
µl	Microlitro
V	Voltios
VMM	Medio de Vincent modificado (<i>Vincent's Modified Medium</i>)
×g	Fuerza gravitacional
% p/p	Porcentaje peso en peso
% p/v	Porcentaje peso en volumen
% v/v	Porcentaje volumen en volumen

INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1 El ciclo biológico del nitrógeno

El nitrógeno (N), constituyente de biomoléculas tales como aminoácidos, nucleótidos y vitaminas, representa un nutriente esencial para todas las formas de vida en la Tierra. Tal como ocurre con el resto de los elementos químicos, el N se presenta en la naturaleza bajo diferentes formas. Sus abundancias relativas están sujetas a la dinámica con que se llevan a cabo las transformaciones entre ellas, las cuales en conjunto, constituyen el denominado ciclo del N. Los microorganismos, a través de su diversidad metabólica, juegan un rol crítico interviniendo en gran parte de los procesos que constituyen este ciclo.

El ciclo biológico del N integra el flujo de N desde la atmósfera hacia los ecosistemas marinos y terrestres por medio la reducción del nitrógeno molecular a amonio a través del proceso de fijación biológica de nitrógeno (FBN), las transformaciones subsiguientes que sufre el nitrógeno fijado como la asimilación en compuestos orgánicos, la amonificación, y la oxidación e interconversión entre las formas inorgánicas del elemento (NO_2^- , NO_3^-), y el flujo de regreso hacia la atmósfera mediado por el proceso de denitrificación (Fig. 1).

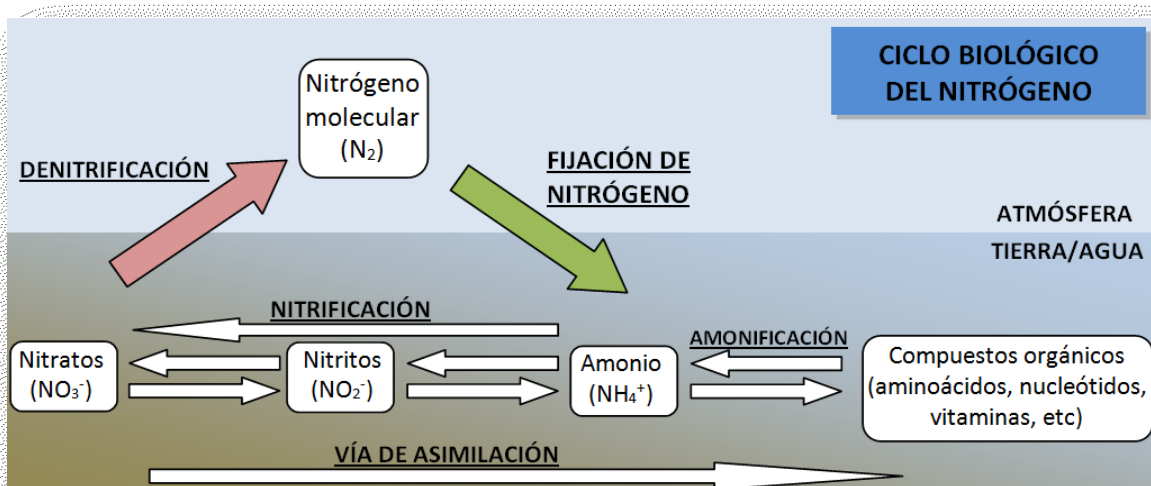


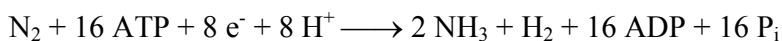
Figura 1: Esquema del ciclo biológico del nitrógeno.

I.2 Fijación biológica de nitrógeno. Microorganismos fijadores de nitrógeno.

Como se introdujo anteriormente, la continua pérdida de nitrógeno desde los ecosistemas terrestres y marítimos hacia la atmósfera producto de la actividad denitrificante requiere ser compensada por un flujo inverso que mantenga el balance adecuado. En este sentido, la FBN constituye un pilar fundamental del ciclo del N, siendo la principal vía natural de retorno del elemento a la biósfera. Desde el punto de vista agronómico, el cierre del ciclo del N en este sentido es esencial para mantener niveles del nutriente que permitan sostener el crecimiento vegetal y en última instancia mantener la productividad de los suelos.

El proceso bioquímico que subyace a la FBN implica la reducción enzimática del N₂ atmosférico a amonio, y es mediado por un grupo de microorganismos denominados diazotrofos (*di*: dos, *azo*: nitrógeno, *trofo*: alimento). Es interesante el hecho de que la habilidad para fijar nitrógeno parece encontrarse restringida a organismos tan primitivos como lo son un grupo selecto de bacterias y arqueas, no habiéndose hallado hasta el momento organismos eucariotas capaces de llevar a cabo este proceso. En este sentido, el nitrógeno molecular presente en la atmósfera, aunque siendo extremadamente abundante, no es asimilable de forma directa por los organismos superiores, como plantas y animales, sino que se requiere de la actividad intermediaria de microorganismos diazotrofos que introduzca el elemento en la cadena trófica.

La FBN es catalizada por el complejo enzimático denominado nitrogenasa, constituido por dos metalo-proteínas que se encuentran altamente conservadas a nivel secuencial y estructural entre los microorganismos diazotrofos (Dixon & Kahn, 2004). La reacción catalizada por el complejo nitrogenasa se presenta a continuación:



Las proteínas que componen el complejo de la nitrogenasa son extremadamente sensibles al O₂ debido a la presencia de los centros metálicos de hierro e hierro-molibdeno. Esto implica que se requiera la generación de un entorno de microaerobiosis que proteja al complejo enzimático de su exposición al oxígeno. A lo largo de la evolución, diferentes microorganismos han desarrollado distintas estrategias para lograr propiciar el ambiente requerido para el funcionamiento de la nitrogenasa, manteniendo a la vez una adecuada disponibilidad de oxígeno que les permita sostener el metabolismo aeróbico para suplir principalmente la propia demanda energética que implica el proceso de FBN.

Esta amplia diversidad contempla microorganismos que son capaces de llevar a cabo la FBN en forma de vida libre, y otros que necesariamente requieren de la interacción con una planta para desarrollar las condiciones necesarias para llevar a cabo el proceso.

Entre los microorganismos considerados fijadores libres que han sido más estudiados se pueden encontrar ciertas especies de cianobacterias (grupo diverso de bacterias capaces de realizar la fotosíntesis oxigénica y la FBN (Smith & Evans, 1971)) y las bacterias *Klebsiella pneumoniae* (Drummond, 1984) y *Azotobacter vinelandii* (Dos Santos & Dean, 2011), entre otros. Estos microorganismos perciben la limitación de N en su entorno y activan un programa de diferenciación celular que les permite encender la maquinaria de fijación de N. Las estrategias que adoptan las diferentes especies para llevar a cabo la FBN son diversas, aunque se reconocen factores genéticos en común que permiten establecer que la maquinaria de fijación posee un origen remoto común, donde los diferentes componentes sufrieron modificaciones producto de la herencia vertical y se diversificaron con la asistencia de eventos de transferencia genética horizontal (Masson-Boivin, *et al.*, 2009).

Por otro lado, las asociaciones fijadoras de nitrógeno entre bacterias y plantas se pueden sub-clasificar entre aquellas en las que los microorganismos colonizan de forma poco específica el entorno de las raíces -denominado rizósfera- de ciertas plantas (caso de bacterias pertenecientes a los géneros *Azospirillum* y *Herbaspirillum*) (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000, Pedrosa, *et al.*, 2001), y entre aquellas asociaciones de carácter más específico y naturaleza endofítica como lo son las interacciones entre rizobios y leguminosas, o entre plantas actinorrícicas (por ejemplo plantas del género *Discaria*, casuarinas, alisos) y bacterias del género *Frankia* (Benson, 1988, Wall, 2000). Independientemente del tipo de interacción, la asociación resulta siempre benéfica para ambos organismos que intervienen; la bacteria provee nitrógeno reducido fijado a la planta a cambio del aporte por parte de ésta de fotosintatos y otros nutrientes para sustentar el metabolismo del microorganismo, el cual se encuentra mayormente abocado al proceso de fijación.

I.3 La simbiosis rizobio-leguminosa.

Los rizobios son un grupo de alfa- y beta-proteobacterias cuyo rasgo distintivo es poseer la capacidad de interactuar de forma específica con raíces de plantas leguminosas, inducir en ellas la formación *de novo* de órganos radiculares -llamados nódulos-, para luego colonizarlos y diferenciarse allí a un estadio denominado bacteroide, especializado en llevar a cabo la FBN. Si bien el campo de la taxonomía rizobiana evoluciona constantemente producto de los avances tecnológicos que permiten establecer mejoras en los criterios de clasificación sistemática, se reconocen actualmente como microorganismos pertenecientes al grupo colectivamente denominado rizobios a ciertas especies correspondientes a los géneros *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* (*Ensifer*), *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Agrobacterium*, *Phyllobacterium*, *Ochrobactrum*, *Methylobacterium*, *Devosia*, *Shinella*, *Cupriavidus* y *Burkholderia* (Sawada, *et al.*, 2003, Gyaneshwar, *et al.*, 2011).

La extensa diversidad filogenética que caracteriza a los rizobios en conjunto con el elevado número de especies de leguminosas (*ca.* 18.000) capaces de participar en este tipo de asociaciones, traen consigo diferencias fisiológicas y morfológicas en el proceso de establecimiento y mantenimiento de las diferentes interacciones. Por ejemplo, existen diferencias fenotípicas entre distintos pares simbióticos en relación a la localización, forma y anatomo-histología de los nódulos que forman las plantas, así como también diferencias en los mecanismos de comunicación inicial rizobio-planta, en el modo de infección, en el estadio de diferenciación que alcanzan los bacteroides, entre otros aspectos que se destacan (Masson-Boivin, *et al.*, 2009). Las diferentes estrategias adoptadas surgieron paralelamente y de forma independiente, con la contribución de eventos de transferencia genética horizontal que permitieron el intercambio de funciones clave.

La reducción biológica del nitrógeno molecular a amonio es un proceso que requiere de un elevado gasto energético. En consecuencia, la actividad fijadora de nitrógeno debe estar

estrictamente regulada para satisfacer los requisitos del nutriente cuando este se halla en condiciones limitantes, pero controlando al mismo tiempo evitar el uso innecesario de recursos energéticos cuando la disponibilidad de N es suficiente y no condiciona el crecimiento vegetal (Oka-Kira & Kawaguchi, 2006, Mortier, *et al.*, 2012, Terpolilli, *et al.*, 2012).

En el presente trabajo de Tesis se utilizó como referencia de estudio al sistema modelo de interacción simbiótica *Sinorhizobium meliloti* - *Medicago sativa* (alfalfa). En las siguientes secciones del Capítulo introductorio, se presentan en forma resumida los aspectos más relevantes de esta interacción con el fin de sentar el marco teórico para el desarrollo de la Tesis.

I.4 La interacción benéfica *Sinorhizobium meliloti* - *Medicago sativa* (alfalfa) como modelo de referencia para el estudio de las simbiosis entre rizobios y leguminosas.

Sinorhizobium meliloti es un bacilo gram negativo perteneciente a la clase de las alfa-proteobacterias. Es capaz de habitar el suelo bajo una forma de vida libre saprofítica, o bajo ciertas condiciones, logra establecer una interacción simbiótica con plantas leguminosas de los géneros *Medicago*, *Melilotus* y *Trigonella* (Horvath, *et al.*, 1986, Gallusci, *et al.*, 1991, Roumiantseva, *et al.*, 2002). *S. meliloti* posee un genoma tripartito de 6,7 Mb; constituido por un cromosoma de 3,65 Mb y dos megaplásmidos denominados pSymA y pSymB, de tamaños 1,53 y 1,68 Mb, respectivamente. Si bien los replicones presentan distintas características estructurales y funcionales, todos contribuyen, en grado variable, a la capacidad del microorganismo de establecer la interacción con la planta huésped (Galibert, *et al.*, 2001). El plásmido simbiótico A, único replicón no esencial, concentra los genes relacionados con la comunicación temprana con la planta huésped y los genes estructurales para la fijación de nitrógeno (Barnett, *et al.*, 2001).

El análisis del genoma de *S. meliloti* revela una alta complejidad fisiológica y diversidad metabólica (Galibert, *et al.*, 2001). La elevada proporción de genes dedicados al metabolismo y transporte de carbono no sorprende, teniendo en cuenta la dualidad en términos de los estilos de vida que puede optar (Geddes & Oresnik, 2014). En lo que respecta al metabolismo central del carbono y energía, la carencia del gen codificante para la enzima con actividad fosfofructoquinasa le impide llevar a cabo la vía glicolítica (Arias, *et al.*, 1979), aunque es capaz de metabolizar hexosas dado que posee habilitadas las vías metabólicas de Entner-Doudoroff (Stowers, 1985), Embden-Meyerhof-Parnas (Geddes & Oresnik, 2014) y el ciclo de las pentosas (Martinez-De Drets & Arias, 1972). Adicionalmente presenta la maquinaria completa para llevar a cabo el ciclo de los ácidos tricarbónicos (Stowers, 1985, Dunn, 1998). Es capaz de crecer en vida libre con ácidos dicarbónicos como única fuente de C (succinato o malato, tal como ocurre durante la simbiosis) puesto que logra completar la vía gluconeogénica y posteriormente la biosíntesis de polisacáridos y otros compuestos esenciales para el desarrollo. De hecho, estos

compuestos serían de preferencia frente a otras fuentes de C, puesto que una amplia proporción de los genes responsables asociados al metabolismo de hexosas y otros azúcares (disacáridos, alcoholes) se hallan bajo un sistema de represión por catabolito mediada por succinato (Ucker & Signer, 1978).

En relación a la síntesis de compuestos de reserva de C y energía, se ha descrito que *S. meliloti* es capaz de acumular y degradar glucógeno y polihidroxibutirato (PHB). Sintetiza adicionalmente lipopolisacáridos, β -1,2-glucano cíclico, y exopolisacáridos (EPS) que excreta al medio extracelular. Estos últimos son requeridos para la correcta competitividad de los rizobios durante las etapas tempranas de la simbiosis. La síntesis de estos compuestos se encuentra fuertemente condicionada por las condiciones nutricionales y de crecimiento (Zevenhuizen, 1981).

Sin duda, la relevancia que posee el estudio de la bacteria *S. meliloti* está fundada en su capacidad para establecer interacciones simbióticas con leguminosas y llevar a cabo la FBN. La secuenciación completa del genoma de diversas cepas de *S. meliloti* (Schneiker-Bekel, *et al.*, 2011, Martínez-Abarca, *et al.*, 2013, Sallet, *et al.*, 2013), y el avance que se ha alcanzado con la obtención del borrador del genoma completo de *Medicago truncatula* (Young, *et al.*, 2011) han sido de gran estímulo en la promoción de la caracterización de los determinantes moleculares involucrados en el desarrollo de esta interacción rizobio-planta, desde las etapas más tempranas hasta la consolidación de la simbiosis.

El suelo constituye un nicho oligotrófico complejo, donde un gran número de microorganismos conviven compitiendo por su subsistencia. En este sentido, la asociación con la planta provee una ventaja competitiva para los rizobios. La capacidad de establecer una comunicación específica entre rizobios y plantas es producto de una extensa co-evolución (Martínez-Romero, 2009), que ha permitido a la planta desarrollar la habilidad para diferenciar entre potenciales simbiosis, como el caso de los rizobios, y microorganismos patógenos.

Etapas tempranas de la simbiosis. Comunicación entre rizobios y la raíz.

La interacción entre los rizobios y la planta huésped comienza con una etapa inicial de intercambio de señales químicas que conducen al reconocimiento específico mutuo. En condiciones de hambreado de N, las raíces secretan a la rizósfera un conjunto de compuestos denominados flavonoides (derivados de la 2-fenil-1,4-benzopirona). Estos compuestos son detectados por los rizobios a través de la unión a sus proteínas NodD (miembros de la familia LysR de factores de transcripción). Como consecuencia, éstas se activan e inducen la expresión del conjunto de genes *nod* que codifican para las maquinarias de síntesis de los factores de nodulación (NFs), los cuales constituyen la primera señal de respuesta de los rizobios hacia las raíces en pos de dar inicio al proceso de infección (Perret, *et al.*, 2000). Los NFs se definen químicamente como lipoquitoligosacáridos, cuya estructura está constituida por un núcleo básico de longitud variable formado por residuos

de N-acetyl-D-glucosamina enlazados por uniones β -1-4, que contiene un grupo N-acyl sustituyente en el residuo no reductor (Fig. 2) (Perret, *et al.*, 2000). El núcleo básico de los NFs es sintetizado por las proteínas codificadas en los genes *nodABC*. Adicionalmente, los NFs presentan modificaciones de naturaleza variable (sulfurilaciones, acetilaciones, metilaciones, carbamilaciones, entre otras) en diferentes posiciones del núcleo básico. La introducción de grupos sustituyentes y las modificaciones químicas realizadas al ácido graso acoplado a la glucosamina terminal en el núcleo básico son ejecutadas por proteínas codificadas por otro grupo de genes *nod* (*nodEF*, *nodG*, *nodH*, *nodPQ* y *nodL*, en *S. meliloti*) y por genes *noe* y *nol*.

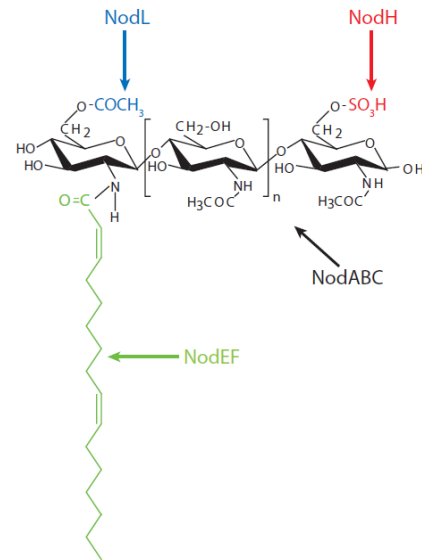


Figura 2. Estructura de un factor Nod. Imagen tomada de (Gibson, *et al.*, 2008).

La longitud del núcleo básico, la estructura del resto N-acilo acoplado al residuo terminal, y la identidad de los sustituyentes que "decoran" al esqueleto básico son los determinantes estructurales que caracterizan a un factor Nod y varían entre especies de rizobios. Es precisamente esta variación uno de los factores que determina las diferentes especificidades entre especies de rizobios y leguminosas (Lerouge, *et al.*, 1990). Cabe destacar que una misma especie de rizobio puede sintetizar una familia de factores Nod, dificultando así la predicción del rango de huéspedes para un rizobio en particular a partir de la estructura de los NFs que produce (Perret, *et al.*, 2000).

La detección de los factores Nod sintetizados por la bacteria por parte de la planta es mediada por los receptores de múltiples dominios extracelulares, pertenecientes a la familia LysM, denominados MtNFP (*M. truncatula* Nod factor perception) que se encuentran expuestos en la superficie externa de los pelos radiculares (Geurts, *et al.*, 2005). La unión de los NFs al receptor específico en la célula vegetal desencadena un incremento en los niveles de calcio intracelular en el pelo radicular, seguida por oscilaciones de la concentración del ión que derivan en alteraciones del citoesqueleto de la célula produciendo un enrulado del pelo, conocido como CCRH (*colonized curled root hair*), que atrapa a las bacterias adheridas a la superficie del mismo (Fig. 3) (Oldroyd & Downie, 2004, Sieberer, *et al.*, 2005). Paralelamente, la detección de los NFs estimula a las células de la corteza de la raíz a reiniciar el proceso de mitosis para dar lugar a la formación del primordio de nódulo, estructura que posteriormente recibirá a las bacterias (Foucher & Kondorosi, 2000). Muchos de los componentes celulares involucrados en la compleja transducción de señales que conduce a los eventos descritos en las células de la raíz han sido identificados y caracterizados (Cook, 2004, Oldroyd & Downie, 2004, Geurts, *et al.*, 2005, Oldroyd & Downie, 2006).

Por parte de la bacteria, ante el reconocimiento de las señales de la planta indudablemente ocurren cambios tempranos en la expresión de otros genes no involucrados en la producción de NFs. Si bien es un campo que ha sido aún poco explorado, es de suma importancia ya que esta etapa condiciona a los rizobios para la competencia efectiva con otros microorganismos presentes en la rizósfera por la utilización de sustratos, adhesión a la superficie radicular, entre otros.

Invasión de la raíz. Desarrollo y progresión del hilo de infección.

El proceso de infección continúa mediante la invaginación de la membrana y pared celular en la punta del pelo radicular -formando una estructura denominada hilo de infección- que permite el progreso de las bacterias atrapadas en el CCRH en sentido hacia la corteza de la raíz (Jones, *et al.*, 2007). Durante este proceso, la célula vegetal sufre una reorganización de su citoesqueleto que deriva en el cambio de polaridad celular e inversión del crecimiento de la punta del pelo (Gage, 2004). La luz del hilo de infección es una proyección del espacio externo que permite a los rizobios, estando aún fuera de la célula vegetal, acercarse progresivamente a la corteza de la raíz. La progresión de la formación del hilo de infección es sostenida por la presencia de rizobios en la luz del hilo en activa división celular sintetizando NFs y exopolisacáridos simbióticamente activos que estimulan, entre otras cosas, la síntesis de membrana y pared celular en la célula vegetal (Gage, 2002). En esta etapa, la célula vegetal secreta activamente especies reactivas de oxígeno (ROS) a la luz del hilo de infección como mecanismo de defensa; ante el balance correcto de ROS, *S. meliloti* es capaz de evadir el ataque y en particular, se considera la posibilidad de que las ROS participen activamente del progreso del hilo de infección. En este sentido, la co-evolución bacteria-huésped habría permitido a los rizobios adaptar un mecanismo de defensa de la planta para su propio beneficio (Jones, *et al.*, 2007).

A

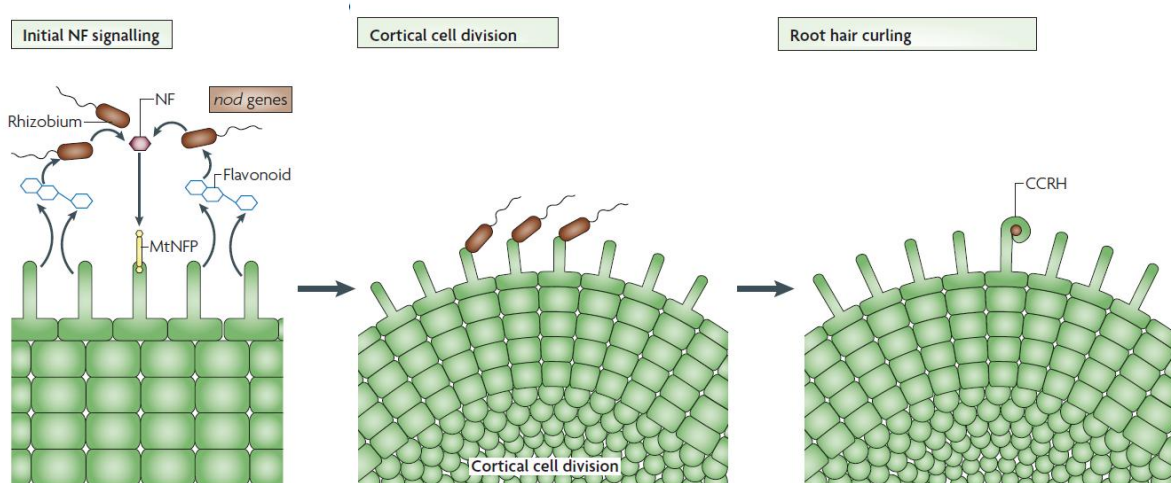
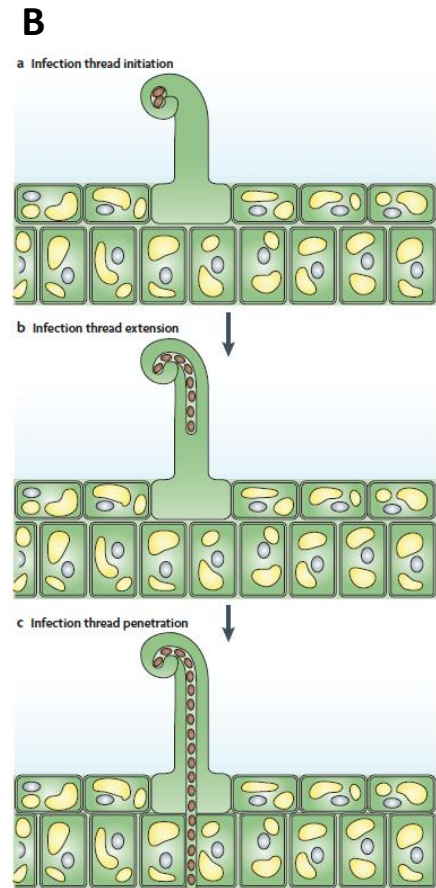


Figura 3. Esquema de (A) las etapas de señalización temprana entre *S. meliloti* y la planta huésped y formación del CCRH, y (B) la etapa de invasión del pelo radicular por los rizobios (página siguiente). Imagen adaptada de (Jones, *et al.*, 2007)

Una vez que el hilo de infección ha penetrado hasta la base de la célula del pelo radicular, las bacterias deben ser capaces de sostener el progreso del hilo de infección a través de las distintas capas de las células de la raíz hasta alcanzar las células del cortex radicular. La fitohormona citoquinina y los factores Nod están ambos implicados en el direccionamiento del hilo de infección hacia las células de la corteza. Los hilos de infección que penetran las raíces de *M. truncatula* o *M. sativa* deben crecer por sobre las células en activa división que se encuentran en el primordio nodular. Las células adyacentes a este primordio darán origen a un meristema nodular persistente que mantendrá una población de células activamente en división creciendo para dar origen al nódulo radicular (Foucher & Kondorosi, 2000). En el caso de los nódulos indeterminados, como los que se desarrollan en alfalfa, los hilos de infección crecen por sobre la zona meristemática para llegar a las zonas subyacentes de la misma. Estas capas celulares, las cuáles serán invadidas por las bacterias, se caracterizan por su mayor número cromosómico, alcanzando la poliploidía por un proceso de endoreduplicación (Vinardell, *et al.*, 2003). El estado poliploide conduce a estas células a presentar una mayor tasa de transcripción y tasa metabólica, condiciones importantes para luego poder sostener la FBN.



Continuación Figura 3.

Endocitosis del rizobio y diferenciación a bacteroide.

Cuando los rizobios alcanzan la corteza radicular, encuentran el primordio del nódulo y son internalizadas por células corticales que les proporcionan un nicho apropiado para el crecimiento y diferenciación (Fig. 4). Cada bacteria es endocitada por una célula en un compartimento circunscripto por membrana originalmente perteneciente al hilo de infección, carente de pared celular. Esta unidad formada por la bacteria individual y la membrana de origen vegetal se denomina simbiosoma (Jones, *et al.*, 2007). En nódulos indeterminados, la célula bacteriana y la membrana que la rodea se dividen sincrónicamente antes que la bacteria se diferencie. Es durante estas divisiones cuando el simbiosoma incorpora nuevos lípidos y proteínas en su membrana, impartándole características bioquímicas únicas (Robertson & Lyttleton, 1984).

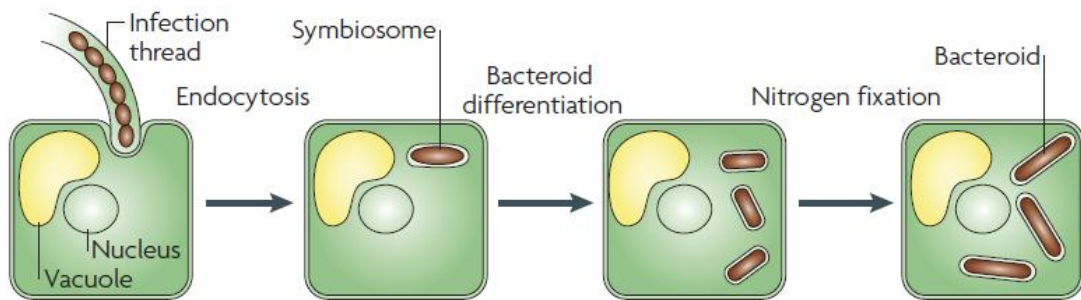


Fig. 4. Esquema del proceso de endocitosis del rizobio y diferenciación a bacteroide fijador de nitrógeno (Jones, *et al.*, 2007).

La sobrevivencia del rizobio y su diferenciación dentro del simbiosoma están sujetos tanto a factores propios de la bacteria como a factores de la planta. Dentro del simbiosoma, el rizobio sufre profundos cambios fisiológicos producto del proceso de diferenciación celular para convertirse en un bacteroide especializado en llevar a cabo la FBN. En este sentido, la célula vegetal ejerce un control estricto sobre el rizobio, permitiendo su sobrevivencia y diferenciación a través del aporte de nutrientes. Las plantas que forman nódulos indeterminados imponen un programa de endoreduplicación genómica del rizobio (Vinardell, *et al.*, 2003) para aumentar indirectamente su tasa metabólica y poder aportar los requisitos energéticos de la fijación de nitrógeno. Una vez alcanzado este grado de diferenciación, es necesaria la disminución de la presión parcial de oxígeno para que se exprese correctamente la maquinaria de fijación de nitrógeno y luego la nitrogenasa encuentre el ambiente propicio para su funcionamiento. La producción de leghemoglobinas por parte de la planta conduce a la generación de microaerobiosis.

La expresión del complejo de la nitrogenasa y de las enzimas para llevar a cabo la respiración microaeróbica es controlada por una cascada regulatoria que se desencadena ante la percepción de bajos niveles de oxígeno en el bacteroide por el sistema de dos componentes integrado por las proteínas FixJ y FixL. En términos generales, en condiciones de baja tensión de oxígeno, FixJ-L inducen la expresión de las proteínas FixK y NifA, las cuales activan la expresión de los genes *fix* (respiración microaeróbica) y los genes *nif* (fijación de nitrógeno), respectivamente. A su vez, la expresión de los genes *nif* en el bacteroide está regulada positivamente por el hambre de N a través del factor σ^{54} (Fischer, 1994). Estos cambios transcripcionales en el rizobio diferenciado están acompañados por cambios que conllevan a una regulación negativa en la mayoría de otros procesos metabólicos, de esta forma redireccionando el metabolismo de la bacteria para llevar a cabo de forma casi exclusiva la FBN.

Entre los aspectos más relevantes del metabolismo simbiótico y el intercambio de nutrientes entre el bacteroide y la célula vegetal, el amonio generado por la nitrogenasa es

secretado por los bacteroides al lumen del simbiosoma y transportado al citosol de la célula vegetal a través de canales de NH_4^+ presentes en la membrana peribacteroidea (Fig. 5). Una vez allí, es asimilado principalmente formando glutamina y asparagina. Simultáneamente, se requiere un flujo constante de carbono para proveer al bacteroide metabolitos y energía para soportar la diferenciación y FBN. A cambio del N fijado, la planta provee de fotosintatos al bacteroide bajo la forma de ácidos dicarboxílicos, principalmente malato, a través del sistema de transporte Dct de la bacteria (Oldroyd, *et al.*, 2011), que sirven de fuente de C y energía para sustentar el metabolismo microbiano y la FBN (Fig. 5).

Tanto en la simbiosis que da lugar a la formación de nódulos indeterminados entre *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* y *Phaseolus vulgaris* (Prell, *et al.*, 2010), como también en los nódulos determinados durante la simbiosis entre *R. leguminosarum* bv. *viciae* y *Pisum sativum* (Prell, *et al.*, 2009), el ingreso de aminoácidos ramificados aportados por la célula vegetal al bacteroide es crítico para el normal desarrollo de éste puesto que su síntesis *de novo* se halla reprimida en la bacteria en el marco del fenómeno que se ha denominado auxotrofia simbiótica. Si bien existen evidencias que sugieren que este fenómeno se extendería a la simbiosis entre *S. meliloti* y alfalfa, ensayos similares de caracterización de mutantes de los transportadores de aminoácidos ramificados en esta bacteria durante la interacción con alfalfa no han revelado el fenotipo esperado. La causas posibles de las diferencias con *R. leguminosarum* son múltiples y restan ser clarificadas aún.

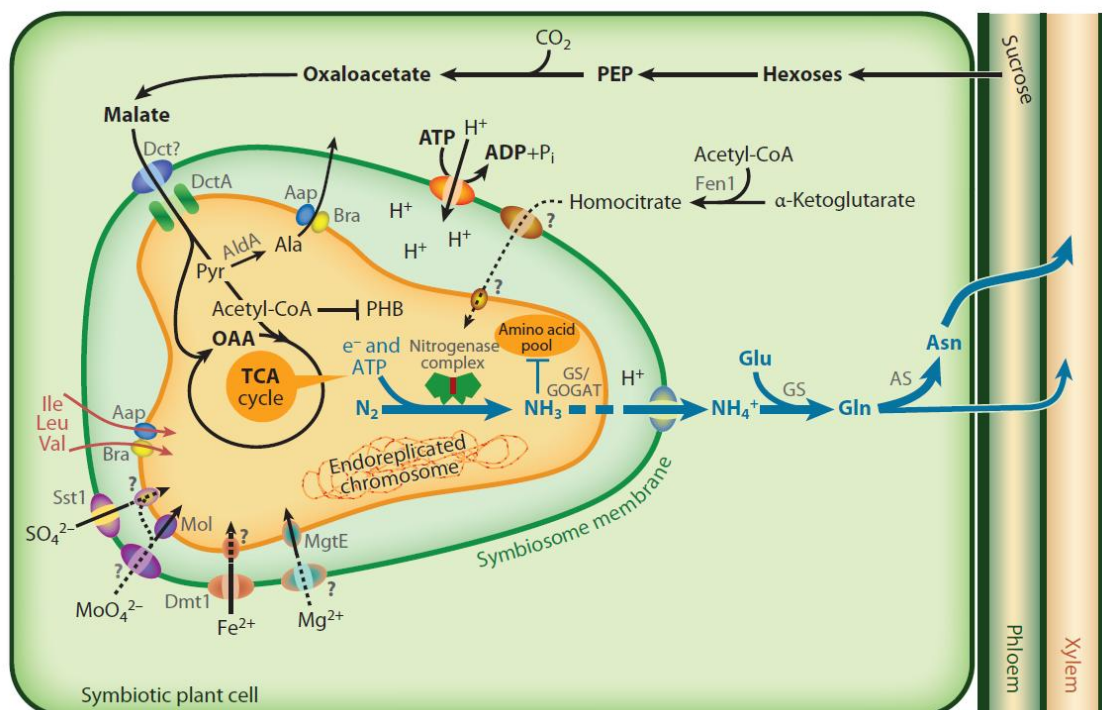


Figura 5. Esquema de bacteroide en nódulo indeterminado. Se detallan los aspectos sobresalientes del metabolismo y transporte. Tomado de (Udvardi & Poole, 2013).

I.5 Mecanismos de regulación mediados por ARN. Visión general. Riboregulación en bacterias. Historia de la investigación en área.

Las moléculas de ARN juegan un rol central en la regulación de la expresión génica en los tres dominios de la vida. Los ARNs regulatorios fueron descubiertos originalmente en organismos procariotas hace cerca de 50 años. Los mecanismos a través de los cuales estas moléculas ejercían su función regulatoria fueron descritos mucho antes de que se las descubriera como elementos regulatorios en organismos eucariotas. La investigación en riboregulación en procariotas ocurrió en tres grandes fases.

La primera fase comienza hace 50 años, cuando Hindley (Hindley, 1967) identifica una molécula de ARN, luego llamada 6S, como una especie de ARN abundante en *E. coli*. Unos años más tarde, luego de extenso trabajo de caracterización, su secuencia y estructura secundaria putativa fueron publicadas (Brownlee, 1971). Sin embargo, varias décadas pasaron luego antes que la función como regulador de la ARN polimerasa fuera descrita para el ARN 6S (Wassarman & Storz, 2000). Otro ARN regulatorio reportado tempranamente en enterobacterias fue el ARN Spot 42 (Ikemura & Dahlberg, 1973). El hecho de que su expresión estuviese regulada por el sistema cAMP-CRP (Sahagan & Dahlberg, 1979) y que su sobreexpresión tuviera consecuencias fenotípicas marcadas (Rice & Dahlberg, 1982), sugirieron la relevancia funcional de esta molécula. Sin embargo, su rol biológico no fue determinado hasta 40 años más tarde, cuando se evidenció que la complementariedad que poseía su secuencia con la secuencia correspondiente a la región circundante al codón de inicio del gen *galk* era responsable de su capacidad de desregular la expresión del operón *galETKM* para la metabolización de galactosa (Moller, *et al.*, 2002). Paralelamente al descubrimiento de los ARNs regulatorios clasificados como "de origen cromosomal", se identificaban los primeros ARNs "de origen plasmídico" o "extracromosomales", los cuales presentaban la particularidad de expresarse desde la cadena complementaria a los genes que regulaban, como en el caso de los transcritos antisentido al gen *cro* en el bacteriofago lambda (Spiegelman, *et al.*, 1972) y el RNAi plasmídico (Stougaard, *et al.*, 1981, Tomizawa, *et al.*, 1981).

En las siguientes dos décadas, sólo un pequeño número de ARNs regulatorios fueron identificados aunque de forma fortuita, entre ellos los ARNs pequeños MicF (Mizuno, *et al.*, 1984), DicF (Faubladier, *et al.*, 1990) y OxyS (Altuvia, *et al.*, 1997) de *E. coli*. Sin embargo, su importancia y las consecuencias que traería la comprensión de su rol en la interpretación de los mecanismos de regulación de la expresión génica no fueron apreciadas inicialmente. Para el año 2001, sólo 14 ARNs pequeños habían sido identificados en *E. coli* (Argaman, *et al.*, 2001).

Una nueva fase comenzó ese mismo año cuando las búsquedas computacionales fueron comenzadas a ser usadas para la identificación sistemática de genes codificantes para ARNs pequeños. Los primeros estudios utilizaron estrategias de genómica comparativa entre especies filogenéticamente cercanas (Wassarman, *et al.*, 2001), incluyendo la búsqueda de señales transcripcionales o de elementos de estructura secundaria conservados en regiones

intergénicas (inter-ORF) (Argaman, *et al.*, 2001, Rivas, *et al.*, 2001). Producto de la implementación de estas nuevas estrategias se lograron identificar docenas de nuevos ARNs pequeños no codificantes, revelando que su presencia no estaba acotada solo al genoma de *E. coli*, sino que también se encontraban genes de ARNs pequeños no codificantes en otros genomas de bacterias Gram negativas (especies de *Pseudomonas*, *Vibrio*, rizobios) (Lenz, *et al.*, 2004, Wilderman, *et al.*, 2004, Valverde, *et al.*, 2008, Vercruyssen, *et al.*, 2010) y Gram positivas (especies de *Streptococcus*, *Listeria*) (Halfmann, *et al.*, 2007, Mandin, *et al.*, 2007).

Una tercera fase comenzó más recientemente con el advenimiento de las tecnologías de secuenciación profunda de ARN, las cuales aceleraron notablemente la identificación de nuevos transcritos y permitió mapear de forma sistemática los sitios de inicio de la transcripción en los genomas de los microorganismos sujetos a estudio. En conjunto con el progreso en el campo de la bioinformática y de la caracterización experimental de las estructuras de ARNs, el estudio se ha enfocado en la determinación de la bioquímica, el metabolismo y la biología molecular de los ARNs pequeños regulatorios. **El desafío actual consiste en elucidar el rol biológico de los mismos**, integrando información referente a los factores que regulan su expresión, la extensión de sus regulones, y los mecanismos a través de los que operan a nivel molecular.

Hoy en día se acepta que los **ARNs pequeños** en organismos procariotas son un grupo heterogéneo de transcritos de una longitud que puede variar entre los 50 a 300 nt, sintetizados como unidades transcripcionales independientes desde diversas localizaciones genómicas (Gottesman & Storz, 2011). En términos generales, la función de los ARNs pequeños no codificantes se encuentra vinculada a la regulación de la expresión génica a nivel post-transcripcional, operando principalmente sobre la tasa de traducción y/o estabilidad de uno o varios mRNA (Waters & Storz, 2009).

Se reconocen tres grandes clases de ARNs pequeños, definidas en función de los mecanismos de acción, y en segunda instancia, de la vinculación física entre la localización en el genoma en la cual están codificados respecto a la del mRNA que regulan. Las dos primeras clases incluyen ARNs pequeños cuya actividad está fundada en la interacción directa con moléculas de ARN blanco a través de complementariedad secuencial.

En primer lugar podemos definir la clase de los denominados ARNs pequeños codificados en *cis* (*cis*-encoded RNAs, antisense RNAs, o asRNAs) (Georg & Hess, 2011). Estos se originan desde la cadena complementaria al gen que regulan y actúan mediante un apareamiento de bases perfecto con el mRNA blanco, de esta forma modulando su actividad. A pesar del gran número asRNAs detectados en cada uno de los modelos bacterianos que se han estudiado, sólo se conoce el rol biológico de un pequeño grupo de ellos, y no está claro si el resto de los casos se tratan de artefactos en la detección o constituyen eventos de transcripción espuria. Debido a la perfecta complementariedad entre el asRNA y el mRNA blanco que es regulado, normalmente esta interacción no requiere de factores adicionales para poder ser ejercida.

La segunda clase, probablemente la más estudiada, está constituida por los **ARNs pequeños codificados en *trans*** (*trans*-encoded sRNAs, o simplemente sRNAs). Los sRNAs son sintetizados desde regiones “inter-ORF” del genoma, alejadas del sitio donde se expresa la molécula de mRNA blanco cuya actividad regulan, a partir de un promotor específico y un terminador que generalmente es del tipo Rho-independiente. En la mayoría de los casos los sRNAs no requieren una etapa de procesamiento madurativo; y actúan por apareamiento imperfecto de bases con los transcritos blanco, principalmente sobre las regiones líder (5'UTRs) de mRNAs, alterando su tasa de traducción y/o su estabilidad. Generalmente son degradados junto con el ARN blanco luego de establecida la interacción. Usualmente requieren de la asistencia de una proteína chaperona de interacciones sRNA-mRNA, que facilita la unión entre moléculas de ARN que no son completamente complementarias; este rol es principalmente ejercido por la proteína Hfq (Vogel & Luisi, 2011, Sobrero & Valverde, 2012), aunque se han descrito proteínas chaperonas alternativas que podrían ser importantes para la actividad de ciertos sRNAs (Pandey, *et al.*, 2011). La complementariedad limitada entre los ARNs que interactúan, provee la ventaja de no restringir la acción de un sRNA sobre un único blanco, permitiendo de esta forma extender la regulación sobre un grupo más amplio de genes, posibilitando así la orquestación de respuestas más complejas (Fig. 6) (Beisel & Storz, 2010).

La mayoría de los sRNAs pertenecientes a esta clase que han sido caracterizados, se expresan bajo condiciones específicas de crecimiento, por ejemplo estrés oxidativo, estrés de membrana, o limitación de nutrientes (Gottesman & Storz, 2011) (Tabla I.1).

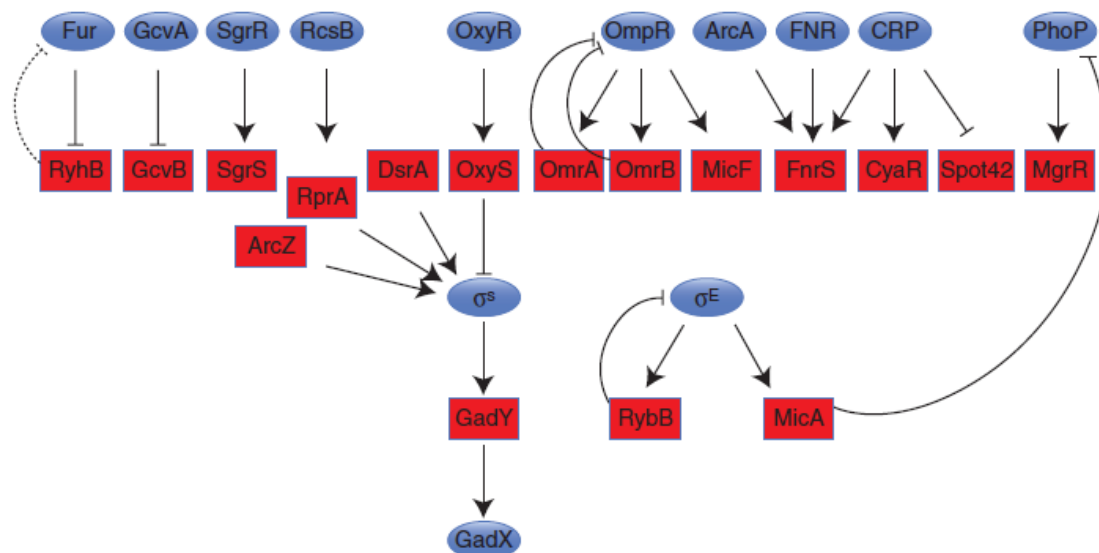


Figura 6. Ejemplo de circuitos regulatorios de sRNAs que actúan en *trans* mediante apareamiento de bases. Los sRNAs se muestran en recuadros rojos. Los factores de transcripción responsables de regular su síntesis se muestran en óvalos azules. Figura tomada de (Gottesman & Storz, 2011).

Tabla I.1 Ejemplo de la diversidad de roles fisiológicos de *trans-encoded* sRNAs caracterizados en *E. coli* and *S. typhimurium*

sRNA	Longitud (nt)	Regulación	Respuesta fisiológica*	Referencias
ArcZ	120, 50	Inducido bajo condiciones aeróbicas; Reprimido por ArcA	Activación de σ^S ; represión de actividades alternativas (<i>rpoS</i> , <i>sdaCB</i> , <i>tpx</i>)	(Papenfort, <i>et al.</i> , 2009, Mandin & Gottesman, 2010)
CyaR	87	Inducido por baja glucosa. Activado por CRP (regulado por σ^E)	Represión de síntesis de porina y quorum (<i>ompX</i> , <i>luxS</i> , <i>nadE</i>)	(Johansen, <i>et al.</i> , 2008, Papenfort, <i>et al.</i> , 2008, De Lay & Gottesman, 2009)
DicF	53	No reportado (gen críptico de profago)	Inhibición de la división celular (<i>ftsZ</i>)	(Bouche & Bouche, 1989, Faubladiet, <i>et al.</i> , 1990, Tetart & Bouche, 1992)
DsrA	87	Aumentado en bajas temperaturas	Activación de σ^S ; represión de <i>of hns</i> (<i>rpoS</i> , <i>hns</i>)	(Sledjeski & Gottesman, 1995, Sledjeski, <i>et al.</i> , 1996, Majdalani, <i>et al.</i> , 1998, Lease & Belfort, 2000)
FnrS	113	Inducido bajo condiciones anaeróbicas; Activado por FNR, ArcA y CRP	Represión de enzimas innecesarias (<i>sodB</i> , <i>maeA</i> , <i>gpmA</i> , <i>folE</i> , <i>folX</i>)	(Boysen, <i>et al.</i> , 2010, Durand & Storz, 2010)
GadY	105, 90, 59	Inducido en fase estacionaria; Regulado por σ^S	Activación de respuesta ácida (<i>gadX</i>)	(Opdyke, <i>et al.</i> , 2004, Tramonti, <i>et al.</i> , 2008)
GcvB	205	Inducido por altos niveles de glicina; Activado por GcvB	Represión de transporte de péptidos (<i>oppA</i> , <i>dppA</i> , <i>gltI</i> , <i>livK</i> , <i>livJ</i> , <i>argT</i> , <i>cycA</i> , <i>sstT</i>)	(Urbanowski, <i>et al.</i> , 2000, Sharma, <i>et al.</i> , 2007, Pulvermacher, <i>et al.</i> , 2009, Pulvermacher, <i>et al.</i> , 2009, Sharma, <i>et al.</i> , 2011)
GlmZ	207	Reprimido por alto nitrógeno; sRNA maduro GlmY bloquea su degradación	Inducción de GlcN-6-P sintasa (regulación descoordinada del operón <i>glmUS</i>)	(Kalamorz, <i>et al.</i> , 2007, Urban & Vogel, 2008, Reichenbach, <i>et al.</i> , 2009)
MicA	72	Estrés de membranas; Regulado por σ^E	Represión de síntesis de porina y PhoPQ (<i>ompA</i> , <i>ompX</i> , <i>phoP</i>)	(Rasmussen, <i>et al.</i> , 2005, Udekwi, <i>et al.</i> , 2005, Coornaert, <i>et al.</i> , 2010)
MicC	109	Incrementado por bajas temperaturas Reprimido por OmpR	Represión de síntesis de porina (<i>ompC</i> , <i>ompD</i>)	(Chen, <i>et al.</i> , 2004)
MicF	93	Inducido por alta osmolaridad; Activado por OmpR, SoxS, MarA	Represión de síntesis de porina (<i>ompF</i>)	(Andersen & Delihias, 1990, Coyer, <i>et al.</i> , 1990)
MicM/ ChiX	85	Reprimido por quitoazúcares; mRNA maduro <i>chbBCARFG</i> estimula su degradación	Represión de síntesis de quitoporina (<i>chiP</i>) (también <i>dpiBA</i>)	(Figueroa-Bossi, <i>et al.</i> , 2009, Overgaard, <i>et al.</i> , 2009);

Continuación Tabla I.1

sRNA	Longitud (nt)	Regulación	Respuesta fisiológica*	Referencias
MgrR	99	Inducido por bajo magnesio; Activado por PhoP	Represión de gen de modificación de LPS (<i>eptB, ygdQ</i>)	(Moon & Gottesman, 2009)
OmrA	88	Inducido por alta osmolaridad; Activado por OmpR	Represión de síntesis de proteína de membrana externa (<i>cirA, fecA, fepA, ompT, gntP, ompR</i>)	(Guillier & Gottesman, 2006, Guillier & Gottesman, 2008)
OmrB	82	Inducido por alta osmolaridad; Activado por OmpR	Represión de síntesis de proteína de membrana externa (<i>cirA, fecA, cirA, fecA, fepA, ompT, gntP, ompR</i>)	(Guillier & Gottesman, 2006, Guillier & Gottesman, 2008)
OxyS	109	Inducido por estrés oxidativo. Activado por OxyR	Represión de actividades innecesarias (<i>fhlA, yobF-cspC, ybaY wrbA, rpoS</i>)	(Altuvia, <i>et al.</i> , 1997, Altuvia, <i>et al.</i> , 1998)
RprA	105	Inducido por estrés de superficie; Activado por RcsB	Activación de σ^S (<i>rpoS</i>)	(Majdalani, <i>et al.</i> , 2001, Majdalani, <i>et al.</i> , 2002)
RseX	91	No reportado	Represión de síntesis de porina (<i>ompC, ompA</i>)	(Douchin, <i>et al.</i> , 2006)
RybB	80	Estrés de membranas Regulado por σ^E	Represión de síntesis de porina (<i>ompC, ompW</i>)	(Johansen, <i>et al.</i> , 2006, Papenfort, <i>et al.</i> , 2006, Thompson, <i>et al.</i> , 2007)
RydC	64	No reportado	Rpresión de transportador ABC (<i>vejABEF</i>)	(Antal, <i>et al.</i> , 2005)
RyhB	90	Inducido por hierro limitante; Reprimido por Fur	Ahorro de hierro (<i>sodB, sdhC, frdA, activa shiA</i>)	(Masse & Gottesman, 2002, Masse, <i>et al.</i> , 2005, Prevost, <i>et al.</i> , 2007)
SgrS	227	Inducido por glucosa-fosfato o análogos; Activado por SgrR	Protección contra estrés de glucosa-fosfato (<i>ptsG</i>)	(Vanderpool & Gottesman, 2004, Wadler & Vanderpool, 2007)
Spot42	109	Reprimido por baja glucosa; Reprimido por CRP	Represión de galactoquinasa bloquea degradación (regulación descoordinada de operón <i>galETKM</i>)	(Moller, <i>et al.</i> , 2002)

* Algunos de los genes blanco publicados para estos sRNAs son listados entre paréntesis. Tabla adaptada de (Gottesman & Storz, 2011)

En el marco de la introducción a esta clase de sRNAs, cabe hacer una mención especial sobre la proteína Hfq. Esta proteína es concebida actualmente como un componente central de la red post-transcripcional de regulación de la expresión genética en procariontes. Hfq está ampliamente distribuida en el árbol filogenético de las eubacterias, aunque su presencia no es ubicua, principalmente encontrándose ausente en microorganismos que han sufrido reducción en el tamaño de sus genomas luego de optar por formas de vida intracelulares obligadas (*Rickettsia*, *Chlamydia*, *Buchnera*), o por otras restricciones evolutivas aún desconocidas (Sobrero & Valverde, 2012).

El rol de Hfq en la fisiología bacteriana ha sido explorado en muchos modelos, desde patógenos humanos hasta simbiontes de plantas (Chao & Vogel, 2010, Sobrero & Valverde, 2011, Hess, *et al.*, 2014). En la mayoría de los casos, la mutación en el gen *hfq* produce un fenotipo pleiotrópico que compromete la aptitud biológica de la bacteria, la respuesta adaptativa frente a condiciones ambientales estresantes, o la virulencia en el caso de bacterias patógenas (Barra-Bily, *et al.*, 2010, Barra-Bily, *et al.*, 2010, Gao, *et al.*, 2010, Liu, *et al.*, 2010, Torres-Quesada, *et al.*, 2010, Sobrero & Valverde, 2011, Caswell, *et al.*, 2012, Wilms, *et al.*, 2012). Estos fenotipos que derivan de la mutación en *hfq* respaldan el rol global de esta proteína en la fisiología bacteriana. Su vínculo con la red riboregulatoria surge de la evidencia experimental acumulada que indica que Hfq actúa principalmente como una proteína de unión a ARN facilitando la interacción de sRNAs y mRNAs (Vogel & Luisi, 2011, Sobrero & Valverde, 2012). A pesar que muchos aspectos relativos a la función de Hfq han sido ya descubiertos, las características mecánicas fundamentales a nivel molecular permanecen aún poco claras.

Por último, la tercera clase de ARNs pequeños incluye reguladores que actúan a través de la interacción directa con proteínas modificando su actividad a través de mecanismos de mimica molecular y competición con otros blancos de ARN o ADN (Gottesman & Storz, 2011). Entre los ejemplos más extensamente estudiados se encuentra el anteriormente mencionado ARN 6S, el cual imita la estructura del complejo abierto de promotores de ADN e interactúa con la ARN polimerasa (Wassarman & Storz, 2000), y los ARNs pequeños Csr/RsmXYZ y CrcZ, los cuales poseen motivos secuenciales/estructurales que imitan el sitio de unión a ribosoma y compiten con un grupo de ARNs mensajeros por la unión a sus proteínas reguladoras negativas de la traducción CsrA/RsmAE y Crc, respectivamente (Marzi & Romby, 2012).

Otros tipos de ARNs regulatorios que regularmente son tratados de forma independiente, y sobre los cuales sólo se hará esta mención aquí, son los *riboswitches* - fragmentos de ARN con función regulatoria que forman parte de una molécula de ARN de mayor longitud y es sobre la cual ejercen la regulación- (Breaker, 2011), y los CRISPR RNAs (*Cluster regularly interspread short palindromic repetitions*) - que en conjunto con las proteínas Cas confieren respuesta inmune adaptativa contra elementos de ADN exógenos en determinadas bacterias y arqueas (Barrangou & Marraffini, 2014).

I.6 Riboregulación en rizobios.

La evidencia a favor de la presencia de eventos de riboregulación en rizobios surge más recientemente de lo que se ha descrito anteriormente para microorganismos procariotas en general, principalmente porque recién en la era post-genómica fue cuando se reconoció en los genomas de rizobios la presencia de genes de ARNs pequeños homólogos a los previamente estudiados en modelos de enterobacterias. Solo se había detectado previamente un gen cuyo transcripto no codificaba un polipéptido (varios años después reconocido como el tmRNA ampliamente conservado en procariotas), que fue reportado por Ebeling y colaboradores en el año 1991 (Ebeling, *et al.*, 1991) durante un estudio de mutagénesis generalizada basada en el uso del transposón Tn5 en el rizobio simbiótico de soja *B. japonicum*. En el caso del tmRNA y de otros ARNs pequeños extremadamente conservados en eubacterias, no se ha estudiado si su biología en los rizobios presenta diferencias respecto a la descrita en otros microorganismos.

Estudios seminales de búsqueda sistemática e identificación bioinformática de genes codificantes para sRNAs en el genoma microorganismo *S. meliloti*, llevados a cabo hace menos de una década, sentaron las bases para el comienzo de la investigación en riboregulación en esta especie, y en los rizobios en general. Diferentes algoritmos fueron utilizados para realizar las predicciones, aunque en términos generales todos basaron su fundamento principalmente en el reconocimiento de la presencia de promotores huérfanos co-localizados con terminadores Rho-independientes en regiones inter-ORF, habiendo entre ellos una distancia capaz de generar un transcripto de tamaño compatible con un sRNA. La conservación secuencial y de la estructura secundaria predicha para los posibles transcriptos fue considerado un factor positivo en términos de la validez de la predicción. De un número total de más de una centena de *loci* predichos como potenciales codificantes para sRNAs, sólo se logró validar en esa instancia la transcripción de sRNAs a partir de 22 de ellos mediante ensayos de *Northern blot* (del Val, *et al.*, 2007, Ulve, *et al.*, 2007, Valverde, *et al.*, 2008). Resultó de particular interés que los niveles intracelulares de estos transcriptos se mostraron variables con la aplicación de una serie de estreses abióticos, y en algunos casos, durante la interacción con la planta hospedadora (del Val, *et al.*, 2007, Ulve, *et al.*, 2007, Valverde, *et al.*, 2008).

A pesar de los esfuerzos para lograr la sistematización en la predicción y detección experimental de sRNAs en especies de rizobios, no fue hasta el advenimiento de las técnicas de secuenciamiento profundo de ARN que la caracterización del transcriptoma de los diferentes rizobios y otras especies de alfa-proteobacterias fue situada en un plano más complejo y de mayor resolución (Jimenez-Zurdo, *et al.*, 2013, Becker, *et al.*, 2014). A la fecha, cuatro trabajos utilizaron técnicas de secuenciación profunda de ARN con el objetivo particular de identificar sRNAs en los simbioses de leguminosas *S. meliloti* (Schluter, *et al.*, 2010), *R. etli* (Vercruysse, *et al.*, 2010), *B. japonicum* (Madhugiri, *et al.*, 2012), y en el patógeno de planta estrechamente relacionado *Agrobacterium tumefaciens* (Wilms, *et al.*, 2012). Poco se sabe aún acerca del repertorio de sRNAs que presentan otros miembros del orden Rizobiales.

I.7 Estructura del transcriptoma de *S. meliloti*. Elementos no codificantes. El sRNA Sm8.

En la Figura 7 se esquematiza la compleja estructura del RNoma de *S. meliloti* (Fig. 7).

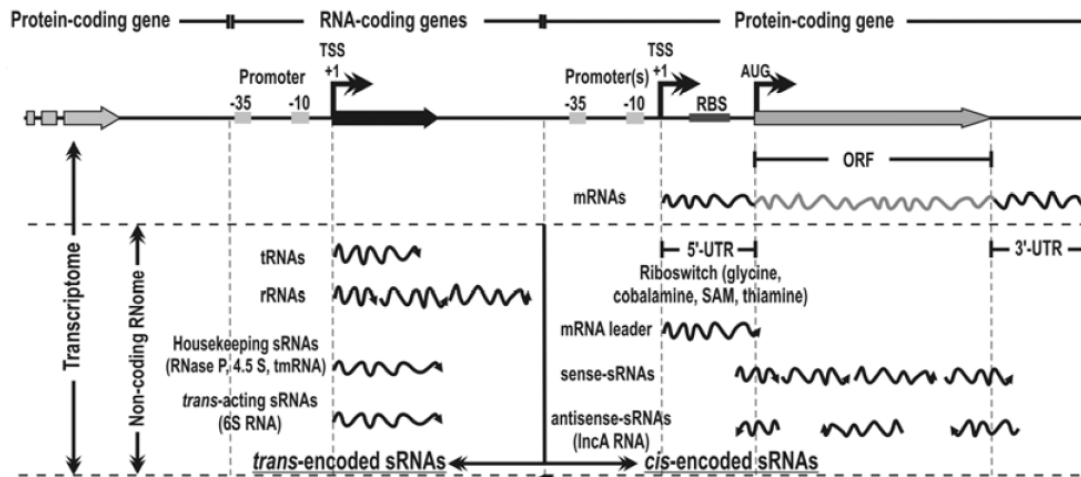


Figura 7. Estructura del RNoma de *S. meliloti*. Figura adaptada de (Jimenez-Zurdo, *et al.*, 2013).

Se expresan en *S. meliloti* y forman parte del RNoma, ARNs con funciones ya ampliamente conocidas (mRNAs, tRNAs y rRNAs) y un vasto número de ARNs pequeños no codificantes con posible actividad regulatoria pertenecientes a las tres clases mencionadas en I.5 (en Fig.7, *trans-acting* sRNAs, *Housekeeping* sRNAs, *sense*-sRNAs, *antisense*-sRNAs, mRNA leader) (Schluter, *et al.*, 2013). Es de esperarse adicionalmente que exista una heterogénea población de transcriptos maduros que se generen producto del procesamiento post-transcripcional de los ARNs primarios que son sintetizados.

En lo que respecta a la clase de ARNs pequeños codificados en *trans*, ha sido verificada por técnicas de secuenciación profunda la expresión de 440 transcriptos correspondientes a esta categoría, a partir de genes que se encuentran localizados a lo largo de todos los replicones del genoma (Schluter, *et al.*, 2013). La expresión de un grupo de ellos ya había sido comprobada experimentalmente por técnicas de hibridación (del Val, *et al.*, 2007, Ulve, *et al.*, 2007, Valverde, *et al.*, 2008, Schluter, *et al.*, 2010).

En este marco, la función biológica de la enorme mayoría de los sRNAs identificados en *S. meliloti* permanece aún desconocida. De hecho, sólo se han reportado resultados de la caracterización funcional de dos de ellos, AbcR1 y AbcR2 (Torres-Quesada, *et al.*, 2013, Torres-Quesada, *et al.*, 2014). Aún así, estos trabajos únicamente han mostrado evidencias sobre la capacidad de estos sRNAs de ejercer una interacción directa por apareamiento de bases con un grupo de mRNAs blanco (codificantes para proteínas de sistemas de transporte ABC) y de esta forma regular su tasa de traducción, sin haberse descrito aún fenotipos consecuentes a su mutación o sobreexpresión que puedan explicarse en base a las

evidencias moleculares. La relevancia biológica de la regulación ejercida por estos sRNAs requiere aún ser dilucidada. Por su parte, recientes avances han sido comunicados en relación al rol de un sRNA de *S. meliloti* que se encuentra involucrado en la regulación del ciclo celular (Robledo *et al.*, comunicación).

A lo largo de los últimos 8 años, se han colectado indicios a partir de estudios *in silico* y de carácter experimental que nos han permitido especular con una posible función regulatoria de cierto grupo de sRNAs de *S. meliloti*. Por un lado, disponemos actualmente de evidencias directas e indirectas de la interacción de un grupo de sRNAs con la proteína Hfq (Sobrero & Valverde, 2011, Torres-Quesada, *et al.*, 2014). Por otro lado, muchos de ellos presentan una elevada conservación a nivel secuencial y estructural (Reinkensmeier, *et al.*, 2011, del Val, *et al.*, 2012). Por último, se ha abordado el estudio del patrón de expresión de cierto grupo de sRNAs bajo determinadas condiciones de crecimiento de la bacteria, mostrando en muchos casos no ser constitutivo (del Val, *et al.*, 2007, Ulve, *et al.*, 2007, Valverde, *et al.*, 2008, Schluter, *et al.*, 2010).

sm8 codifica un transcripto homónimo pequeño, no traducido, de 77 nt de longitud (Ulve, *et al.*, 2007, Valverde, *et al.*, 2008, Schluter, *et al.*, 2010). La expresión del sRNA Sm8 (SmelC689 según la nomenclatura propuesta por (Schluter, *et al.*, 2010)) fue verificada experimentalmente mediante ensayos de *Northern blot* (Valverde, *et al.*, 2008) y a través del secuenciamiento profundo del transcriptoma de ARNs pequeños en *S. meliloti* 2011 (Schluter, *et al.*, 2010). Los niveles de expresión de *sm8* se han mostrado dependientes de las condiciones de crecimiento en vida libre, acumulándose en mayor medida durante el la fase estacionaria de crecimiento en medio de cultivo definido RDM (Valverde, *et al.*, 2008). Adicionalmente se han reportado cambios en la acumulación, aunque de menor grado que el descrito previamente, ante la presencia de determinados factores de estrés abióticos en el medio extracelular (Valverde, *et al.*, 2008). Por su parte, en ausencia de la proteína Hfq, la estabilidad del transcripto Sm8 y su tasa de transcripción se reduce considerablemente (Sobrero & Valverde, 2011). La secuenciación de los transcriptos que co-inmunoprecipitan con la proteína Hfq, reveló la interacción específica entre la proteína y el sRNA (Torres-Quesada, *et al.*, 2014). Durante la simbiosis con *M. truncatula*, se ha reportado la expresión de Sm8 en los bacteroides (Roux, *et al.*, 2014). En este marco, **el sRNA Sm8 representa un candidato de elevado interés para el estudio de su función biológica en *S. meliloti*.**

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La hipótesis general de este trabajo consiste en que los procesos regulatorios mediados por ARNs pequeños asumen una activa participación en el ajuste fino de la expresión de la información genética en rizobios, tanto en la fase de vida saprofítica, la simbiótica en la planta huésped, y su alternancia como parte del ciclo de vida de la bacteria.

En particular, el ARN pequeño Sm8 de *Sinorhizobium meliloti*, el cual se expresa en condiciones fisiológicas específicas y se encuentra altamente conservado entre especies de alfa-proteobacterias, poseería un rol relevante en la biología de *Sinorhizobium meliloti*.

OBJETIVO GENERAL

Caracterización de la función biológica del ARN pequeño Sm8 en la vida libre y simbiótica de *S. meliloti*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En el marco del objetivo general expuesto, en la presente Tesis Doctoral se establecen los siguientes objetivos específicos:

- > Caracterizar a través del uso de herramientas bioinformáticas los aspectos evolutivos del gen *sm8* en alfa-proteobacterias.
- > Generar cepas isogénicas a *S. meliloti* 2011 con concentraciones alteradas del sRNA Sm8.
- > Determinar y caracterizar fenotipos asociados a modificaciones en la actividad intracelular de Sm8 durante la vida libre de los rizobios.
- > Caracterizar con herramientas transcriptómicas y proteómicas el regulón del sRNA Sm8.
- > Explorar la relevancia simbiótica de la regulación mediada por Sm8.

CAPÍTULO 1

**Distribución filogenética e inferencias evolutivas
del gen *sm8***

1.1 Introducción

La primera mención bibliográfica que se vincula al gen *sm8*, en ese entonces en términos del elemento denominado *suhB*, data del año 2005 (Corbino, *et al.*, 2005). Si bien el estudio no se centró en el rizobio modelo *S. meliloti*, Corbino y colaboradores sugirieron por primera vez que el elemento *suhB*, hallado en genomas de un diverso grupo de alfa-proteobacterias (entre ellas *S. meliloti*), se trataría de un ARN pequeño no codificante cuya acción regulatoria no sería ejercida en *cis* sobre el gen homónimo localizado río arriba en el cromosoma sino sobre genes codificados fuera del propio locus a partir del cual el sRNA se transcribe. En lo que respecta a la molécula del posible transcripto del sRNA, describen la presencia de motivos secuenciales y estructurales conservados, sugiriendo que posiblemente tendrían implicancia funcional. El elemento *suhB* ha dado origen a la familia de ARNs que lleva el mismo nombre en la base de datos RFAM (Burge, *et al.*, 2013) (*suhB* RF00519). Desde su creación en el año 2005 hasta la fecha, el incremento del volumen de información secuencial derivado de la aceleración en la secuenciación de genomas bacterianos, ha permitido la incorporación de nuevas secuencias a esta familia.

En términos generales, una familia de ARN se define en términos prácticos en base a los métodos empleados para la búsqueda de genes homólogos y los criterios aplicados para la inferencia de homología (Reinkensmeier, *et al.*, 2011). El análisis detallado de los miembros constituyentes de la familia *suhB*, nos ha permitido detectar la inclusión de transcriptos que, posiblemente debido a una baja rigurosidad aplicada para la selección de homólogos, consideramos no reúnen condiciones, al menos en base a la información disponible, para ser considerados en una misma familia. En este sentido, consideramos que es necesaria la revisión de la clasificación y la aplicación de criterios adicionales que permitan refinar la agrupación y sentar las bases de una familia definida bajo parámetros más estrictos, los cuáles facilitarían la vinculación de los miembros de este grupo de sRNAs homólogos con sus propiedades funcionales y estructurales de una forma más fehaciente.

Dos trabajos han sido pioneros en la tarea de clasificación y definición de familias de genes que codifican sRNAs en *S. meliloti* (Reinkensmeier, *et al.*, 2011, del Val, *et al.*, 2012), los cuales se han focalizado particularmente en el estudio de diferentes grupos reducidos de genes. Sin embargo, ninguno de ellos ha tratado la evolución y filogenia del gen *sm8*. Por otro lado, han sido múltiples los trabajos que han aportado evidencias experimentales que validan la expresión del transcripto Sm8 en *S. meliloti*, así como de genes homólogos en otras especies de alfa-proteobacterias (Landt, *et al.*, 2008, Valverde, *et al.*, 2008, Schluter, *et al.*, 2010, Madhugiri, *et al.*, 2012).

En base a lo que hemos expuesto, llevaremos a cabo a cabo una caracterización detallada de los aspectos filogenéticos del gen *sm8*, buscando trazar con herramientas estadísticas la evolución del gen en términos de su secuencia, estructura y microsinténia.

Comprender de modo más acabado el origen y la evolución del gen y de su entorno nos permitirá contar con un marco de referencia valioso para la interpretación biológica de los resultados que se obtengan en el curso de este trabajo.

1.2 Materiales y Métodos

1.2.1 Secuencias de referencia

La secuencia del transcripto del gen *sm8* de *S. meliloti* 1021 se seleccionó como referencia para este estudio. Los extremos 5' y 3' de la secuencia correspondiente al transcripto Sm8 se fijaron en las posiciones 3.046.712 y 3.046.789, respectivamente, del cromosoma de *S. meliloti* 1021, de acuerdo al consenso de la información disponible a partir de (Schluter, *et al.*, 2013).

Adicionalmente, se obtuvieron la totalidad de las secuencias de los genomas completos de especies bacterianas disponibles en el sitio FTP del NCBI (ftp.ncbi.nlm.nih.gov) al mes de octubre de 2014. Las secuencias correspondientes a los genes de ARN ribosomal 16S de las especies de alfa-proteobacterias se descargaron del servidor Silva (Pruesse, *et al.*, 2007, Quast, *et al.*, 2013, Yilmaz, *et al.*, 2014).

1.2.2 Herramientas y métodos computacionales para la búsqueda de genes homólogos y construcción de la familia del sRNA Sm8.

A partir de la secuencia del transcripto Sm8 de *S. meliloti* 2011 se realizó una búsqueda inicial de secuencias homólogas en la base de datos de secuencias nucleotídicas no redundantes del GenBank a través del algoritmo de búsqueda BLASTN (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), empleando los parámetros establecidos por defecto. Se seleccionaron aquellas secuencias resultantes para las cuales existió evidencia estadísticamente significativa de homología con Sm8 (valor $E < 0.005$). Se realizó un alineamiento múltiple secuencial y estructural del grupo de secuencias homólogas halladas a través del uso del programa LocARNA (Smith, *et al.*, 2010), respetando los parámetros predeterminados, y se reiteró la búsqueda de homología secuencial y la selección de secuencias resultantes respetando el procedimiento inicial, pero utilizando como entrada la secuencia de 34 nucleótidos correspondiente al núcleo altamente conservado del gen Sm8 que se detectó en el alineamiento múltiple (5'-AAATACCCTCCTTGGGTGT TTCCTCCCTAGACTT-3', siendo 3046728-3046761 su posición genómica absoluta en el cromosoma de *S. meliloti* 1021). A partir del conjunto de secuencias homólogas reunidas en esta segunda ronda de búsqueda utilizando como entrada la región conservada descrita, se filtraron solo aquellas para las que se predijo la presencia de un promotor y un terminador flanqueantes a nivel genómico (más adelante en esta sección se detallan los métodos), y éstas se sometieron a un alineamiento múltiple secuencial con información de estructura secundaria a través de LocARNA (Smith, *et al.*, 2010). El alineamiento generado se utilizó para la construcción de un modelo de covarianza mediante el uso del software Infernal (Nawrocki & Eddy, 2013). Se utilizó el perfil de covarianza para llevar a cabo la búsqueda de secuencias homólogas en los genomas bacterianos. Se consideraron aquellas secuencias resultantes de la búsqueda cuyo valor $E < 10^{-4}$. Se repitió el procedimiento de generación del modelo de covarianza, búsqueda, e identificación de homólogos, incorporando luego de cada iteración las nuevas secuencias encontradas, hasta tanto se produjo un incremento relativo en el número de nuevos *hits* tras iteraciones consecutivas (Fig. 1).

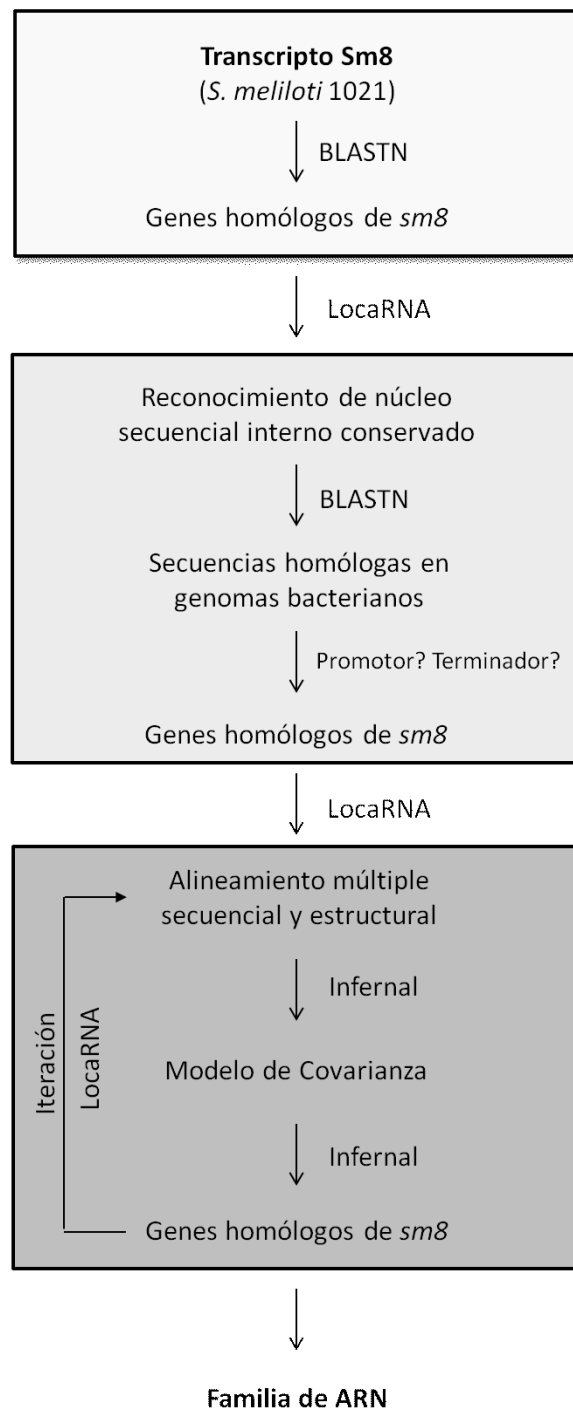


Figura 1. Esquema del procedimiento llevado a cabo para la búsqueda de genes homólogos y construcción de la familia del ARN Sm8.

La predicción de estructura secundaria consenso a partir de alineamiento secuencial múltiple de ARN se llevó a cabo utilizando el programa RNAalifold (Bernhart, *et al.*, 2008).

La predicción de la presencia de regiones promotoras de la transcripción en las secuencias de interés se llevó a cabo mediante el uso de la herramienta de redes neuronales disponible en el servidor en línea BDGP (Reese, 2001). La predicción de secuencias con potencial actividad como terminador del tipo *Rho*-independiente se realizó utilizando el programa en línea ARNold (Naville, *et al.*, 2011).

La caracterización de la microsintenia se realizó en conjunto a través del servidor en línea Microbial Genomic Context Viewer (Overmars, *et al.*, 2013) y del servidor SyntTax (Oberto, 2013). A través de estas herramientas, se determinó la identidad de los genes flanqueantes a las secuencias homólogas de *sm δ* en sus respectivos replicones.

1.2.3 Análisis filogenético de las especies de alfa-proteobacterias basado en la evolución de la secuencia del gen del ARN ribosomal 16S.

El análisis filogenético se llevó a cabo mediante el programa MEGA v6 (Tamura, *et al.*, 2013). Las secuencias correspondientes al gen del ARN ribosomal 16S de las especies de alfa-proteobacterias consideradas en este análisis se alinearon utilizando el algoritmo ClustalW2 (McWilliam, *et al.*, 2013). A partir del alineamiento múltiple generado se infirió el árbol filogenético mediante el método estadístico de *Maximum Likelihood*. Se utilizó el modelo de sustituciones nucleotídicas Tamura-Nei, y se consideró la presencia de posiciones invariantes en el alineamiento. El análisis de confianza se llevó a cabo a través del método de *bootstrapping* mediante la realización de 500 réplicas de la construcción del árbol filogenético. Las relaciones filogenéticas se resumen en un cladograma consenso, sólo considerando los nodos que obtuvieron una representatividad mayor al 50% ante el análisis de *bootstrap*.

1.3 Resultados y Discusión

1.3.1 Búsqueda inicial por homología secuencial de genes homólogos de *sm8* en bacterias.

La caracterización filogenética del gen *sm8* comenzó con la búsqueda de genes homólogos secuenciales en los genomas bacterianos. Esta aproximación permite establecer inicialmente con un alto grado de especificidad un núcleo definido de genes homólogos, que luego habilita a recurrir al uso de estrategias de mayor sensibilidad para el hallazgo de homólogos más remotos. Se realizó la búsqueda de secuencias homólogas a la correspondiente al transcripto Sm8 de *S. meliloti* a través del algoritmo BLASTN. Como se detalla en la sección Materiales y Métodos del presente Capítulo, los extremos 5' y 3' de la secuencia del transcripto Sm8 se consideraron en base al consenso de las fuentes de información de carácter experimental y bioinformática. A partir de los resultados obtenidos, se reunió un conjunto de 33 secuencias correspondientes a 16 especies (en un total de 32 genomas de diferentes cepas secuenciadas) pertenecientes a la familia *Rhizobiaceae* que presentaron un valor estadístico $E < 0,001$, altamente sugestivo de homología con Sm8. En 31 de un total de 32 genomas se detectó una única copia del gen, despertando gran interés el hecho que el 100% de los homólogos presentaron microsintenia, en contraposición a lo que había sido previamente anticipado por Corbino *et al* (Corbino, *et al.*, 2005) para el motivo secuencial-estructural *subB*. En el caso de *R. etli* CIAT 652 llamó particular atención la presencia de dos copias del núcleo conservado del gen, una de ellas correspondiente al gen propiamente dicho, separadas por un fragmento de ADN de aprox. 10 Mb que reúne características típicas de un elemento móvil. La segunda copia del núcleo conservado, posiblemente generada a partir del mecanismo de inserción dicho elemento, ha perdido la región promotora original.

En la Figura 2 se muestra el alineamiento múltiple secuencial de los genes homólogos de Sm8 identificados en *Rhizobiaceae*. El alineamiento fue realizado a través del programa LocARNA, el cual considera elementos de secuencia y estructura secundaria durante el tratamiento de las secuencias. Para evitar la redundancia visual, no se consideraron en el alineamiento secuencias idénticas correspondientes a cepas filogenéticamente muy cercanas y pertenecientes a una misma especie. Se reconoce a partir de este alineamiento, un núcleo secuencial interno de 28 nucleótidos de extensión completamente conservado. La elevada conservación a nivel secuencial que muestra esta región central del gen sugiere su posible implicancia en la función biológica, asunto que ésta estaría particularmente determinada por la secuencia. Esta hipótesis adquiere mayor firmeza si se contrasta el grado de divergencia secuencial que presentan el núcleo conservado y la región correspondiente al terminador *Rho*-independiente. Queda claro que la distancia evolutiva entre las especies en cuestión ha sido suficiente para permitir la pérdida de identidad secuencial dentro del gen, tal como se evidencia en el elemento terminador, cuya función se sabe está determinada a nivel estructural.

A

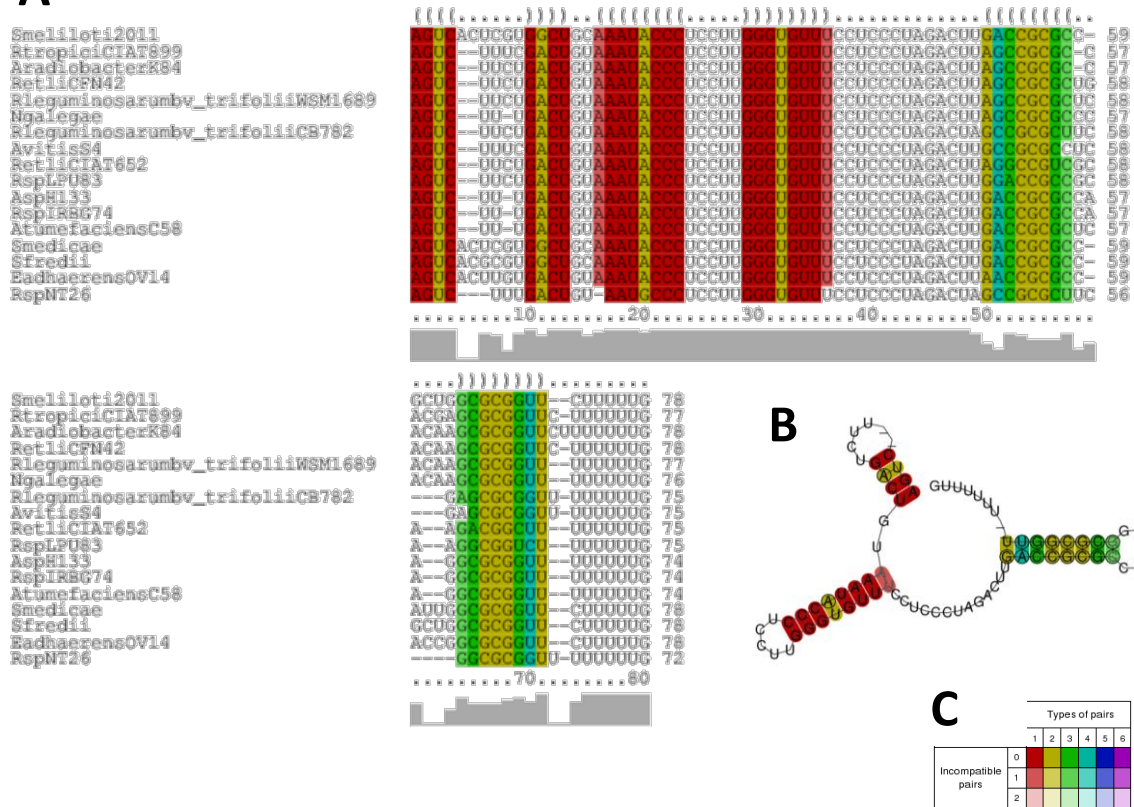


Figura 2. Alineamiento múltiple y estructura secundaria consenso predicha de los homólogos secuenciales de *sm8* en la familia *Rhizobiaceae*. (A) Alineamiento múltiple secuencial realizado por el programa LocARNA. El grado de conservación secuencial presente en cada columna del alineamiento se esquematiza debajo del alineamiento a través del gráfico de barras en color gris. (B) Estructura secundaria consenso predicha para el conjunto de homólogos de *sm8* en especies de la familia *Rhizobiaceae*. (C) El código de color que se usó corresponde al utilizado por el programa RNAalifold. Los diferentes colores indican el grado de degeneración secuencial presente en una determinada posición de apareamiento en la estructura consenso. El grado de transparencia aumenta con la proporción de secuencias que presentan pares no compatibles alineados en una determinada posición de apareamiento predicha en la estructura consenso.

El análisis de la estructura secundaria predicha muestra la presencia de 3 *stem-loops* conservados, siendo el último el que se ha mencionado con función predicha como terminador *Rho*-independiente (Fig. 2).

Considerando que la elevada variabilidad que presenta la secuencia de la región del terminador reduce la sensibilidad de la búsqueda de homólogos mediante el algoritmo BLASTN, decidimos reiterar la búsqueda de genes homólogos restringiendo la secuencia de entrada únicamente a la correspondiente al núcleo secuencial conservado de 28 nts (Fig. 1). Con el propósito de reducir la tasa de inclusión de resultados falsos positivos de la búsqueda como consecuencia del uso de una secuencia de menor extensión, mantuvimos un estricto criterio de filtro de los resultados, sólo aceptando como homólogas aquellas secuencias que se encontrasen situadas en regiones intergénicas y flanqueadas a nivel genómico por: 1) un promotor predicho por el servidor BDGP (Reese, 2001) en la región ubicada

inmediatamente río arriba a partir su extremo 5'. (se utilizó un *score* de corte para la detección de 0.55); 2) un elemento terminador del tipo *Rho*-independiente predicho mediante el servidor ARNold (Naville, *et al.*, 2011) localizado inmediatamente río abajo a partir del extremo 3' de la secuencia hallada.

Esta nueva búsqueda nos permitió extender notablemente la detección de genes homólogos de *sm8* a un total de 43 especies pertenecientes al orden de los Rhizobiales (76 genes homólogos distribuidos en 67 cepas con genomas secuenciados).

El análisis del alineamiento múltiple de este conjunto de secuencias reveló que el distanciamiento evolutivo de los homólogos conlleva un incremento de la variabilidad a nivel secuencial en la región correspondiente al primer *stem-loop* del transcripto, aunque preservando el elemento de estructura secundaria. Teniendo en cuenta la relevancia funcional que presta mayormente la estructura en este tipo de moléculas reguladoras de naturaleza ribonucleica, y asumiendo que en consecuencia pudiese la conservación estructural constituir una presión evolutiva de mayor jerarquía que la conservación secuencial, nos propusimos considerar posible la existencia de eventos de carácter evolutivo que impliquen la conservación del factor estructural sin que ésta se vea acompañada del mantenimiento de la identidad secuencial, con el propósito de extender la búsqueda y lograr la detección de genes homólogos a *sm8* más remotamente emparentados. Especulamos que esta estrategia permitiría ampliar la colección de homólogos detectados.

En este sentido, extendimos la búsqueda de homólogos más remotos de *sm8* utilizando como herramienta la construcción de modelos de covarianza (Reinkensmeier, *et al.*, 2011, del Val, *et al.*, 2012, Nawrocki & Eddy, 2013) (Fig. 1).

1.3.2 Extensión de la búsqueda de homólogos remotos a través de la implementación de modelos de covarianza.

Los modelos de covarianza (CM, del inglés *covariance models*) representan una herramienta estadística que se basa en la generación y uso de alineamientos secuenciales múltiples de ARNs con anotaciones estructurales para realizar búsquedas e identificación de genes homólogos en bases de datos nucleotídicas considerando el factor de conservación estructural (Nawrocki & Eddy, 2013). En este sentido, recurrimos a la implementación de un modelo de covarianza a través de la generación de un perfil conteniendo información de la conservación secuencial y estructural de los 76 genes homólogos correspondientes al núcleo inicialmente establecido.

Se utilizó el programa Infernal (Nawrocki & Eddy, 2013) para la creación de un perfil de covarianza a partir del alineamiento múltiple secuencial y estructural del conjunto de 76 secuencias homólogas. Se utilizó el perfil resultante para llevar a cabo una primera búsqueda de genes homólogos en la base de datos completa de genomas bacterianos del NCBI (según se detalla en Materiales y Métodos, Fig. 1). Se obtuvieron un total de 213

secuencias cuya homología con el perfil correspondiente al modelo de covarianza fue significativa (el criterio de corte estadístico usado fue un valor $E \leq 0.0001$). A modo de control positivo interno del procedimiento de búsqueda, se verificó que la totalidad de las secuencias pertenecientes al perfil inicial hayan sido detectadas como homólogas al perfil de covarianza. El número de secuencias nuevas halladas fue de 137, representando un 180% respecto a la cantidad de homólogos inicialmente encontrados por búsqueda de homología secuencial (Fig. 3). A continuación, se optimizó el modelo de covarianza incorporando en un nuevo alineamiento múltiple secuencial/estructural las nuevas secuencias encontradas, y se reiteró el procedimiento de búsqueda en la base de datos de genomas bacterianos, con el propósito de lograr una mayor sensibilidad en la detección y coleccionar genes más remotamente emparentados con *sm8*. Se realizaron 3 iteraciones de la búsqueda repitiendo en cada una de ellas el mismo procedimiento descrito. El límite en el número de iteraciones llevadas a cabo se estableció con el compromiso de maximizar la sensibilidad y la especificidad de la búsqueda, es decir, lograr la detección de nuevas secuencias homólogas remotas y evitar la consideración en aumento de resultados falsos positivos. En este sentido, decidimos suspender las iteraciones y concluir la búsqueda cuando el número de nuevas secuencias halladas tras una iteración fue superior al valor correspondiente luego de haber realizado la iteración previa. La colección de homólogos de *sm8* identificados bajo las condiciones aquí descritas incluyó un total de 243 genes presentes en 70 especies (95 cepas secuenciadas) (Fig. 3).

En la Figura 3 se describe esquemáticamente la evolución del número de secuencias homólogas halladas ante el avance en la ejecución del algoritmo de búsqueda que ha sido descrito (Fig. 1). El mayor incremento del número de secuencias homólogas totales coleccionadas se produjo luego de realizar la primera iteración utilizando el modelo de covarianza. Sin embargo, el número de especies en las que éstas se encuentran distribuidas no aumentó en tal magnitud. Este hecho indica que el marcado incremento de secuencias homólogas encontradas a través del uso del modelo de covarianza fue principalmente a expensas del reconocimiento de nuevas copias del gen en los mismos genomas donde éste fue inicialmente detectado.

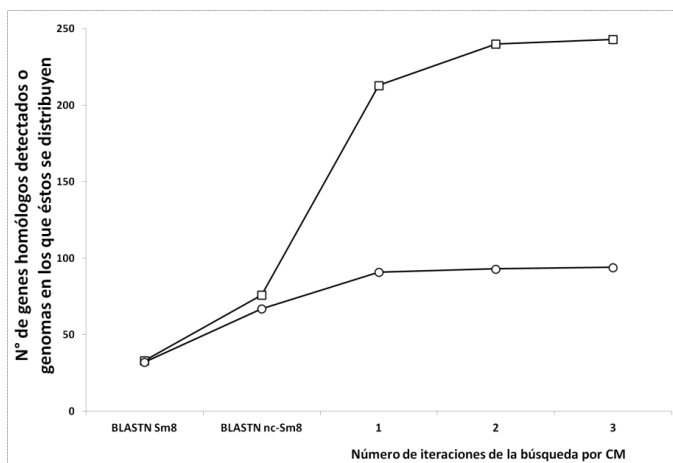


Figura 3. Evolución del número de secuencias detectadas (—□—), y del número de genomas de diferentes cepas en las cuales las secuencias encontradas se distribuyen (—○—), ante el progreso en la ejecución del algoritmo de búsqueda esquematizado en la Figura 1. nc: núcleo conservado.

La estrategia de búsqueda por CM permitió, sin hacer las consideraciones que posteriormente se discutirán, extender la detección de homólogos de *sm8* a 32 nuevas especies de alfa-proteobacterias pertenecientes a los géneros *Acidiphilium*, *Asticcaculis*, *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Bradyrhizobium*, *Brevundimonas*, *Caulobacter*, *Chelatovirans*, *Gluconacetobacter*, *Granulibacter*, *Hyphomonas*, *Magnetospirillum*, *Methylobacterium*, *Methylocystis*, *Ochrobactrum*, *Parvibaculum*, *Parvularcula*, *Phenylobacterium*, *Pseudovibrio*, *Rhodospirillum* y *Tistrella*. De esta forma, la presencia de *sm8* no se encuentra limitada al orden de los Rizobiales, sino que se halla en la mayor parte de los órdenes pertenecientes a la clase de las alfa-proteobacterias, a excepción de los Rickettsiales.

El conjunto de genes homólogos que hemos hallado constituye una nueva familia de ARN que hemos denominado $\alpha 8$. En la Figura 4 se muestra la distribución filogenética de la totalidad de los miembros de esta familia sobre el árbol evolutivo de las alfa-proteobacterias. Cuando corresponde, se indica de forma esquemática la ocurrencia de múltiples copias de miembros de la familia en los genomas.

1.3.3 Análisis de microsintenia de los genes homólogos de *sm8*. Nueva subfamilia de ARNs $\alpha 8s1$.

En principio, ante el hallazgo de un gen homólogo, es difícil realizar la correcta discriminación entre su condición de ortólogo o parólogo, es decir, si evolutivamente se halla vinculado uno con el otro a través de un proceso de especiación o de un proceso de duplicación génica, respectivamente. Los eventos que conducen a la generación de parálogos constituyen un mecanismo importante de microevolución y divergencia funcional. Es importante tener presente tal distinción, puesto que resulta más factible encontrar asociada conservación funcional entre genes ortólogos que entre genes parálogos, al menos en el marco de la distancia evolutiva que abarca a las alfa-proteobacterias (Koonin, 2005).

En este trabajo hemos implementado un criterio basado en la presencia de microsintenia para la clasificación y el trazado evolutivo de los genes ortólogos de *sm8*. Realizamos un detallado análisis de las regiones flanqueantes a cada una de las secuencias homólogas colectadas durante la búsqueda por CM, el cual nos permitió hallar un fuerte vínculo físico entre un grupo de estas secuencias y homólogos del gen *SMc04043* de *S. meliloti* 1021 (ubicado en la cadena complementaria inmediatamente río abajo a *sm8* en el cromosoma de esta bacteria), el cual codifica para una enzima con posible actividad N-formilglutamato amidohidrolasa (NFGAH). A partir de este hallazgo, se filtró el conjunto total de secuencias homólogas colectadas al finalizar la búsqueda, estableciendo un subconjunto correspondiente sólo a aquellas que mantuvieran la relación microsinténica descrita. Si bien este filtro puede *a priori* derivar en la introducción de un elevado número de falsos negativos, nos aseguró la inclusión exclusiva de secuencias ortólogas en tal categoría.

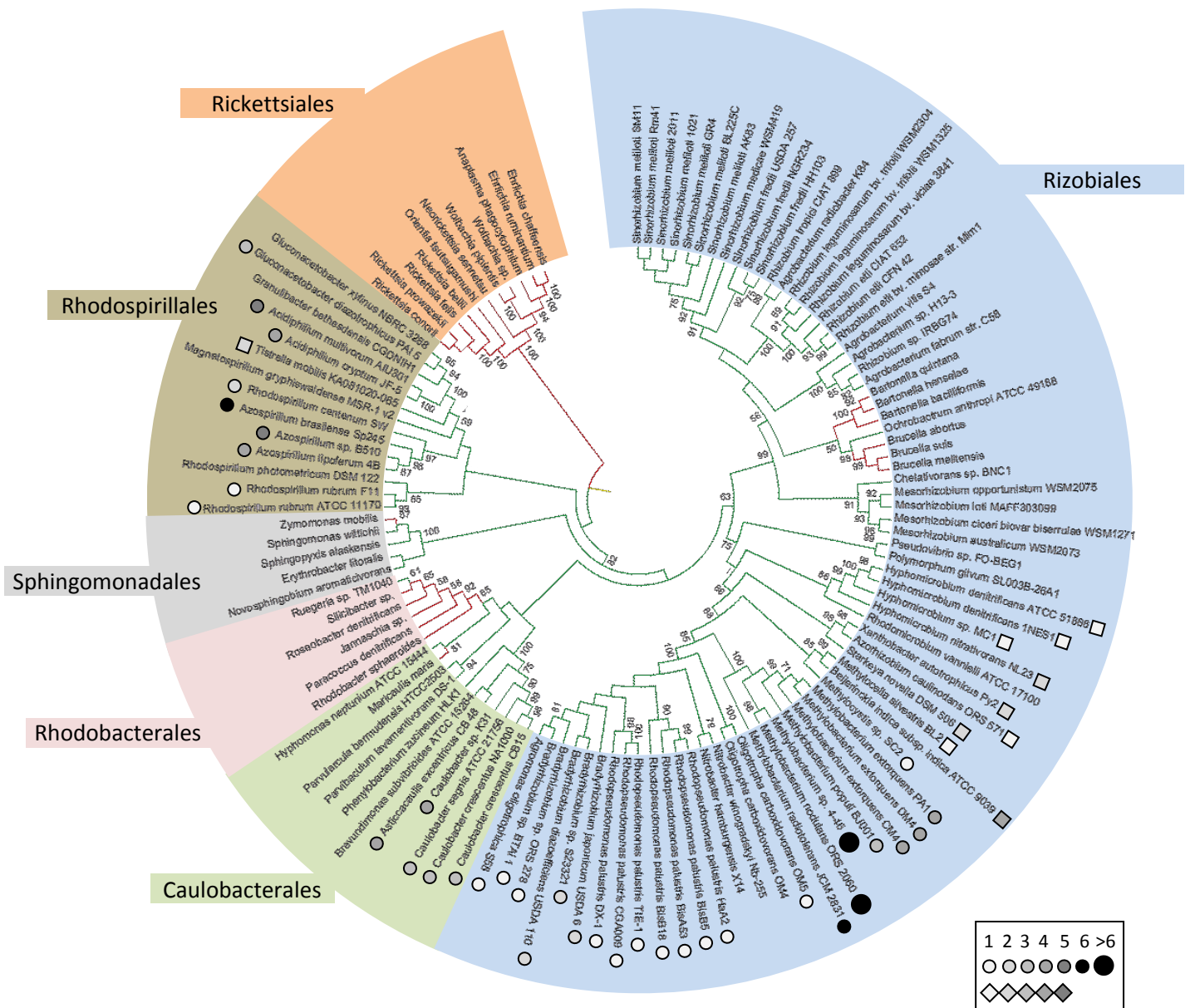


Figura 4. Distribución de los miembros de la familia *or8* en las alfa-proteobacterias. Los detalles acerca de la construcción del árbol filogenético se detallan en la figura 4. Las líneas rojas indican ausencia de genes homólogos a *sm8*. Las líneas verdes indican la presencia de secuencias homólogas a *sm8*. La línea amarilla indica desconocimiento acerca de la presencia transitoria de homólogos de *sm8* en ancestros más remotos. Los cuadrados y círculos colocados inmediatamente luego de los nombres específicos indican la presencia de múltiples copias del gen en la misma región intergénica o en diversos locus genómicos, respectivamente, de la especie correspondiente. El número de copias se indica a través de la graduación del color de los círculos o cuadrados, según establece la leyenda adjunta.

Teniendo en cuenta la relevancia que este vínculo físico hallado entre *sm8* y el homólogo de la NFGAH aporta en cuanto a la posibilidad de realizar el trazado evolutivo de los ortólogos del gen del ARN pequeño, exploramos el grupo de secuencias resultantes de la tercera iteración de búsqueda con el CM que mostraron valor E ligeramente superior al valor de corte aceptado, con el propósito de considerar posibles ortólogos según el criterio de microsintenia que hayan sufrido mayor divergencia secuencial/estructural y por tanto escapado a la detección inicial. De esta forma, encontramos un grupo nuevo de candidatos presentes en especies de los géneros *Novosphingobium*, *Erytrobacter*, *Sphingopyxis* y *Sphingomonas*, pertenecientes todos al orden de los Sphingomonadales. Si bien *a priori* las secuencias correspondientes no presentaron valor estadístico significativo en la búsqueda, consideramos apropiado incorporar al análisis a este grupo de posibles genes homólogos de *sm8* dada la microsintenia que presentó en los genomas respectivos. La posición genómica relativa al gen que codifica para la NFGAH confirma su carácter de ortólogos de *sm8*, es decir su proveniencia de un ancestro común y diversificación debida a un evento de especiación.

En línea con los resultados que se han presentado, proponemos la definición de una nueva subfamilia de ARNs denominada $\alpha 8s1$ (en base a la nomenclatura recientemente propuesta para las familias de ARNs en alfa-proteobacterias) (del Val, *et al.*, 2012) que integra el conjunto de genes ortólogos del gen *sm8* de *S. meliloti* metodológicamente clasificados en base a que se hayan vinculados entre sí por presentar microsintenia con el gen que codifica para la enzima NFGAH.

En la Figura 5 se ilustra la distribución filogenética de los genes pertenecientes a la subfamilia $\alpha 8s1$. Las relaciones evolutivas entre las alfa-proteobacterias se infirieron a partir del análisis de la evolución de las secuencias del gen del ARN ribosomal 16S de las especies en cuestión, según se describe en detalle en la sección de Materiales y Métodos del presente Capítulo. La estructura del árbol que hemos construido presenta una excelente correlación con la correspondiente del árbol previamente construido a través del análisis filogenético de la concatenación de alineamientos de más de 100 familias de proteínas de alfa-proteobacterias (Williams, *et al.*, 2007).

Los resultados obtenidos permiten inferir que la primera aparición del gen *sm8* ocurrió en el ancestro común que inmediatamente diverge de la rama de los Rickettsiales en las alfa-proteobacterias. Si bien no es posible descartar que el gen haya surgido más tempranamente, con certeza es esta rama la única en la cual el gen persistió hasta las especies actuales. En este sentido, las especies correspondientes al orden de los Rickettsiales han sufrido eventos de reducción genómica producto de su adaptación a la vida intracelular obligada (Sallstrom & Andersson, 2005), y la consiguiente desaparición de la o las presiones de selección para conservar el gen *sm8*.

En lo que respecta a las ramas descendientes del primer ancestro común donde se habría originado *sm8*, el gen se halla ampliamente distribuido y conserva la microsintenia con ortólogos del gen *SMc04043* de *S. meliloti* en el 92% de los genomas en los que al

menos se ha detectado un homólogo. Siguiendo el linaje derivado del ancestro en el cual se infiere el origen de *sm8*, hemos detectado la ausencia del gen en un limitado grupo de géneros bacterianos. Si bien no es posible saber con certeza las razones biológicas que justifican la desaparición del gen en estas especies, el análisis de cada caso particular nos permite especular que se trataría de causas diversas.

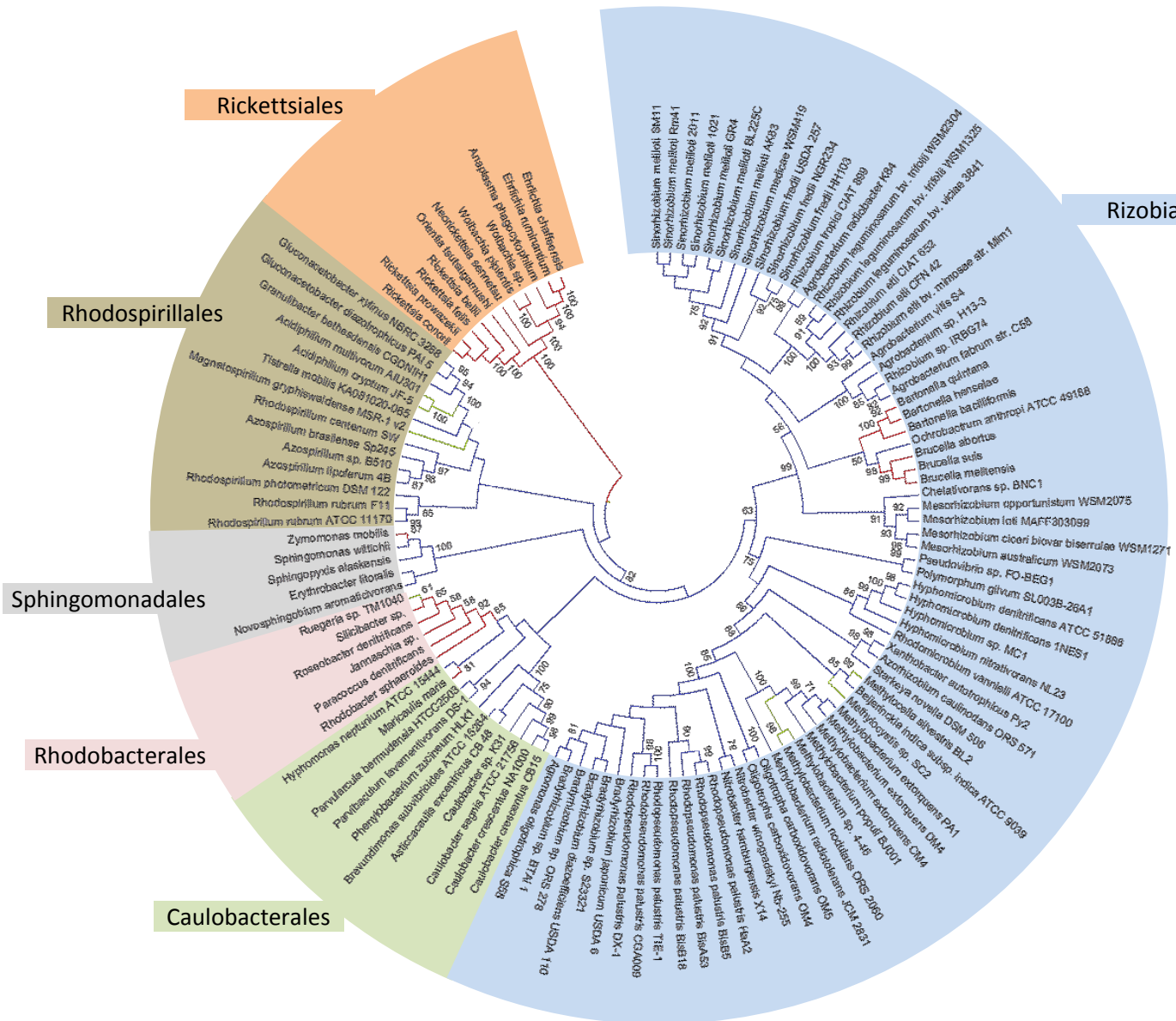


Figura 5. Distribución filogenética de los miembros de la subfamilia *α8s1*. Las relaciones filogenéticas entre las especies de alfa-proteobacterias se infirieron a partir del análisis evolutivo mediante el método de *Maximum Likelihood* de la secuencia del gen de ARN ribosomal 16S. Se esquematiza el cladograma consenso obtenido a partir de la realización de 500 réplicas de *bootstrap*, colapsando los nodos que obtuvieron una representación menor al 50%. Aquellos nodos que obtuvieron una mayor representación en las réplicas de los árboles se muestran en el cladograma con el valor del porcentaje de representatividad correspondiente. Las líneas rojas corresponden a ramas en las que no se detectaron homólogos de *sm8*. Las líneas azules indican la presencia de al menos un miembro de *α8*. Las líneas verdes indican presencia de secuencia/s homóloga/s a *sm8* sin relación de microsintenia con el gen homólogo de *SMc04043* de *S. meliloti* 1021.

Por un lado, se detectaron casos en los que producto de rearrreglos genómicos en el locus correspondiente a la NFGAH se ha perdido el gen *sm8*. Como ejemplo puede citarse lo ocurrido en el genoma la especie *Miracaulis maris*, perteneciente al orden de los Caulobacterales y filogenéticamente muy cercana a *Hyphomonas neptunium*, especie que aún conserva el gen (Fig. 6).

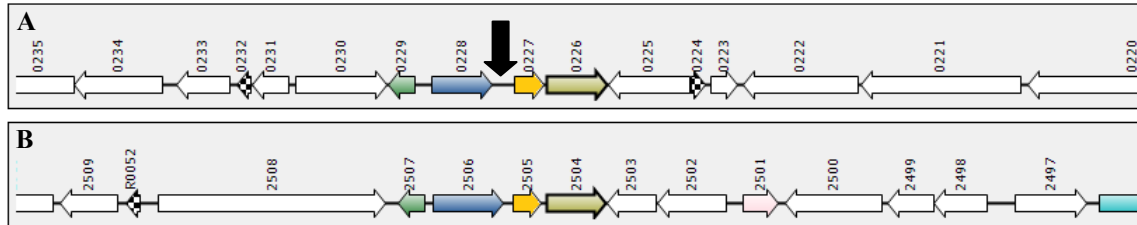


Figura 6. Esquema del locus correspondiente al gen homólogo a la NFGAH en los genomas de *Hyphomonas neptunium* (A) y *Miracaulis maris* (B). Los genes homólogos se esquematizan del mismo color en ambos genomas. El gen que codifica para la enzima NFGAH se colorea en azul. Con una flecha negra se indica la región intergénica donde se ubica el homólogo de *sm8* en el genoma de *H. neptunium*. Los números hacen referencia a la numeración correspondiente a los *locus tag* de NCBI.

Por otro lado, hemos hallado especies en los que la pérdida del gen *sm8* se ha visto acompañada por una reducción significativa del tamaño de sus genomas con la concomitante pérdida del locus homólogo de la NFGAH. En este grupo ubicamos como ejemplo a *Zymomonas mobilis*, último eslabón evolutivo del orden de los Sphingomonadales. Su genoma ha sufrido una reducción en su tamaño cercana al 65% respecto al tamaño del genoma de *Sphingomonas wittichii*, especie más cercana en la que aún se halla presente un ortólogo de *sm8*.

Por su parte, y debido a la cercanía evolutiva que presentan con *S. meliloti*, merece particular atención la ausencia del gen *sm8* en especies de los géneros *Brucella* y *Bartonella*. Estas especies han desviado el camino evolutivo respecto del que han seguido los rizobios, conquistando nuevos nichos de vida y estableciéndose como patógenos en organismos animales. Para ello, han adoptado factores de virulencia y desarrollado la capacidad de sobrevivir de forma facultativa intracelularmente en células animales. Esta última característica ha sido propuesta extensamente en la bibliografía como factor causal de la reducción genómica que los miembros de estos géneros han sufrido (Batut, *et al.*, 2004, Sallstrom & Andersson, 2005). Sin embargo, se ha propuesto la existencia de eventos exclusivos de reducción genómica en ambos géneros, principalmente en las especies de *Bartonella* (Boussau, *et al.*, 2004). Por su parte, *Ochrobactrum antrophi*, microorganismo que habita principalmente la rizósfera y al cual se lo ha descrito como patógeno animal oportunista, presenta cercanía filogenética con las bacterias del género *Brucella* y posee un genoma un 45% más extenso que ésta. Esta diferencia se ha atribuido a la adquisición de islas genómicas por parte de *O. antrophi*, conjuntamente con la pérdida de contenido genético

a la que se hizo alusión previamente que ha sufrido *Brucella* (Chain, *et al.*, 2011). En este marco y en lo que respecta a la ausencia del ortólogo de *sm8* en las especies de *Brucella* y *Bartonella*, esta última ha perdido por completo el locus ortólogo del gen del sRNA pequeño. Por el contrario, *Brucella* representa un caso particularmente interesante ya que conserva la integridad del locus en cuestión pese a que el gen que codifica para el ARN pequeño ha desaparecido del mismo, posiblemente debido a la reducción cercana al 50% que ha sufrido en la longitud de la región intergénica homóloga respecto a la longitud que presenta la región en *O. anthropi*. Por el contrario, *O. anthropi* conserva el gen homólogo de *sm8* en el locus correspondiente.

El caso extremo en relación a lo que ha ocurrido en los miembros del género *Brucella* respecto a *Ochrobactrum* es de singular relevancia y sugiere que la(s) función(es) del gen *sm8* se encontrarían vinculadas a procesos biológicos/celulares que se han perdido, o cuya regulación ha dejado de ser relevante como consecuencia de la divergencia en los estilos de vida que ha ocurrido entre especies de estos géneros. Cabe resaltar aquí que las bacterias del género *Brucella* cuentan con un gen homólogo codificante para la proteína Hfq, funcionalmente caracterizado en la especie *Brucella abortus*, lo cual sugiere que no habrían perdido el soporte para el funcionamiento de las redes riboregulatorias que de esta proteína dependen (Robertson & Roop, 1999). Es posible que existan factores vinculados a la adaptación de estas especies a su entorno particular, que hayan derivado en la pérdida de la presión de selección que en otros casos mantiene presente el gen.

En conjunto, contemplando la diversidad en los estilos de vida y la distancia evolutiva que abarca la clase de las alfa-proteobacterias, la amplia distribución y elevada conservación a nivel de secuencia y estructura del gen *sm8* en este conjunto de especies sugiere un rol posiblemente ligado a la regulación de ciertos procesos centrales del metabolismo microbiano, regulación que resultaría prescindible en ciertas especies por razones que permanecen aún desconocidas y posiblemente podrán ser comprendidas a partir de la caracterización del rol biológico del ARN pequeño que este gen codifica.

1.3.4 Caracterización secuencial y estructural de los miembros de la subfamilia $\alpha 8s1$.

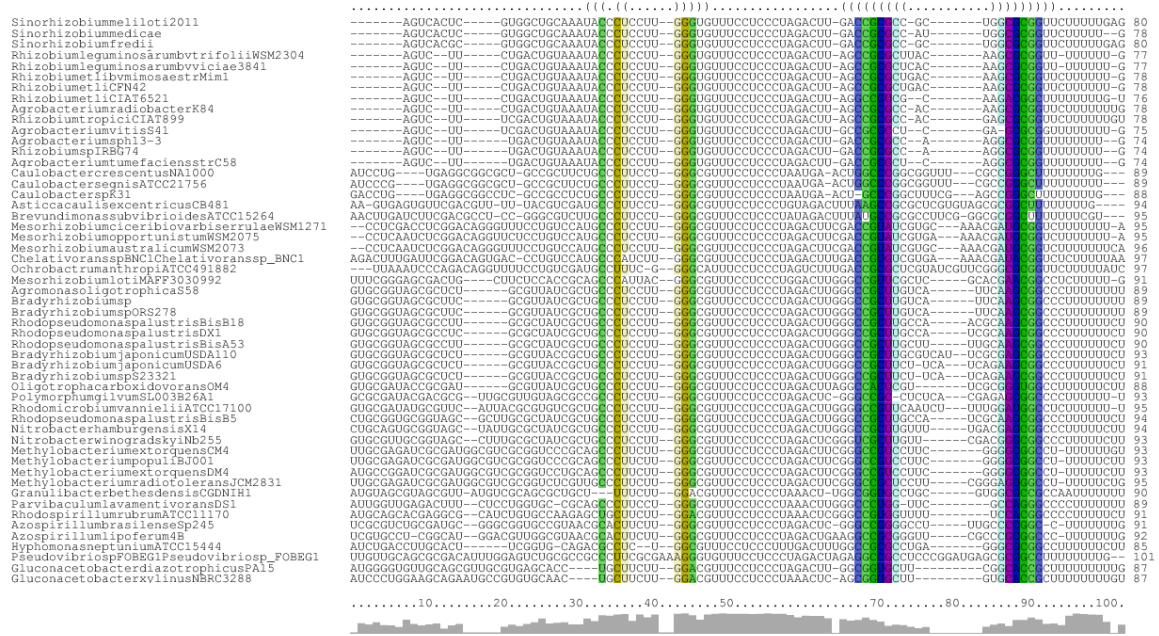
En la Figura 7 se presenta el alineamiento secuencial múltiple de los miembros representantes de la subfamilia $\alpha 8s1$, realizado mediante el programa LocARNA. Nuevamente, y por razones de simplificación, no se consideraron en el alineamiento secuencias idénticas correspondientes a cepas filogenéticamente muy cercanas y pertenecientes a una misma especie. Por su parte, dado que en los genomas de las especies pertenecientes a los géneros *Tistrella*, *Beijerinckia*, *Hypomicrobium*, *Methylocella* y *Xhantobacter* se detectaron eventos de duplicación génica que derivaron en la presencia de múltiples copias de los motivos homólogos a *sm8* situados en la misma región intergénica, nos vimos imposibilitados de asignar con certeza la calidad de ortólogo o parólogo a cada copia. Por este motivo no se incluyeron sus secuencias en el alineamiento secuencial y

estructural. La posibilidad de que ciertas copias del gen hayan adquirido el carácter de parálogos o *pseudogenes*, podría estar acompañado de modificaciones de la tasa de sustitución nucleotídica debido a la diferencia o carencia de función génica.

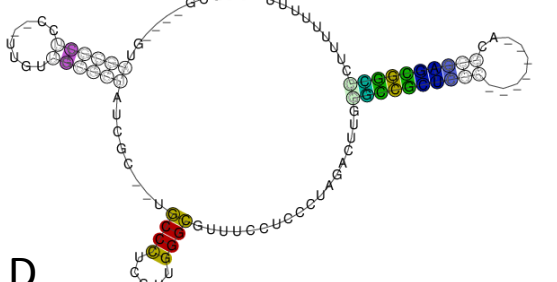
En línea con lo anteriormente descrito durante el análisis acotado al grupo de homólogos correspondientes a los Rhizobiales, los miembros de la subfamilia $\alpha 8s1$ mantienen un núcleo interno secuencial de 10 nucleótidos de extensión (5'-UUUCCUCCCU-3') completamente conservado. El hecho que la estructura secundaria predicha indique que el núcleo conservado se mantiene en forma de cadena simple no plegada, sumado a que su secuencia presente rasgos típicos de complementariedad al sitio de unión a ribosoma (RBS, *Ribosome Binding Site*), sugieren su posible función como participe de interacciones de apareamiento de bases entre moléculas de ARN, mecanismo canónico de acción de esta clase de sRNAs (Storz, *et al.*, 2011). Es posible especular que la secuencia ubicada inmediatamente río arriba, la cual se plegaría conformando la estructura del segundo *stem-loop* -cuya estabilidad no parece ser tan elevada-, determine la especificidad de la interacción con uno (o múltiples) ARN blanco. Obedeciendo a este modelo, el factor común de las interacciones sería la unión mRNA-sRNA del tipo RBS-antiRBS, actuando como semilla de la interacción (Papenfort, *et al.*, 2010). Considerando la elevada conservación de la región del ARN ribosomal 16S que interacciona con ARN mensajero, esto representaría una fuerte presión para mantener invariante la secuencia del núcleo conservado. Por el contrario, la región que aportaría la especificidad a la(s) interacción(es) podría verse sujeta a mutaciones compensadas entre el sRNA y el mRNA, sin comprometer otros fenómenos moleculares. La estructura modular propuesta permitiría explicar la diferencia en la tasa de sustituciones que se observa entre la región 5' y el núcleo conservado de los ortólogos.

Se dio tratamiento diferencial a los miembros de la subfamilia $\alpha 8s1$ pertenecientes al orden de los Sphingomonadales dado que mostraron una mayor variabilidad secuencial en la proximidad del núcleo conservado. Es posible que debido a este hecho, las secuencias correspondientes hayan obtenido valores estadísticos levemente superiores al valor de corte utilizado en la búsqueda de homólogos realizada. De todos modos, se halla presente y altamente conservada la secuencia 5'-UCCUCCCU-3', enmarcada entre una estructura de *stemloop* y el terminador *Rho*-independiente, rasgos característicos del conjunto de ortólogos de la subfamilia (Fig. 8). Es posible especular que la mayor divergencia secuencial que presenta el gen en este clado filogenético respecto al resto de los clados represente una adaptación a cambios primarios en los elementos regulados que hayan tenido lugar en este linaje particular, con el propósito de mantener la regulación.

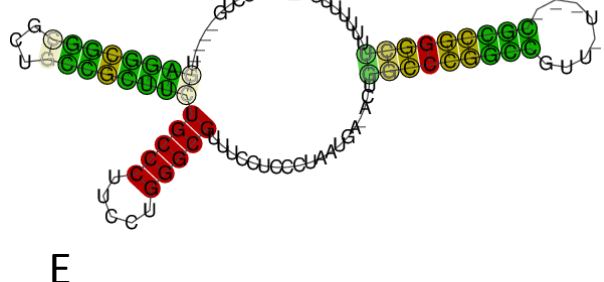
A



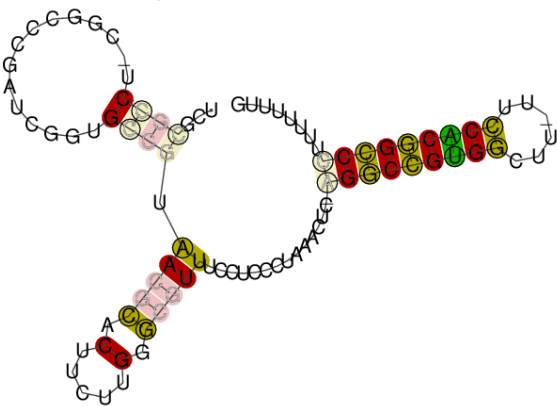
B



C



D



E

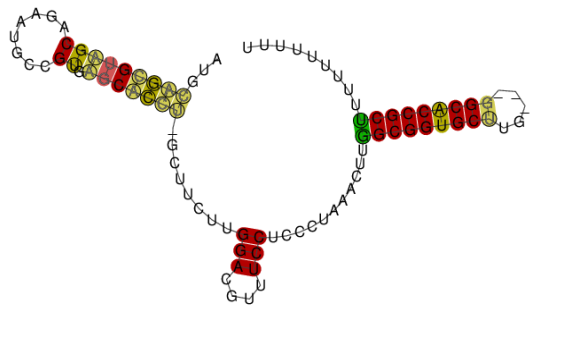


Figura 7. Alineamiento secuencial y estructura secundaria consenso de ortólogos de *sm8* en alfa-proteobacterias. (A) Alineamiento múltiple secuencial realizado por el programa LocARNA. El grado de conservación secuencial en cada columna del alineamiento se esquematiza debajo del alineamiento a través del gráfico de barras en color gris. En (B), (C), (D) y (E) se ilustran las estructuras secundarias consenso predichas para el conjunto de homólogos de *sm8* correspondientes a especies de los órdenes Rhizobiales, Caulobacterales, y las familias *Rhodospirillaceae* y *Acetobacteraceae* del orden Rhodospirillales, respectivamente. El código de color se describió previamente en la leyenda de la Figura 2.

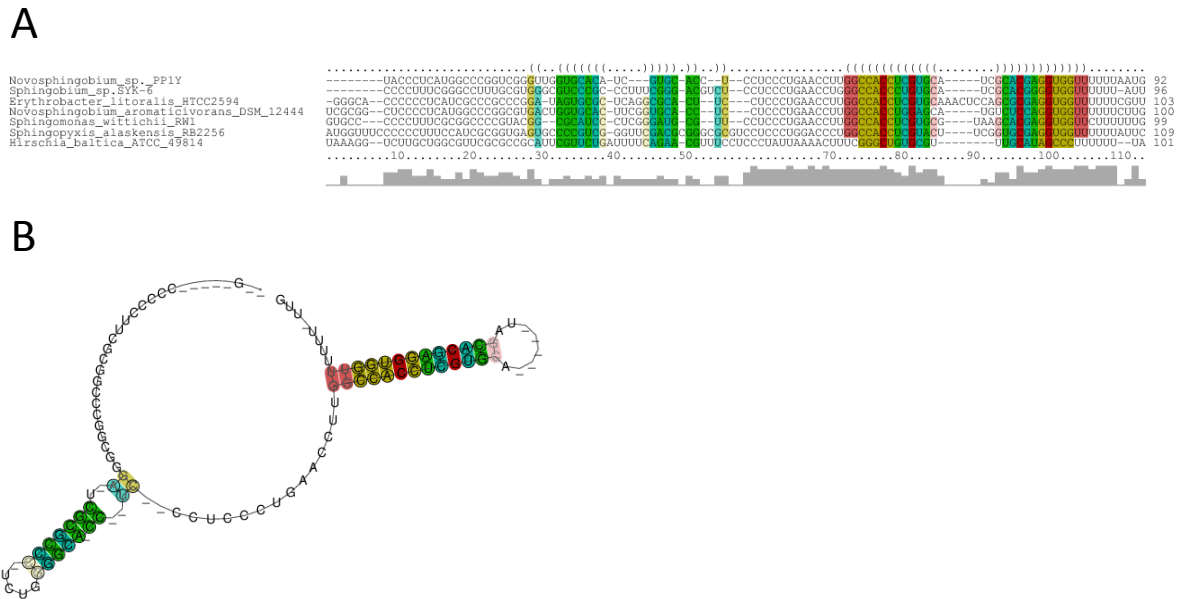


Figura 8. Alineamiento secuencial y estructura secundaria consenso de ortólogos de *sm8* en el orden de los Sphingomonadales (A) Alineamiento múltiple secuencial realizado por el programa LocARNA. El grado de conservación secuencial en cada columna del alineamiento se esquematiza debajo del alineamiento a través del gráfico de barras en color gris. En (B) se ilustra la estructura secundaria consenso predicha para el conjunto de homólogos alineados en (A). El esquema de colores se describe oportunamente en la figura 2.

1.3.5 Reorganización genómica, duplicación génica y diversificación. Arquitectura de la familia de ARNs *ar8*.

Según lo que surge del análisis global realizado a partir de las secuencias homólogas de *sm8* que han sido halladas, la complejidad de la distribución filogenética de este gen excede los límites de la subfamilia *ar8s1*. Eventos de reorganización genómica y duplicación génica que han tenido lugar en los genomas de ciertas especies han contribuido a la diversificación del gen (Fig. 4).

El contraste llevado a cabo entre la estructura del árbol evolutivo de las alfa-proteobacterias y la distribución de los genes ortólogos de *sm8* agrupados en la subfamilia *ar8s1*, permitió trazar su eje evolutivo a nivel interespecífico y paralelamente concebir a los miembros que no presentaron microsintenia con ortólogos del gen codificante para la enzima NFGAH, como variantes del linaje que han surgido en los últimos eslabones de la evolución y que, en algunos casos, presentan microsintenia acotada a un conjunto cepas de una misma especie o, de diversas especies de un mismo género (por ej., en *Caulobacter*; resultados no mostrados).

A pesar de no ser posible asegurar *a priori* que los miembros ortólogos de la subfamilia *ar8s1* conservan la(s) misma(s) función(es), ni si aquellos posibles ortólogos no microsinténicos o parálogos también la preservan, todos conservan un conjunto de rasgos

secuenciales y estructurales en común y es estadísticamente significativa la homología que hemos inferido entre ellos.

Únicamente en los genomas de las especies de los géneros *Ruegeria*, *Methylocella* y *Magnetospirillum* se observa que ha variado la posición de la única copia homóloga del gen *sm8*, respecto a la localización microsinténica en la que hemos descrito que se ubica en los genomas de bacterias relacionadas (Figs. 4 y 5).

En el clado de los Rhodobacterales, la búsqueda llevada a cabo mediante el uso de CM ha permitido la detección de un gen homólogo de *sm8* únicamente en el genoma de *Ruegeria sp.* El análisis de los loci homólogos al cual se encuentra el miembro de $\alpha 8$ en esta última especie, en los genomas correspondientes a especies de Rhodobacterales sugiere la presencia de elementos de secuencia y estructura emparentados, aunque no hemos podido inferir la homología entre ellas con un soporte estadístico adecuado. Un refinamiento de la búsqueda que podrá hacerse incorporando nuevos criterios para la inferencia de homología que esperamos se obtengan a partir de la caracterización funcional del gen, nos permitirá esclarecer qué ha ocurrido evolutivamente con *sm8* en este clado.

Resulta interesante observar con detenimiento el fenómeno que ha ocurrido en el genoma de *Methylocella sylvestris*. En la familia *Rhizobiaceae*, los ortólogos de *sm8* presentan adicionalmente microsinténica con el gen que se posiciona río arriba en el genoma correspondiente, siendo éste un homólogo del gen *SMc04042* de *S. meliloti* 1021, el cual codifica para una enzima con actividad inositol/histidinol monofosfatasa (IHMP). En el genoma de *Methylocella sylvestris*, se ha perdido el vínculo físico con el gen homólogo de la NFGAH como consecuencia de un rearrreglo genómico, pero se reconoce la identidad de la región intergénica por la preservación de la microsinténica con el gen homólogo de la probable IHMP. La elevada conservación que mantiene la secuencia homóloga de *sm8* aun habiendo sufrido una relocalización, sugiere que su función no estaría condicionada por la ubicación en *cis* respecto del gen que codifica para la enzima NFGAH.

Como se puede apreciar a partir del análisis de la Figura 4, ciertas especies han sufrido procesos de reorganización genómica que como resultado han derivado en la adquisición de múltiples copias de miembros de $\alpha 8$ en sus genomas, ya sea en la mismo locus, en posiciones alejadas, o ambas. La implicancia biológica de la presencia de múltiples copias del gen en el genoma de ciertas especies no está clara. La redundancia funcional entre las copias múltiples podría *a priori* esperarse que derivara en la selección de una de ellas, perdiéndose por tanto la presión evolutiva encargada de mantener la conservación sobre el resto. El análisis secuencial de las múltiples copias sin embargo revela un elevado grado de conservación entre ellas, que no concuerda con lo que se esperaría encontrar si la tasa de mutaciones no estuviese controlada a través de una presión de carácter funcional. Alternativamente, la duplicación del gen y creación de múltiples copias podría servir como mecanismo de generación de parálogos capaces de diversificar la función original y adaptar su secuencia y estructura a nuevas funciones. Esto debería verse

reflejado en cambios a nivel secuencial entre copias presentes en un mismo genoma. Un mayor detenimiento en el análisis comparativo de las diversas copias presentes en un mismo genoma podría ser de utilidad para deducir la implicancia funcional de los elementos de secuencia y estructura que conforman el gen. De todos modos, resultaría prematuro aventurar al respecto hasta tanto no se obtengan evidencias experimentales (entre ellas verificar su expresión), que permitan sentar las bases empíricas para otorgarle validez al modelo.

Con certeza, la caracterización funcional de los miembros de esta familia y de los mecanismos moleculares que operan la actividad de los mismos permitirá establecer con precisión los elementos de secuencia y estructura que resultan determinantes de la función del ARN y consecuentemente optimizar los criterios de búsqueda para extender la detección en casos que la homología sea más remota y los rasgos globales de secuencia y estructura no la permitan.

Resulta oportuno remarcar en este punto que la familia de ARNs *suhB* de la base de datos RFAM a la que se hizo referencia en la Introducción al presente Capítulo, describe la presencia de 5 genes homólogos a *sm8* en el genoma de *S. meliloti*. Entre ellos se encuentran los genes que codifican para los sRNAs AbcR1 y AbcR2, descriptos originalmente por Coral del Val y colaboradores, y clasificados posteriormente por los mismos autores en la familia de ARNs $\alpha 15$ (del Val, *et al.*, 2012). Los autores, sin embargo, no incluyen de forma recíproca al gen *sm8* en esta familia. El análisis de secuencia y estructura predicha para estos ARNs no demuestra que conserven los rasgos que distinguen a los miembros de la subfamilia $\alpha 8s1$. Posiblemente, los criterios de filtro aplicados en RFAM resultan permisivos para reunir al conjunto de ellos en una misma familia y justifica por tanto el análisis detallado de los mismos para esclarecer las diferencias. De todos modos, sería factible especular que estos genes se traten de parálogos lejanos de *sm8*, y cuya divergencia justifique por tanto la clasificación de ellos en diferentes familias.

Considerando la extensión filogenética en la que hemos encontrado miembros de la familia $\alpha 8$, y teniendo en cuenta los resultados de los estudios que previamente hemos mencionado que han aplicado algoritmos similares para la construcción de familias de sRNAs de *S. meliloti* (Reinkensmeier, *et al.*, 2011, del Val, *et al.*, 2012), Sm8 representa el sRNA de *S. meliloti* más ampliamente distribuido filogenéticamente entre los que hasta el momento se han analizado.

1.4 Conclusiones

En este Capítulo hemos mostrado que el gen *sm8* de *S. meliloti* es un miembro específico perteneciente a una subfamilia de genes ortólogos -que hemos denominado $\alpha 8s1$ - que ha evolucionado a partir de un ancestro común que ha divergido del orden de los Rickettsiales para dar origen al resto de las especies de la clase de las alfa-proteobacterias. Entre los genes que codifican para ARNs pequeños no codificantes que han sido descritos en alfa-proteobacterias, *sm8* es el cual presenta mayor distribución filogenética y grado de conservación.

Si bien la distribución de los miembros de $\alpha 8s1$ se extiende entre las ramas más remotas que derivan del ancestro común en el que se infiere el origen del gen, hemos detectado su ausencia de homólogos de *sm8* en ciertas especies como consecuencia de pérdida directa debido a eventos de reducción genómica, o como en el caso de las especies de *Brucella*, desaparición genómica del gen por divergencia en el propio locus, muy probablemente debido a la pérdida de la presión de selección que ha mantenido su elevada conservación entre genomas de especies remotas de alfa-proteobacterias.

Adicionalmente, hemos determinado que la subfamilia de ortólogos $\alpha 8s1$ forma parte de una familia de genes homólogos, a la cual denominamos $\alpha 8$, que se hayan vinculados entre sí por eventos de especiación y duplicación génica, conformando subgrupos de genes ortólogos y parálogos que han surgido más recientemente en la evolución (Fig. 4). Los miembros de esta familia fueron identificados a través de la búsqueda de secuencias que mantuvieran conservación secuencial y estructural.

Los ARNs pertenecientes a la familia $\alpha 8$ comparten elementos secuenciales y estructurales conservados, entre ellos un terminador *Rho*-independiente, y en particular, un núcleo interno de 10 nucleótidos de longitud que se halla completamente conservado (5'-UUUCCUCCU-3') y que hipotetizamos podría estar involucrado interacciones del tipo ARN-ARN.

La caracterización funcional de los miembros de esta familia y de los mecanismos moleculares que determinan la actividad de los mismos permitirá establecer con precisión los elementos de secuencia y estructura que resultan determinantes de la función de los ARNs y consecuentemente optimizar los criterios de búsqueda para extender la detección en casos que la homología sea más remota y los rasgos globales de secuencia y estructura no la permitan.

Para dar continuidad al estudio realizado en el presente capítulo, brindaremos detalles en el capítulo próximo sobre la generación de las herramientas que se utilizarán en el curso de este trabajo de Tesis para llevar a cabo la caracterización funcional del gen *sm8* de *S. meliloti*.

CAPÍTULO 2

Construcción y verificación de una cepa mutante $\Delta sm8$ y de cepas de sobreexpresión constitutiva e inducible del sRNA isogénicas de *S. meliloti* 2011.

2.1 Introducción

Para llevar a cabo a la caracterización funcional del gen que codifica para el ARN pequeño no codificante Sm8 en *S. meliloti*, se escogió una estrategia de genética reversa basada en la generación de cepas isogénicas de *S. meliloti* 2011 capaces de presentar niveles intracelulares de Sm8 alterados respecto a los niveles presentes en la cepa silvestre, y el estudio a través de ellas de los fenotipos celulares y moleculares asociados a la actividad del sRNA. De esta forma, se construyeron una cepa mutante y dos de cepas de sobreexpresión, constitutiva e inducible, cuyo diseño y validación es abordado en el presente Capítulo.

El rol de la proteína Hfq como factor común imprescindible en la estabilización y mediación de la actividad regulatoria de un gran número de sRNAs en la célula, principalmente en bacterias gram negativas (Valentin-Hansen, *et al.*, 2004, Aiba, 2007, Jouselin, *et al.*, 2009), deriva en la necesidad por parte de la célula de ejercer un estricto control sobre los niveles relativos de esta proteína y de los sRNAs sobre los que interactúa con el fin de asegurar un funcionamiento integral coordinado de los procesos riboregulatorios. En este sentido, se ha demostrado que la sobreexpresión artificial de sRNAs puede repercutir en la acumulación relativa y actividad del conjunto (*pool*) de sRNAs endógenos debido a la competencia que establecen éstos por la unión a la proteína Hfq (Moon & Gottesman, 2011). Este fenómeno también ocurre en condiciones fisiológicas; la inducción natural de un sRNA regulador puede afectar indirectamente la actividad de otras moléculas a través de la titulación de Hfq, ejemplo de este caso es la disminución de la tasa de traducción que experimenta indirectamente el transcripto del gen *rpoS* consecuente a la inducción del sRNA OxyS. El incremento en los niveles de OxyS, a través de la titulación de Hfq, disminuye los niveles del sRNA ArcZ afectando de este modo la activación directa que éste ejerce sobre la traducción del mRNA *rpoS* (Moon & Gottesman, 2011). En analogía con lo expuesto, la disminución de la representatividad de un sRNA en el pool celular (luego de su represión natural o consecuente a su mutación) es capaz de introducir cambios en las abundancias relativas del resto de los componentes del pool de sRNAs y por ende afectar de modo indirecto la actividad de otros reguladores. Sin embargo, se ha descrito que este efecto sólo es pronunciado cuando se trata de sRNAs naturalmente abundantes y que compiten fisiológicamente por Hfq de modo significativo. Será importante por lo tanto verificar que principalmente ante la sobreexpresión del sRNA, las concentraciones del transcripto no se desvíen considerablemente del rango dinámico en el que éstas varían fisiológicamente.

En base a información previa sabíamos que Sm8 no se expresa de modo constitutivo, sino que posee un patrón de acumulación dependiente, entre otros factores, de la fase del crecimiento saprofítico. Con el propósito por un lado, de optimizar la herramienta de complementación de la cepa mutante, y por otro, de disponer de una herramienta que nos permita estudiar cambios celulares a corto plazo luego de la modificación en la actividad de Sm8, hemos pensado en complementar el uso de sistemas de sobreexpresión constitutiva con la utilización de sistemas de sobreexpresión regulada que sean capaces de ser inducidos en forma controlada. En lo que respecta a la caracterización molecular de la respuesta celular a Sm8, los cambios que se evidencien a tiempos cortos luego de la inducción controlada del transcripto, tenderán a ser exclusivamente el reflejo del efecto fisiológico que ocasiona un incremento en la actividad del sRNA sobreexpresado (Sharma, *et al.*, 2011).

En el presente Capítulo, se presentan las metodologías utilizadas y los criterios obedecidos para la generación del conjunto de cepas isogénicas de *S. meliloti* 2011 capaces de presentar niveles alterados del sRNA Sm8, las cuales se utilizarán a lo largo de este Trabajo de Tesis.

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1 Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

Las cepas bacterianas, los plásmidos y los oligonucleótidos utilizados en este Capítulo se listan en la Tabla 2.1

Tabla 2.1 Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos generados o utilizados en el presente capítulo.

Cepa, plásmido u oligonucleótido	Genotipo, características o secuencia	Referencia o fuente
<i>E. coli</i>		
DH5 α	F ⁻ <i>endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR</i> (ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15)	(Sambrook, 1989)
S17-1 λ <i>pir</i>	F ⁻ <i>pro thi hsdR recA</i> ; chromosome:: <i>RP4-2 Tc::Mu Km::Tn7 Tp^R, Sp^R λpir</i>	(Simon, <i>et al.</i> , 1983)
<i>S. meliloti</i>		
2011	Cepa silvestre derivada de SU47, Str ^R	(Meade & Signer, 1977)
2011 Δ <i>sm8</i>	2011 mutante en el gen <i>sm8</i>	Este trabajo
2011 pSUP104- <i>sm8</i>	2011 portando pSUP104- <i>sm8</i>	Este trabajo
2011 pSUP104	2011 portando pSUP104	Este trabajo
2011RI	2011 doble mutante <i>sinR sinI</i>	Este trabajo
2011RI Δ <i>sm8</i> pSRK-Sm8	2011RI Δ <i>sm8</i> portando pSRK- <i>sinRpsinI</i> -Sm8	Este trabajo
2011RI Δ <i>sm8</i> pSRK-control	2011RI Δ <i>sm8</i> portando pSRK- <i>sinRpsinI</i> -control	Este trabajo
Plásmidos		
pUC57- <i>synt</i> Δ <i>sm8</i>	Vector de clonado conteniendo alelo mutante <i>sm8</i> , Amp ^R	Este trabajo
pK18mob:: <i>sacB</i>	Vector movilizable y suicida en <i>S. meliloti</i> para realizar mutagénesis insercional y selección positiva a través del gen <i>sacB</i> . Km ^R	(Schafer, <i>et al.</i> , 1994)
pK18mob: <i>sacB</i> - <i>synt</i> Δ <i>sm8</i>	Derivado del pK18mob: <i>sacB</i> conteniendo alelo mutante <i>sm8</i>	Este trabajo
pSRKKm	Derivado del vector de expresión de amplio rango de huésped pBBR1MCS-2 conteniendo promotor <i>lac</i> , <i>lacI^q</i> , <i>lacZα⁺</i> y Km ^R	(Khan, <i>et al.</i> , 2008)
pSRK- <i>sinRpsinI</i>	Derivado de pSRKKm. Fusión transcripcional promotor <i>lac</i> a gen <i>sinR</i> de <i>S. meliloti</i> 2011. Contiene promotor huérfano del gen <i>sinI</i> de <i>S. meliloti</i> 2011.	Este trabajo
pSRK- <i>sinRpsinI</i> -Sm8	Derivado de pSRK- <i>sinRpsinI</i> portando fusión transcripcional del promotor <i>sinI</i> a fragmento conteniendo la secuencia del transcrito del gen <i>sm8</i> de <i>S. meliloti</i> 2011.	Este trabajo

Cepa, plásmido u oligonucleótido	Genotipo, características o secuencia	Referencia o fuente
pSRK-sinRpsinI-control	Derivado de pSRK-sinRpsinI portando fusión transcripcional del promotor <i>sinI</i> a fragmento conteniendo la secuencia del transcripto asRNA812 de <i>S. meliloti</i> 2011.	Este trabajo
pSUP104	Vector de alto número de copias y amplio rango de huésped, derivado de RSF1010. Cm ^R Tc ^R	(Priefer, <i>et al.</i> , 1985)
pSUP104- <i>sm8</i>	Derivado de pSUP104 portando un fragmento conteniendo la secuencia del gen <i>sm8</i> de <i>S. meliloti</i> 2011 bajo la regulación de su propio promotor.	Este trabajo
Oligonucleótidos (5'→3')*		
ALsm8Fw	TGCACCGATACGAAAGTCTG, hibrida entre -69 y -49	Este trabajo
ALsm8Rv	GGCTTCATCACGGAACATTA, hibrida entre +121 y +132	Este trabajo
extHRsm8Fw	GATATTGCCGTGCTCTTCG, hibrida entre -396 y -377	Este trabajo
extHRsm8Rv	GCCCGGACTTCATTATCG, hibrida entre +432 y +450	Este trabajo
SuhBf	TGTCGCTCTCTGCGAGGG	(Valverde, <i>et al.</i> , 2008)
SuhBr	TTTCGGCGCCTATCTGCC	(Valverde, <i>et al.</i> , 2008)
qRTPCR-Sm8-Fw	ACTCGTGGCTGCAAATAC, hibrida entre +4 y +22	Este trabajo
qRTPCR-Sm8-Rv	GTCTAGGGAGGAAACACC, hibrida entre +30 y +48	Este trabajo
qRTPCR-SMc01852-Fw	TCGGTGGTGATCGTCTTTC	(Becker, <i>et al.</i> , 2004)
qRTPCR-SMc01852-Rv	CTGGCGGTTCGATCTTGTC	(Becker, <i>et al.</i> , 2004)

* Las posiciones de hibridación son relativas al sitio de inicio de la transcripción del sRNA Sm8 (coordinada 3046712 en cromosoma de *S. meliloti* 1021)

2.2.2 Medios y condiciones de cultivo

Las cepas de *E. coli* fueron crecidas a 37°C en caldo nutritivo NYB (caldo nutritivo 25 g l⁻¹, extracto de levadura 5 g l⁻¹) o en agar nutritivo (agar base sangre 40 g l⁻¹, extracto de levadura 5 g l⁻¹). Las cepas de *S. meliloti* fueron cultivadas a 28°C en medio complejo TY (*tryptone yeast*, triptona 5 g l⁻¹, extracto de levadura 3 g l⁻¹, CaCl₂·2H₂O 0,7 g l⁻¹; Beringer 1974). Cuando fue requerido, los antibióticos fueron suministrados a los medios de cultivo en las siguientes concentraciones: para *E. coli*: kanamicina 25 µg ml⁻¹, tetraciclina 10 µg ml⁻¹; para *S. meliloti*: estreptomycin 400 µg ml⁻¹, neomicina 120 µg ml⁻¹, tetraciclina 5 µg ml⁻¹. Las cepas se conservaron a -80°C en una solución acuosa de glicerol 20% v/v.

2.2.3 Síntesis del alelo mutante delecional del gen *sm8*

El alelo mutante $\Delta sm8$ se diseñó *in silico*, y su síntesis fue llevada a cabo por GenScript® (GenScript, Piscataway, NJ, EEUU). Se ordenó el clonado del fragmento sintetizado entre los sitios de corte de las endonucleasas de restricción *EcoRI* y *HindIII* en el plásmido pUC57.

2.2.4 Transformación de *Escherichia coli* por electroporación

Las células de *E. coli* fueron transformadas según (Sambrook, 1989). Para la preparación de células electrocompetentes se crecieron cultivos en medio NYB hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento ($DO_{600} \approx 0,6$). Se centrifugaron 100 mL del cultivo a $7500 \times g$ durante 5 min a $4^\circ C$ y las células se lavaron una vez a $0^\circ C$ con una solución acuosa estéril de glicerol 10% v/v. El *pellet* obtenido se resuspendió en 10 ml de la solución de glicerol mencionada y se fraccionó en alícuotas de 100 μl para su conservación en ultrafreezer a $-80^\circ C$.

2.2.5 Movilización de plásmidos a *S. meliloti* por conjugación biparental

Se utilizó como dadora a la cepa *E. coli* S17-1 electrotransformada con el plásmido deseado. Para la conjugación biparental se crecieron la cepa dadora y receptora en los medios NYB y TY, respectivamente, hasta una $DO_{600} = 0,7$ y se mezclaron alícuotas iguales de 700 μl de ambos cultivos. Se centrifugó la mezcla a $7.500 \times g$, se resuspendió el *pellet* en un volumen de 20 μl de medio TY, y luego se depositó en forma de una gota sobre una placa con el mismo medio. Paralelamente, a modo de control, 700 μl de cada cultivo se procesaron por separado del mismo modo. Se incubó la placa a $28^\circ C$ durante 8 hs, luego se resuspendió cada *spot* en 50 μl de medio TY líquido, y se plaquearon por agotamiento en superficie sobre medio TY sólido suplementado con los antibióticos adecuados para llevar a cabo la selección de las cepas conjugantes deseadas.

2.2.6 Manipulación del ADN. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El ADN de *E. coli* y *S. meliloti* utilizado como molde para las reacciones de PCR se obtuvo a partir de cultivos en medio sólido; se tomó una colonia aislada y se resuspendió en 20-50 μl de agua desionizada, se incubó a $100^\circ C$ durante 10 min., se centrifugó 1 min. a $\sim 12.000 \times g$, y se conservó el sobrenadante como fuente de ADN a $-20^\circ C$. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en una mezcla de 20 μl , conteniendo 1 U de Taq ADN polimerasa recombinante (Taq Pegasus; PBL, Argentina), 1 μl de la solución conteniendo el ADN molde, 200 μM de cada dNTP, 10 pmol de cada oligonucleótido, 1.5 mM $MgCl_2$ y 1 \times buffer Taq. El programa de ciclado constó de una etapa inicial de desnaturalización de 2 min a $95^\circ C$ seguida de 35 ciclos de: 30 seg a $95^\circ C$, 30 seg a la temperatura óptima de hibridación determinada para cada par de oligonucleótidos utilizado, 1 min/kb a $72^\circ C$, y una etapa de elongación final de 2 min a $72^\circ C$. Los amplicones se sometieron a electroforesis en gel de agarosa 1-1,5% p/v, durante tiempo variable a voltaje constante de 80-100V, y luego se tiñeron con bromuro de etidio para su visualización en transiluminador

UV, previo al registro digital utilizando una cámara Kodak DC-40. Eventualmente, el producto de reacción remanente se conservó a -20 °C para su uso posterior.

2.2.7 Extracción y purificación de ARN total de *S. meliloti*

El ARN total de *S. meliloti* fue purificado mediante una extracción orgánica seguida de una precipitación alcohólica. Se colectaron células a partir de un volumen de 3 mL de cultivos saturados en medio RDM ($DO_{600} = 5,0$) por centrifugación a $10.000\times g$ a 4°C durante 5 minutos. El *pellet* se resuspendió en 1 ml de TRIzol® (Invitrogen, EEUU) mediante agitación vigorosa durante 3-5 minutos hasta obtener una suspensión homogénea de células. Se incubó 15 min a temperatura ambiente y luego se agregaron 200 µl de cloroformo. Se agitó y dejó reposar sobre mesada durante 3 min. Luego se centrifugó a 4°C durante 15 min a $12.000\times g$ para separar las fases. Posteriormente se recuperó cuidadosamente la fase acuosa en un nuevo tubo, sobre la cual se agregó 1 volumen de isopropanol. Se incubó la mezcla a -20°C durante 45 min y luego se centrifugó a 4°C durante 15 min a $15000\times g$. El *pellet* de ARN se lavó con etanol 70% v/v, se secó, y finalmente se resuspendió en 25-50 µl de agua desionizada milliQ y se conservó en ultrafreezer a -80°C. La concentración de ARN en la solución final se determinó mediante espectrofotometría UV utilizando un equipo Nanodrop ND1000 (Thermo Scientific, EEUU). La calidad de las muestras de ARN fue monitoreada a través de geles de agarosa desnaturalizantes (Sambrook, 1989).

Cuando el ARN se preparó con el objetivo de ser retrotranscrito y amplificado por RT-qPCR, se realizó un paso adicional de purificación mediante tratamiento con DNasa I (Thermo, EEUU). Se utilizó 1 U de enzima por cada µg de ARN tratado. La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 1 hora. La DNasa I se inactivó por incubación a 65°C durante 10 min, previa adición de EDTA según las indicaciones del kit.

2.2.8 Ensayos de *Northern blot*

Para llevar a cabo el análisis de *Northern blot*, se separó inicialmente el ARN total de cada muestra mediante una electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida. El gel (60×80×0,75 mm; urea 8,3M; acrilamida 8% p/v; bisacrilamida 0,2% p/v) se preparó y dejó polimerizar en el sistema MiniProtean (BioRad, EEUU). En la primera calle se sembró el marcador de peso molecular (RNA *low range ladder*; Thermo, EEUU). El gel se corrió en tampón TBE 1× (Tris-borato 50 mM pH = 8,3; EDTA 1 mM) a corriente constante de 7 mA durante 45 min. La calle correspondiente al marcador de peso molecular se cortó del resto del gel, se tiñó con una solución bromuro de etidio 5 µg/mL para su visualización en transiluminador UV, previo al registro digital utilizando una cámara Kodak D-40. El ARN de las muestras separado en el gel fue electrotransferido a una membrana Hybond-N mediante la aplicación de una corriente constante (150 mA, 15-25V) durante 30 min en solución tampón TBE 1×. Las membranas se lavaron con solución SSC 2× (NaCl 0,3M; citrato de sodio 30 mM), y luego se realizó el *cross-linking* del ARN a la membrana mediante su exposición directa a la luz UV por un período de 5 min (Sambrook, 1989). La

membrana se bloqueó a través de su incubación a 70°C durante 1 hora con tampón de pre-hibridación (Sambrook, 1989). Para la detección específica del transcripto deseado se utilizaron sondas de ADN marcadas con digoxigenina sintetizadas por PCR según el protocolo recomendado por el fabricante (*Nucleic acid labeling kit*, Roche Diagnostics GmbH, Alemania). Se incubó la membrana durante 12 hs a 50°C en horno de hibridación con la sonda correspondiente, previamente desnaturalizada. Posteriormente se realizaron los lavados sucesivos para eliminar los restos de sonda unidos inespecíficamente a la membrana y se procedió con el revelado. Se utilizaron anticuerpos anti-digoxigenina acoplados a fosfatasa alcalina, y se reveló con el sustrato quimioluminiscente Lumiphos Western (Lumiphos, EEUU). El tiempo de exposición a las placas fotográficas se ajustó en cada caso con el fin de optimizar la intensidad de señal detectada. Se utilizaron reactivos los Kodak (Kodak, EE.UU.) para el revelado de las placas fotográficas.

2.2.9 Ensayos de RT-qPCR

Los ensayos de retrotranscripción - PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) fueron realizados utilizando el kit comercial KAPA SYBR FAST One-Step qRT-PCR Universal (Kapa Biosystems) respetando las instrucciones del fabricante. 50 ng de ARN total purificado fueron retrotranscritos y amplificados utilizando un par de oligonucleótidos específicos para cada gen en una concentración final de 300 nM y en un volumen total de reacción de 8 µl. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: el ARN se retrotranscribió durante 10 min a 42°C, luego se incubó a 95°C durante 5 min, y se procedió con 40 ciclos de 3 seg a 95°C, 20 seg a 55°C y 5 seg a 72°C. Finalmente, para confirmar la presencia de producto único de amplificación en cada reacción, se realizó una curva de *melting* luego de cada ciclado elevando la temperatura progresivamente (1°C/5 seg) desde 60°C hasta un valor final de 95°C y determinado la fluorescencia por cada °C de temperatura modificado. Las condiciones de reacción descritas fueron aplicadas para las reacciones correspondientes a todos los pares de oligonucleótidos utilizados. La lista de oligonucleótidos usados se encuentra detallada en la Tabla 2.1. Una réplica biológica y tres réplicas técnicas de cada cepa y condición fueron procesadas. Se utilizó un cicladador de tiempo real qTower (Analytik Jena, Alemania). Los parámetros línea de base y umbral fueron ajustados automáticamente por el programa qPCRsoft 1.1 (Analytik Jena AG, Alemania) El análisis cuantitativo de expresión génica se realizó manualmente a través del método del delta-delta-Ct (Pfaffl, 2001). Los niveles del transcripto del gen *SMc01852* se utilizaron como referencia para la cuantificación relativa de Sm8 (Becker, *et al.*, 2004, Krol & Becker, 2011).

2.3 Resultados y Discusión

2.3.1 Construcción del mutante isogénico de *S. meliloti* 2011 por delección parcial en el gen *sm8*.

Se procedió a la generación de una cepa mutante isogénica de *sm8* en *S. meliloti* 2011. Con tal propósito, se evaluaron inicialmente y de forma detallada las propiedades de la región intergénica (estrictamente 'entre marcos abiertos de lectura', o *inter-ORF*) donde se ubica *sm8*, comprendida ésta entre los genes *SMc04042* y *SMc04043* que se hallan localizados en el replicón cromosomal de *S. meliloti* (Fig. 1), con el fin de determinar la secuencia genómica a ser modificada de modo de minimizar la introducción de efectos polares que pudieran afectar de manera no deseada la expresión de los genes contiguos.

A partir de ensayos de secuenciamiento profundo del transcriptoma de *S. meliloti* 2011 (Schluter, *et al.*, 2013), se determinó con precisión y exactitud que la síntesis del transcripto Sm8 se inicia en la posición 3046712 del cromosoma de *S. meliloti* (coordinada correspondiente al cromosoma de la cepa 1021) (Fig. 1, TSS $_{sm8}$), en sentido divergente respecto del cual se transcribe el gen situado río arriba (*SMc04042*) y a una distancia de 180 nucleótidos respecto del inicio del marco abierto de lectura correspondiente (Fig. 1). Se verificaron experimentalmente dos sitios de inicio de la transcripción (TSS, *transcriptional start site*) correspondientes al gen *SMc04042*, denominados TSS1 y TSS2 (Fig. 1), los cuales distan en 24 y 142 nts del codón de inicio de la traducción de dicho gen, respectivamente. En base a esta información, se evidencia que la región promotora correspondiente a TSS2 se encuentra solapada, aunque en dirección divergente, con el promotor del gen *sm8*. Adicionalmente, una predicción bioinformática de regiones promotoras realizada mediante el servidor *BDGP: Neural Network Promoter Prediction* (Reese, 2001) reveló la posible presencia de un tercer promotor asociado al gen *SMc04042*, que se ubicaría solapado con los primeros 30 nts de *sm8* (TSS3*). Sin embargo, dicho transcripto no ha sido detectado experimentalmente. Si bien la validez de esta predicción no ha sido comprobada (posiblemente debido a que los niveles de expresión a partir de dicho promotor es muy baja en las condiciones de crecimiento ensayadas), por precaución se decidió no modificar la región genómica que involucra el elemento predicho (TSS3*).

En relación al resultado del análisis de la región cromosomal que se extiende río abajo a partir de la secuencia del terminador *Rho*-independiente del transcripto Sm8, no se detectaron elementos regulatorios que correspondiesen al gen flanqueante próximo, *SMc04043*, codificado sobre la cadena complementaria respecto a *sm8* y cuyo codón de *stop* se encuentra a 44 nts de distancia del terminador del sRNA.

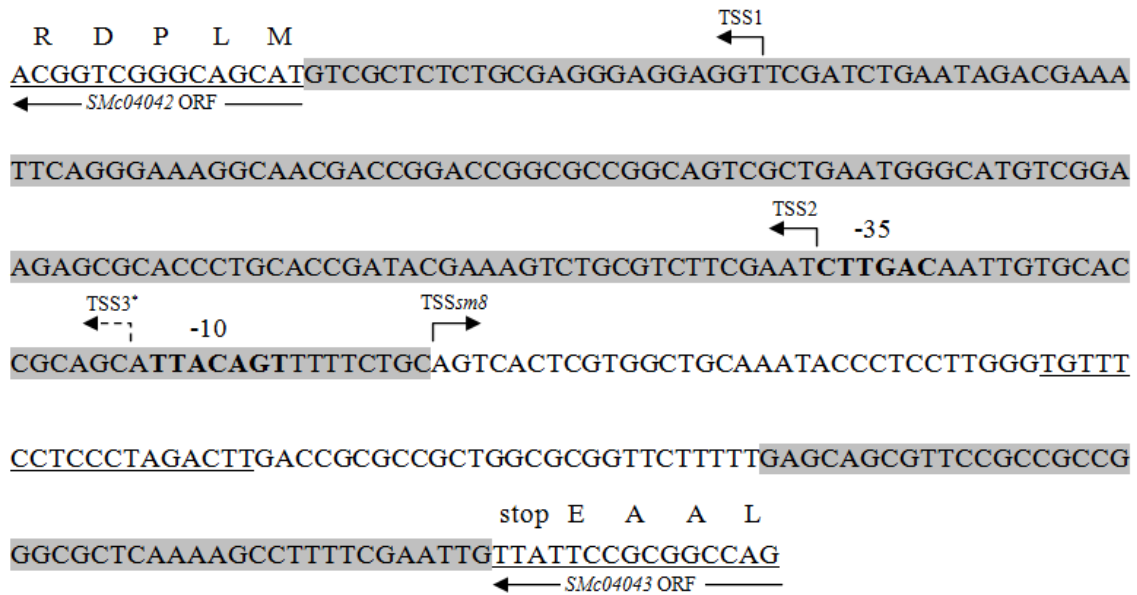


Figura 1. Esquema de la secuencia correspondiente al locus *sm8* en el cromosoma de *S. meliloti* 2011. En negrita se remarcan las regiones -10 y -35 del promotor del gen *sm8*. En gris se resaltan las regiones intergénicas comprendidas entre *sm8* y los ORF flanqueantes (correspondientes a los genes *SMc04042* y *SMc04043*, secuencias subrayadas en el esquema). TSS: sitios de inicio de la transcripción (1, 2 y 3* refiere a los sitios alternativos que han sido confirmados experimentalmente o predichos (*), respectivamente, para el gen *SMc04042*). Sobre las secuencias correspondientes a los genes flanqueantes se indican los aminoácidos codificados, *stop*: codón de terminación de la traducción.

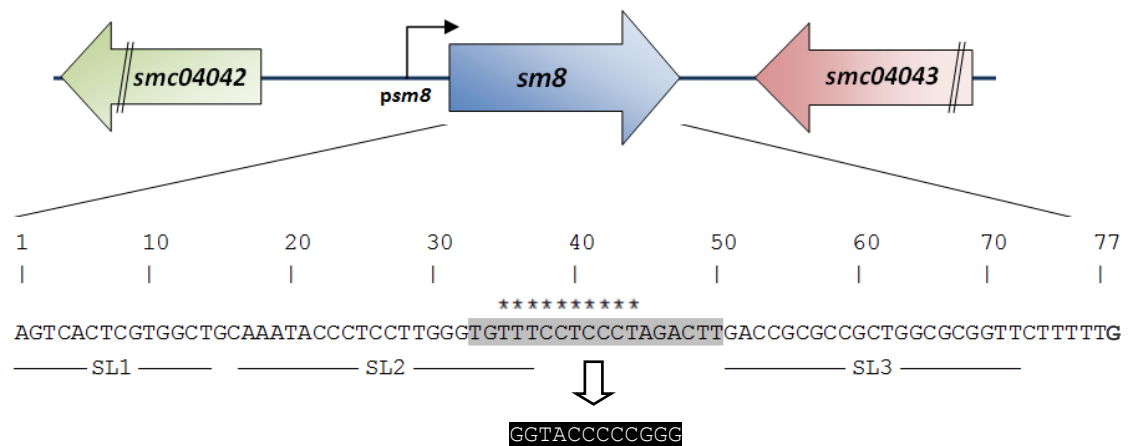


Figura 2. Esquema del locus *sm8*. //, delimitación de las regiones cromosomales de 300 nt de longitud flanqueantes al alelo intercambiado a través de las que se llevó a cabo la doble recombinación homóloga; *psm8*, promotor del gen *sm8*; en gris se resalta la secuencia del alelo silvestre que ha sido intercambiada por el alelo mutante (en el recuadro inferior con fondo negro se indica la secuencia correspondiente al alelo $\Delta sm8$). SL: *stem-loop*. *: núcleo secuencial conservado en la familia de ARNs *ar8* (ver Capítulo 1).

Teniendo en cuenta lo expuesto, se consideró no conveniente llevar a cabo la delección completa del gen *sm8*, y en su lugar se optó por introducir un reemplazo secuencial dentro del núcleo conservado del gen, fuera de la zona de solapamiento con los elementos regulatorios asociados a la expresión del gen *SMc04042*. En este sentido, se intercambiaron 18 nucleótidos presentes en el alelo salvaje del gen por las secuencias correspondientes a los sitios de corte de las endonucleasas de restricción *KpnI* y *SmaI* (Fig. 2). Según las predicciones de estructura secundaria realizadas a través del servidor Mfold (Zuker, 2003), la estructura del transcripto mutante diferiría considerablemente de la estructura del transcripto salvaje, de esta forma favoreciendo la pérdida de función del gen *sm8* en la cepa mutante (resultados no mostrados).

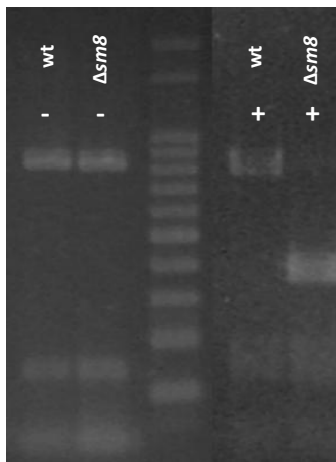


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa confirmatoria de la obtención del clon mutante.
 -: amplicón sin tratar con endonucleasa de restricción.
 +: amplicón tratado con *KpnI*. El marcador de peso molecular corresponde a fragmentos de tamaño entre 50 a 500 pb, creciendo de a 50 pb, y dos bandas adicionales de 750 y 1000 pb.

Se construyó un derivado del vector suicida pK18mob::*sacB* (Schafer, *et al.*, 1994) conteniendo el alelo mutante de *sm8* ($\Delta sm8$, ver Fig. 2) flanqueado hacia ambos lados por las regiones cromosomales contiguas de 300 pb de longitud. El vector se clonó inicialmente en la cepa *E. coli* DH5-alfa, y posteriormente se movilizó a la cepa *E. coli* S17-1 (Simon, *et al.*, 1983), para luego ser transferida por conjugación biparental a *S. meliloti* 2011. Los clones simples recombinantes se seleccionaron mediante su resistencia adquirida a Neomicina. Posteriormente, se indujo el segundo evento de recombinación homóloga para lograr la escisión del vector desde el cromosoma, y se seleccionaron los clones dobles recombinantes que perdieron la sensibilidad a sacarosa y la resistencia a Neomicina. Los clones mutantes fueron identificados mediante la amplificación por PCR de la zona donde se introdujo la mutación, utilizando cebadores que hibridan por fuera de las regiones de homología a través de las cuáles ocurrió el intercambio alélico, y el posterior tratamiento del producto de amplificación con la endonucleasa de restricción *KpnI*. Aquellos clones en los que se observó la digestión del amplicón fueron confirmados como *S. meliloti* 2011 $\Delta sm8$ (Fig. 3).

A continuación, se verificaron los niveles intracelulares de *sm8* en las cepas salvaje y mutante mediante ensayos de *Northern blot*. Los ensayos se realizaron por duplicado biológico, utilizando una sonda de hibridación de secuencia complementaria al alelo salvaje

de Sm8. Las muestras de ARN se extrajeron de células que se encontraban en la fase estacionaria de crecimiento en medio de cultivo definido RDM (Vincent, 1970), condición en la que Sm8 se ha descrito que alcanza los mayores niveles intracelulares en la cepa salvaje. Estos ensayos permitieron verificar la expresión de Sm8 en la cepa silvestre, mientras que los niveles del sRNA en la cepa mutante resultaron indetectables (Fig. 4). Para descartar que la ausencia de señal de Sm8 en la cepa mutante se haya debido a la complementariedad parcial existente entre el transcrito Sm8-mutante y la sonda de hibridación dirigida al transcrito salvaje, se repitió el ensayo de *Northern blot* utilizando una sonda de hibridación conformada por un fragmento de ADN de secuencia complementaria al transcrito mutante. La ausencia de señal específica correspondiente transcrito mutante Sm8 (datos no mostrados) confirmó que ocurre una caída drástica de los niveles del transcrito en la cepa mutante, posiblemente debido a una desestabilización del mismo como consecuencia de los cambios introducidos en su secuencia.

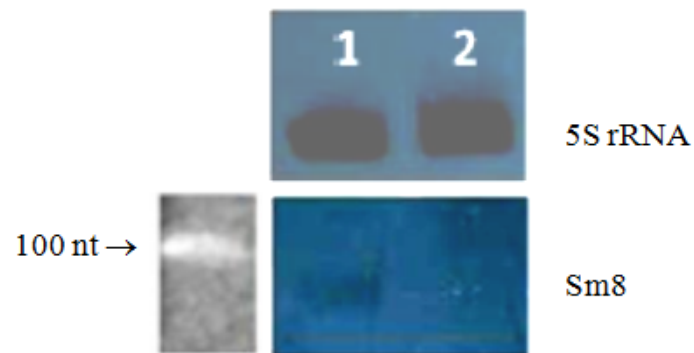


Figura 4. Resultados del ensayo de *Northern blot* revelado utilizando sonda *sm8-wt*. Calle 1: cepa *S. meliloti* 2011 wt; calle 2: cepa *S. meliloti* 2011 $\Delta sm8$.

Paralelamente y a modo de control de la ausencia de efectos polares, se verificó mediante ensayos de RT-qPCR que no estuviesen afectados los niveles del transcrito del gen *SMc04042* como consecuencia de la mutación introducida en *sm8*. La abundancia del mRNA correspondiente no presentó diferencias significativas entre la cepa silvestre y la cepa mutante (promedio de $\log_2[\text{expresión en cepa mutante}/\text{expresión en cepa salvaje}] \pm \text{SD} = -0,38 \pm 0,1$).

2.3.2 Complementación del mutante *sm8*. Construcción de cepa de sobreexpresión inducible de Sm8. Optimización de las condiciones de inducción.

Como se mencionó en la Introducción al Capítulo, considerando que la expresión de *sm8* en *S. meliloti* no es constitutiva, sino que sabemos que ésta presenta un patrón de inducción que resulta en una mayor acumulación del transcripto en la fase estacionaria de cultivo (Valverde, *et al.*, 2008), se escogió una estrategia de complementación que potencialmente permitiese emular en la cepa mutante el patrón de acumulación natural del transcripto que se observa en la cepa salvaje bajo las diferentes condiciones de crecimiento a las que se someterá a la bacteria.

La expresión regulada de Sm8 se logró a partir de la utilización de un diseño que ha sido ideado y utilizado por el Dr. Matthew McIntosh en el laboratorio de la Dra. Anke Becker (Marburgo, Alemania). El fundamento de esta herramienta está basado en el acoplamiento del sistema de control negativo de la expresión del operón Lac mediado por la proteína LacI, heterólogo en *S. meliloti*, al sistema de control positivo de la expresión del gen *sinI* mediado por la proteína SinR en *S. meliloti* (lado superior del plásmido esquematizado en la Fig. 5). SinR y SinI forman parte, en conjunto con ExpR, del grupo de proteínas que regulan los fenómenos de *quorum sensing* en *S. meliloti*. En particular, en la cepa *S. meliloti* 2011 el gen *expR* se encuentra interrumpido y el sistema de *quorum sensing* se halla reprimido. De este modo, es posible hacer uso de sus componentes como herramientas genéticas sin comprometer fenotípicamente a la bacteria (Pellock, *et al.*, 2002).

Contribuye a la utilidad de este sistema génico, la información disponible respecto a los elementos que participan en la regulación. A nivel cromosomal, ambos genes se encuentran separados por una región intergénica de 215 pb conteniendo sitios de unión para ExpR y para el propio SinR. SinR, mediante su interacción física con su sitio de unión, ejerce una modulación positiva sobre la transcripción de *sinI*. Dado que se conoce con precisión el sitio de inicio de la transcripción correspondiente al promotor *sinI* (*psinI*), y considerando que los elementos en *cis* necesarios para regular su actividad no se encuentran solapados con la región del ADN que se transcribe, es posible clonar fragmentos específicos de ADN con el propósito de controlar su expresión.

Teniendo esto en cuenta, se construyó el triple mutante $\Delta sm8 sinR sinI$ en *S. meliloti* 2011 (*S. meliloti* 2011RI $\Delta sm8$) para evitar efectos indeseados derivados de la sobreexpresión ectópica de SinR desde el plásmido sobre la copia de *sinI* ubicada en el cromosoma de la cepa 2011. Por un lado, la secuencia codificante para el transcripto Sm8 se clonó bajo la regulación del promotor del gen *sinI* en conjunto con la región de unión a SinR, situada río arriba del promotor. En segundo lugar, el marco abierto de lectura de la proteína SinR se clonó bajo la secuencia promotora y operadora del operón Lac de *E. coli*. Ambas construcciones se subclonaron en el plásmido replicativo de mediano número de copias en *S. meliloti* (pSRK), el cuál expresa de forma constitutiva la proteína represora LacI (Fig. 5). El plásmido resultante denominado pSRK-sinRpsinI-Sm8, se movilizó mediante conjugación biparental a *S. meliloti* 2011RI $\Delta sm8$.

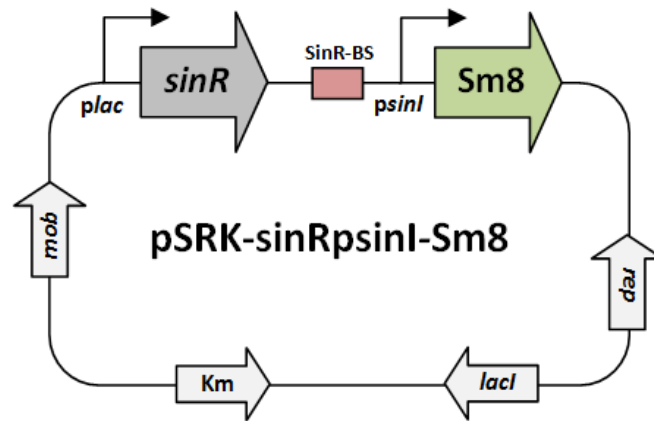


Figura 5. Esquema del plásmido pSRK-sinR-psinI-Sm8 utilizado para la sobreexpresión controlada del sRNA Sm8. SinR-BS, sitio de unión de SinR

Paralelamente, se dispuso de un plásmido con función de control de expresión de un ARN no relacionado con Sm8, en el cuál se clonó bajo la regulación del sistema inducible a la secuencia correspondiente al sRNA antisentido SmelC812 (pSRK-sinRpsinI-control). Se escogió este ARN en base a que fue validada previamente la regulación exclusiva que éste ejerce sobre el mRNA del gen que se ubica en la cadena complementaria, SMC02779 ((Schluter, *et al.*, 2010) y Schluter *et al.*, no publicado), el cual codifica para una enzima transposasa y que no poseería vínculo funcional con Sm8.

De este modo, se espera que la adición de IPTG aumente la producción de SinR, modulando éste positivamente la actividad promotora de *psinI*, y causando finalmente un incremento en los niveles del transcripto Sm8 (Fig. 6). El ajuste de la concentración de IPTG utilizada para llevar a cabo la inducción del sistema, permite controlar los niveles intracelulares de Sm8.

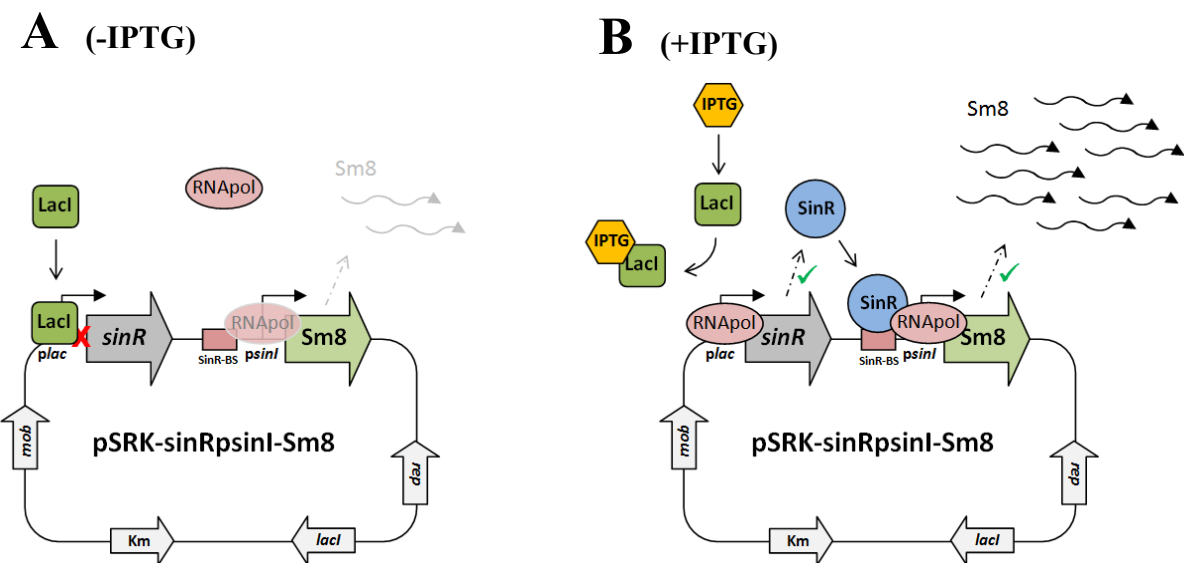


Figura 6. Esquema de funcionamiento del sistema de expresión regulada de Sm8. LacI: represor operón Lac. (A) En ausencia de IPTG. (B) En presencia de IPTG.

A continuación, se determinó la respuesta del sistema de inducción ante el agregado de concentraciones crecientes de IPTG. Para ello, se cuantificaron los niveles del sRNA Sm8 transcurridos 20 min luego del agregado del inductor sobre cultivos creciendo en fase exponencial ($DO_{600}=0,8$) en medio definido RDM. Se ensayó un rango de concentraciones de IPTG entre 5 μM y 1000 μM . En cada caso se relativizó la concentración de Sm8 alcanzada luego la inducción respecto a la concentración que presentó la cepa salvaje en similares condiciones de cultivo.

Tal como era previsto, se observó una correlación positiva entre la magnitud de la acumulación de Sm8 y la concentración de IPTG utilizada para llevar a cabo la inducción (Fig. 7). La mayor sensibilidad del sistema se presentó en el rango de concentraciones de IPTG comprendido entre 20 μM y 50 μM , obteniendo un aumento de $\approx 6\times$ en los niveles de Sm8 alcanzados ante un incremento de $2,5\times$ en la concentración utilizada de inductor. La respuesta del sistema presentó un comportamiento cercano a la saturación a concentraciones de IPTG mayores a 500 μM .

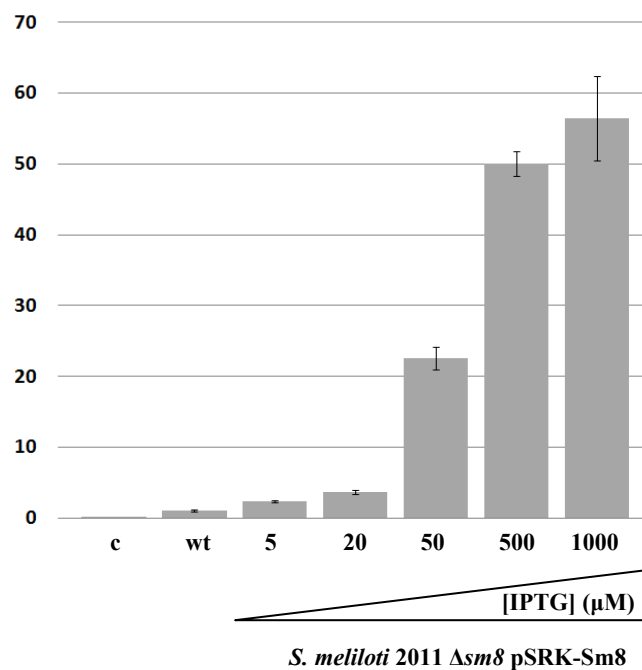


Figura 7. Análisis de la respuesta del sistema de expresión regulada ante su inducción con concentraciones crecientes de IPTG. c: *S. meliloti* 2011 $\Delta sm8$ pSRK-control + 500 μM IPTG; wt: *S. meliloti* 2011 + 500 μM IPTG

2.3.3 Construcción de cepa de sobreexpresión constitutiva de Sm8

Finalmente, se construyó una cepa de sobreexpresión constitutiva de Sm8, isogénica de *S. meliloti* 2011. El gen *sm8* y su propio promotor se amplificaron por PCR mediante el uso de los cebadores ALsm8Fw y ALsm8Rv, y se clonaron en el vector replicativo de alto número de copias pSUP104 (Fig. 8) (Priever, *et al.*, 1985). La construcción se transfirió a la cepa *E. coli* S17-1 para su movilización mediante conjugación biparental a *S. meliloti* 2011. Se seleccionaron los clones portadores del plásmido recombinante (*S. meliloti* 2011 pSUP104-*sm8*) mediante su resistencia adquirida a tetraciclina.

De la misma manera, se transfirió el plásmido pSUP104 vacío a *S. meliloti* 2011, para contar con la cepa control correspondiente (*S. meliloti* 2011 pSUP104).

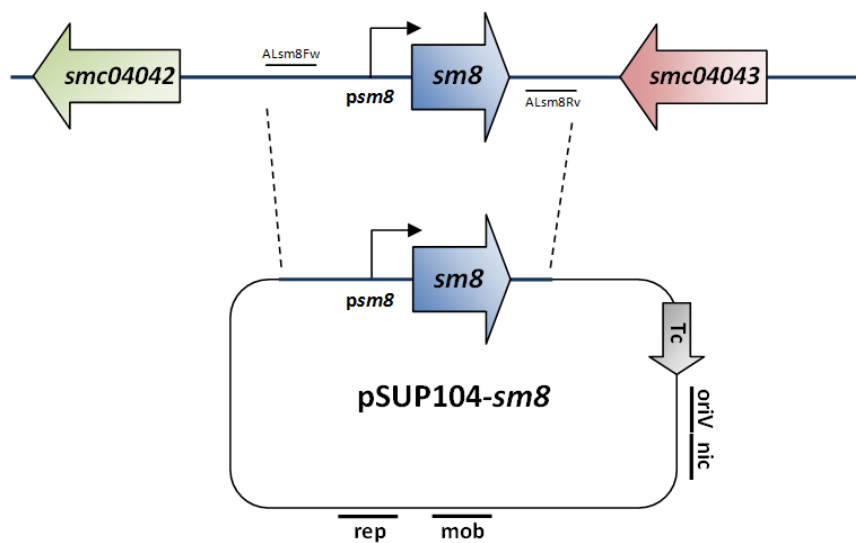


Figura 8. Esquema del diseño para la sobreexpresión constitutiva de Sm8 desde el plásmido multicopia pSUP104-*sm8*.

Mediante ensayos de *Northern blot*, se verificaron los niveles intracelulares de Sm8 que presentaron las cepas en cultivos saturados en medio RDM, según se describió previamente. La cepa de sobreexpresión presentó una concentración de Sm8 \approx 15 veces superior a la que presentó la cepa control portando el vector vacío (Fig. 8).

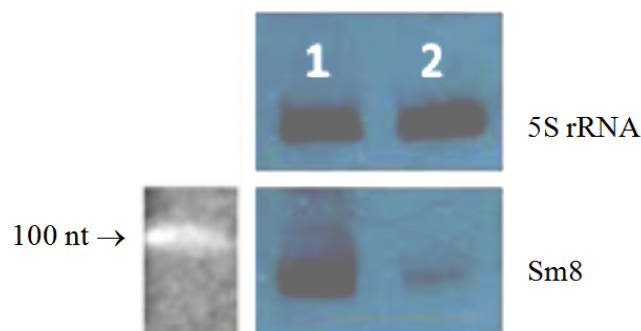


Figura 9. Resultados del ensayo de *Northern blot* revelado utilizando sonda *sm8-wt*. Calle 1: cepa *S. meliloti* 2011 pSUP104-*sm8*; calle 2: cepa *S. meliloti* 2011 pSUP104.

2.4 Conclusiones

En este Capítulo se presentaron detalladamente la estructura genómica y el principio de funcionamiento de un conjunto de cepas isogénicas de *S. meliloti* 2011 construidas para llevar a cabo la caracterización del rol biológico del sRNA Sm8.

En primer lugar, se construyó una cepa mutante isogénica de *S. meliloti* 2011 en el gen *sm8* mediante la introducción de una delección parcial a nivel cromosomal en la región interna del gen que se halla altamente conservada. Se verificó que dicha mutación condujo a una disminución de los niveles del sRNA, los cuales resultaron no detectables mediante ensayos de *Northern blot*. Adicionalmente, se verificó que el intercambio secuencial a nivel cromosomal introducido en la cepa mutante no causó efectos polares sobre la expresión del gen flanqueante *SMc0402*, cuyo promotor se halla en la región intergénica modificada. De esta forma, se validó el uso de esta cepa transgénica como mutante del gen *sm8* de *S. meliloti* 2011.

En segundo lugar, se dispuso de una cepa para la complementación de la mutación $\Delta sm8$. Para ello, se generó una construcción a partir de la cual fue capaz llevar a cabo el control fino de la expresión del sRNA Sm8 para potencialmente emular el comportamiento del promotor *sm8* durante los ensayos de complementación del mutante. Se caracterizó la respuesta del sistema inducible de expresión del sRNA ante el agregado de diferentes concentraciones del agente inductor con el propósito de poder establecer luego las condiciones en las que será utilizado.

En último lugar, se construyó una cepa de sobreexpresión constitutiva del ARN pequeño Sm8 mediante el clonado del locus *sm8* en un vector replicativo multicopia, y se verificó que ésta presenta una concentración intracelular de Sm8 aprox. 15× superior respecto a los niveles que se determinaron en la cepa control correspondiente conteniendo el plásmido vacío durante la fase estacionaria de cultivo en medio definido RDM.

En conjunto, las herramientas generadas que han sido presentadas en este Capítulo permitirán desarrollar los objetivos específicos planteados para este trabajo de Tesis Doctoral. Los fenotipos diferenciales respecto a la cepa silvestre que presenten las cepas transgénicas generadas, serán consecuencia de los cambios en la concentración celular de Sm8, y por consiguiente en la actividad del sRNA, lo que permitirá evaluar su papel en la biología de *S. meliloti* tanto en vida libre y como en simbiosis.

CAPÍTULO 3

**Caracterización del rol biológico de Sm8 en la
vida saprofítica de *Sinorhizobium meliloti* 2011.**

3.1 Introducción

En el Primer Capítulo de este trabajo de Tesis, se ha reunido evidencia a favor de que el gen *sm8* posee un origen ancestral remoto dentro de la clase de las alfa-proteobacterias. La amplia distribución que presenta el gen dentro de este grupo de bacterias con tan extensa diversidad biológica, en conjunto con la elevada conservación de rasgos secuenciales y estructurales que el transcripto Sm8 mantiene, lo postula como un elemento con un elevado potencial funcional aún desconocido que amerita ser sujeto a estudio.

La información experimental en lo que respecta al sRNA Sm8 en *S. meliloti* con la que disponíamos al momento de dar inicio al presente Trabajo era limitada, sólo habiéndose caracterizado su patrón de expresión en diferentes condiciones de crecimiento saprofito y su abundancia celular bajo el sometimiento de los rizobios ante un conjunto de estreses abióticos (Valverde, *et al.*, 2008, Sobrero & Valverde, 2011). Sabíamos que durante la vida libre de los rizobios, Sm8 se acumula en la fase estacionaria de crecimiento durante su cultivo en los medios complejo TY y definido RDM, alcanzando niveles intracelulares significativamente más elevados en este último (Valverde, *et al.*, 2008, Sobrero & Valverde, 2011). Por su parte, la caracterización del patrón de expresión del ortólogo de *sm8* en *C. crescentus* había sido llevada a cabo, revelando en consonancia con los hallazgos en rizobios, la acumulación del transcripto ortólogo principalmente durante la fase estacionaria de crecimiento (Landt, *et al.*, 2008). Sin mayor información disponible de carácter experimental relativa a genes homólogos de *sm8*, la coherencia presentada por los resultados descriptos consideramos representaba un refuerzo adicional a la hipótesis planteada inicialmente acerca de la existencia de un rol funcional conservado.

Debido a la dualidad que presenta *S. meliloti* respecto a su estilo de vida, que se ve acompañada por marcadas diferencias en torno a aspectos de su metabolismo y fisiología, decidimos segmentar el proceso de caracterización funcional del gen *sm8*, dando inicio en primer lugar al estudio de su rol biológico durante la vida libre de los rizobios.

En el presente Capítulo se exponen los resultados del estudio de la función del sRNA Sm8 a través de la adopción de una estrategia de genética reversa de búsqueda y caracterización de fenotipos asociados a la alteración la actividad intracelular del riboregulador durante el desarrollo planctónico de los rizobios.

3.2 Materiales y Métodos

3.2.1 Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en este Capítulo se listan en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1 Cepas bacterianas utilizadas en el presente capítulo.

Cepa	Genotipo	Referencia o fuente
<i>S. meliloti</i>		
2011	Cepa silvestre, Str ^R	(Meade & Signer, 1977)
2011 $\Delta sm8$	2011 mutante en el gen <i>sm8</i>	Este trabajo
2011RI $\Delta sm8$ pSRK-Sm8	2011RI $\Delta sm8$ portando pSRK-sinRpsinI-Sm8 *	Este trabajo
2011RI $\Delta sm8$ pSRK-control	2011RI $\Delta sm8$ portando pSRK-sinRpsinI-control *	Este trabajo
2011 <i>psm8-gfp</i>	2011 portando una copia única cromosomal de una fusión reportera transcripcional de <i>psm8</i> a <i>gfp</i>	Ceizel Borella <i>et al.</i> (no publicado)

* La descripción de las características los plásmidos mencionados se brinda en la equivalente sección correspondiente al Capítulo 1

3.2.2 Medios y condiciones de cultivo

Las cepas de *S. meliloti* fueron cultivadas a 28°C en medio complejo TY (*tryptone yeast*, triptona 5 g l⁻¹, extracto de levadura 3 g l⁻¹, CaCl₂·2H₂O 0,7 g l⁻¹; (Beringer, 1974)), o en medio RDM (RDM, *Rhizobium Defined Medium*, sacarosa 5 g l⁻¹, MgSO₄·7H₂O 0.25 g l⁻¹, KNO₃ 0.6 g l⁻¹, CaCl₂·2H₂O 100 mg l⁻¹, FeCl₃ anhidro 6 mg l⁻¹, H₃BO₃ 3 mg l⁻¹, MnSO₄·H₂O 1.7 mg l⁻¹, ZnSO₄·7H₂O 0.3 mg l⁻¹, NaMo₄·2H₂O 0.12 mg l⁻¹, CoCl₂·6H₂O 0.065 mg l⁻¹, K₂HPO₄ 1 g l⁻¹, KH₂PO₄ 1 g l⁻¹, biotina 1 mg l⁻¹, tiamina 10 mg l⁻¹; adaptado de (Vincent, 1970)). Cuando fue requerido, los antibióticos fueron suministrados a los medios de cultivo en las siguientes concentraciones: estreptomina 400 µg ml⁻¹, kanamicina 100 µg ml⁻¹, tetraciclina 5 µg ml⁻¹. La calidad y cantidad de fuente de N en la composición del medio RDM fueron oportunamente modificadas a través del intercambio de KNO₃ por NH₄Cl, conjuntamente con la adición de MOPS (ácido 3-N-morfolino propanosulfónico) 10 g l⁻¹ y el ajuste del pH a un valor de 7,2.

3.2.3 Determinación de curvas de crecimiento planctónico bacteriano en *batch* mediante determinaciones de densidad óptica a 600 nm y recuento de células viables.

Se crecieron las células de cada cepa en 30 ml del medio de cultivo correspondiente a 28°C y con agitación continua de 200 rpm. Los cultivos se iniciaron inoculando con células provenientes de pre-cultivos saturados en medio TY, las cuáles fueron colectadas mediante centrifugación a 7500×g durante 3 min y lavadas una vez con el medio fresco

correspondiente. En cada caso, se inocularon cantidades equivalentes de células para normalizar las concentraciones bacterianas iniciales. A diferentes tiempos luego de la inoculación, se estimó el crecimiento celular mediante la determinación espectrofotométrica de la densidad óptica a 600 nm de los cultivos, diluyendo con solución fisiológica (NaCl 0,9 % p/v) cuando fue necesario para obtener medidas de entre 0,1 y 0,8 unidades de DO_{600} , rango en el que la absorbancia medida como consecuencia de la dispersión que experimenta el haz de luz al atravesar la muestra, se considera proporcional a la concentración de células en la misma. Se realizaron en cada caso tres cultivos paralelos independientes de cada cepa en cada condición, y se promedió la DO_{600} medida para obtener la curva representativa. Las barras de error en cada punto representan una desviación estándar como indicador del error en la determinación de DO_{600} . Los experimentos se repitieron entre dos y tres veces, obteniéndose resultados similares.

3.2.4 Extracción y purificación de ARN. Ensayos de Northern blot

Los protocolos empleados se detallan en la sección Materiales y Métodos del Capítulo 2. Las condiciones de cultivo en las que se colectaron las muestras se describen oportunamente en la sección de Resultados y Discusión del presente Capítulo.

3.2.5 Medida de la actividad de fusión transcripcional *psm8*-GFP

Inmediatamente *a posteriori* de realizada la determinación espectrofotométrica de DO_{600} (según se indica en la sección previa), se colectaron 450 μ l de cada una de las muestras medidas y se colocaron en pocillos de una placa de poliestireno de 48 posiciones (Greiner Bio-One GmbH, Alemania). Se determinó la fluorescencia producida por GFP en cada muestra mediante la determinación de la intensidad de la luz de $\lambda=520$ nm emitida luego de la excitación de la misma con un haz de luz monocromático de $\lambda=395$ nm. Se utilizó para realizar las determinaciones de modo semi-automatizado un lector de placas POLARstar OMEGA (BMG Labtech, Alemania). La señal se amplificó con un valor de ganancia programado en 800 unidades. La intensidad de fluorescencia medida en un pocillo conteniendo medio de cultivo sin inocular se utilizó como blanco de fluorescencia emitida.

3.2.6 Determinación cuantitativa del contenido celular de glucógeno

La determinación del contenido celular de glucógeno se realizó según Lodeiro *et al.* (Lodeiro, *et al.*, 1994). Se colectaron las células en fase estacionaria por centrifugación a $7.500\times g$ durante 10 minutos. Los *pellets* celulares se lavaron dos veces con solución fisiológica. Posteriormente, las células se resuspendieron en 250 μ l de una solución 50% KOH e hirvieron durante 45 minutos. Las muestras se dejaron enfriar y se precipitó cuantitativamente el glucógeno mediante el agregado de 3 volúmenes de etanol absoluto. Se incubó la mezcla en un baño con hielo durante 10 minutos, y luego se centrifugaron a $14.000\times g$ durante 10 minutos. A continuación se retiró el sobrenadante, el sedimento se secó al aire, y se resuspendió finalmente en 100 μ l de agua destilada. Para la determinación de azúcares mediante el método de antrona, se prepararon diluciones acuosas 1:10 de cada una de las soluciones de glucógeno. Se incubaron 500 μ l de cada dilución con 1 ml de la

solución 0,2% antrona en 95% ácido sulfúrico a 100°C durante 10 minutos y se procedió a la determinación espectrofotométrica de la absorbancia de las soluciones a 620 nm. En paralelo, se realizó una curva de calibración usando diluciones de una solución de glucosa patrón. Para referir los valores como masa de glucógeno se consideró la conversión 1,8 mg glucosa = 1,62 mg glucógeno. Los valores finales se relativizaron al recuento celular y se expresaron como pg de glucógeno por célula. Las determinaciones se realizaron por triplicado biológico a partir de cultivos independientes de cada cepa.

3.2.7 Determinación cuantitativa del contenido celular de PHB

Se determinó el contenido de PHB celular a través de su tinción con la sonda fluorescente Rojo de Nilo (Gorenflo, *et al.*, 1999) y la cuantificación mediante citometría de flujo de la fluorescencia total emitida por célula (Ratcliff, *et al.*, 2008, Shakeri, *et al.*, 2011). Se colectaron aprox. 5×10^6 células por centrifugación de una alícuota de cultivo y se lavaron con buffer fosfato salino (PBS). Las determinaciones se realizaron por triplicado biológico a partir de cultivos independientes de cada cepa. Para permeabilizar las células y permitir el ingreso del colorante Rojo de Nilo se incubaron en una solución 35% etanol en PBS durante 15 minutos. Posteriormente se centrifugaron, lavaron una vez con buffer PBS, y resuspendieron en 500 μ l de buffer. Se realizó la tinción con 20 μ l de una solución 1% Rojo de Nilo en DMSO en incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos. Inmediatamente luego se analizaron las muestras mediante citometría de flujo en un equipo FACSCalibur (Benton Dickinson, EEUU), excitando con un láser de argón de $\lambda=488$ nm y 15 mW. La fluorescencia del Rojo de Nilo se determinó en el canal FL2 (filtro con ancho de banda 585 ± 42 nm). La fluorescencia de fondo en bacterias teñidas con Rojo de Nilo es mínima (Kacmar, *et al.*, 2006). Se registró la dispersión frontal (FSC, *forward-scattered light*) y lateral (SSC, *side-scattered light*) de la luz incidente de cada evento. Se registraron los parámetros indicados sobre un total de 100.000 eventos. El análisis se hizo mediante el software FlowJo (FlowJo, LLC, EEUU), a través del cual se calculó la media geométrica y desviación estándar poblacional de cada parámetro medido. Se obtuvieron valores arbitrarios de fluorescencia que permitieron el cálculo de acumulación relativa de PHB entre las poblaciones celulares sujetas a comparación.

3.2.8 Determinación del peso seco microbiano

Se centrifugó una alícuota del cultivo a $14.000 \times g$ durante 10 minutos. Se realizaron dos lavados de las células con solución fisiológica y se retiró el líquido remanente. Se incubaron los *pellets* celulares a 105°C durante 12-24 horas y se determinó su peso seco en balanza analítica.

3.2.9 Cuantificación de proteínas totales celulares

La determinación del contenido de proteínas totales se realizó mediante el método del ácido bicinonínico (BCA) (Smith, *et al.*, 1985, Reyna & Wall, 2014). Las muestras se prepararon según se describe a continuación. Se centrifugó una alícuota de cada cultivo a $14.000 \times g$ durante 10 minutos y se descartó el medio de cultivo. Se resuspendió el *pellet*

celular en tampón de carga de Laemmli (Laemmli, 1970) sin azul de bromofenol (120 mM Tris/HCl pH 6,8; 2% SDS; 10% glicerol) y se incubó la suspensión a 100°C durante 10 minutos para favorecer la lisis celular.

Se colocaron 10 µl de cada muestra en pocillos de una microplaca de 96 posiciones. Cada muestra fue procesada por triplicado. Se agregaron en cada pocillo 200 µl de la solución de trabajo (10 g l⁻¹ bicinconinato de sodio; 20 g l⁻¹ Na₂CO₃; 1,6 g l⁻¹ tartrato de sodio; 4 g l⁻¹ NaOH; 9,5 g l⁻¹ NaHCO₃; 40 g l⁻¹ CuSO₄.5H₂O; pH 11,25) y se homogeneizó inmediatamente para dar comienzo a la reacción. Se cubrió la placa e incubó a 37°C durante 2 horas. Se leyó la absorbancia de cada pocillo a 562 nm utilizando el lector de multiplaca POLARstar OMEGA (BMG Labtech, Alemania). Paralelamente, se realizó una curva de calibración procesando del mismo modo un conjunto de diluciones seriadas de un patrón de seroalbúmina bovina (BSA) de concentraciones comprendidas en el rango de linealidad del ensayo (62,5 a 1250 µg ml⁻¹). Los valores se relativizaron al recuento celular y se expresaron como pg de proteínas totales por célula.

3.2.10 Microscopía electrónica de transmisión de células en cultivo líquido

Alícuotas de cultivos en medio RDM fueron sometidas a tinción negativa con acetato de uranilo (2% p/v) durante 5 minutos, y se observaron de forma directa con 20.000× aumentos mediante el uso del microscopio electrónico de transmisión JEOL/JEM 1200 EX II en el Servicio de Microscopía de la Facultad de Ciencias Veterinarias (Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina). Cuando se consideró oportuno, se generó registro digital de las observaciones, hasta tanto se fotografiaron 100 bacterias de cada muestra.

3.3 Resultados y Discusión

3.3.1 Caracterización del efecto de la mutación del gen *sm8* sobre las características de crecimiento planctónico de *S. meliloti*.

Para dar inicio al estudio del rol biológico del sRNA Sm8 en *S. meliloti* se analizó en primer lugar si la mutación en el gen afecta el desempeño de *S. meliloti* 2011 durante el crecimiento planctónico. Se analizaron las características de crecimiento en medio de cultivo definido RDM, condición establecida inicialmente como referencia en base a la información disponible respecto de los niveles de acumulación del transcrito (Valverde, *et al.*, 2008, Sobrero & Valverde, 2011).

El análisis comparativo del comportamiento de la cepa mutante *sm8* respecto al de la cepa salvaje durante el crecimiento en medio definido RDM puso en evidencia un fenotipo diferencial, el cual se manifestó como un incremento relativo de la DO_{600} en los cultivos de la cepa mutante respecto a los valores que presentaron en similares condiciones los cultivos de la cepa salvaje (Fig. 1A). Esta diferencia se estableció durante la transición entre las fases exponencial y estacionaria de cultivo, y se mantuvo con el progreso de la curva y durante la etapa de saturación. En el transcurso de la etapa de crecimiento exponencial, sin embargo, no se observó diferencia significativa entre las propiedades del crecimiento de ambas cepas (Tabla 3.2). La cinética de crecimiento se ensayó de acuerdo a lo indicado en la sección Materiales y Métodos, en base a la determinación de la evolución de las DO_{600} de ambos cultivos a lo largo del tiempo.

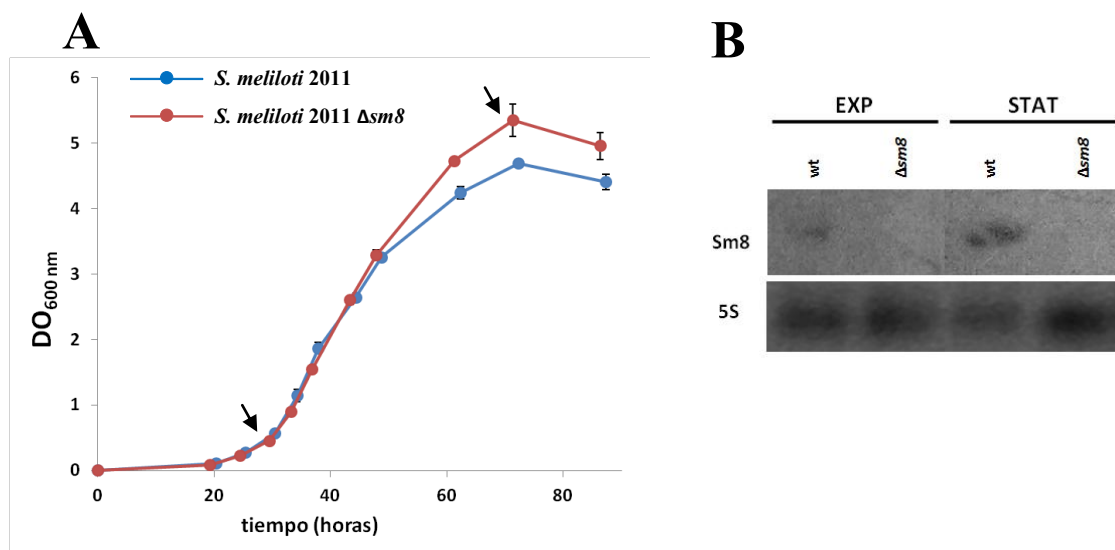


Figura 1. (A) Cinéticas de crecimiento en medio definido RDM de las cepas isogénicas de *S. meliloti* 2011 silvestre y $\Delta sm8$. Las curvas representan los valores promedio obtenidos a partir de tres cultivos independientes. Las barras de error indican la desviación estándar entre los valores promediados. Los resultados son representativos del comportamiento observado al repetir el ensayo más de 5 ocasiones. Se indican mediante flechas negras los puntos sobre la curva en los que se cuantificó la abundancia de Sm8 en ambas cepas (ver panel B). **(B) Acumulación del sRNA Sm8 en *S. meliloti* 2011 silvestre y mutante $\Delta sm8$ durante la fase exponencial (EXP) y estacionaria (STAT) de crecimiento en medio RDM.** Se muestran los resultados del análisis de *Northern blot*. La imagen fue sujeta a ajustes de brillo y contraste, para maximizar la visualización de las bandas.

Tabla 3.2 Tiempo de duplicación exponencial de las cepas de *S. meliloti* 2011 salvaje y $\Delta sm8$ en medio definido RDM.

Cepa	Tiempo de duplicación (horas) ¹
<i>S. meliloti</i> 2011	3.35 ± 0.09 ^a
<i>S. meliloti</i> 2011 $\Delta sm8$	3.21 ± 0.06 ^a

¹ Los tiempos de duplicación fueron estimados a partir del tratamiento de los datos correspondientes a las curvas de crecimiento mostradas en la Figura 1. Cada valor representa el promedio de tres cultivos independientes ± desviación estándar. El experimento fue repetido tres veces, obteniéndose resultados equivalentes. El superíndice indica que no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos de duplicación de las cepas.

La comparación de los parámetros de crecimiento en medio RDM se llevó a cabo adicionalmente entre la cepa de sobreexpresión constitutiva *S. meliloti* 2011 pSUP-Sm8 y su respectivo control portando el plásmido pSUP104 vacío. El análisis de las cinéticas correspondientes reveló que no existen diferencias significativas en la tasa de duplicación exponencial, aunque se observó un menor rendimiento en términos de la OD₆₀₀ producto de la sobreexpresión del sRNA. Estos resultados, en concordancia con el efecto asociado a la mutación en el gen *sm8*, revelan que los rizobios, al menos en términos del análisis de los parámetros fisiológicos globales de crecimiento, se mostrarían refractarios frente a la expresión forzada de Sm8 durante el crecimiento exponencial (resultados no mostrados, ver Fig. 1 del Capítulo 4).

Evidencias experimentales recientes que fueron obtenidas por miembros de nuestro grupo (Ceizel Borella *et al.*, aún no publicado) indican que la regulación de la expresión de Sm8 sería ejercida -al menos- en dos niveles. Por un lado, el abandono del crecimiento exponencial, independientemente de la causa que lo promueve, representa una situación fisiológica que conduce a la inducción del promotor *sm8*. Sin embargo, cuando la limitación del crecimiento se debe particularmente al agotamiento de la fuente de nitrógeno, un segundo nivel de regulación se impone y acentúa notablemente el encendido del promotor del gen, consecuentemente incrementando la acumulación del transcripto Sm8.

En este marco mencionaremos que durante el crecimiento en el medio definido RDM es el nitrógeno el nutriente que resulta limitante para el crecimiento, y cuyo agotamiento determina el cese de la fase exponencial. Este hecho fue confirmado experimentalmente verificando que el solo aumento del contenido de nitrógeno en la formulación del medio de cultivo se traduce en un mayor rendimiento proporcional de los cultivos en términos de biomasa (resultados no mostrados).

Con el propósito de evidenciar si existe una correlación temporal durante el crecimiento planctónico entre la magnitud de la diferencia de acumulación del transcripto Sm8 que se presenta entre las cepas salvaje y mutante, y la manifestación del fenotipo diferencial entre dichas cepas descrito anteriormente, se cuantificó de forma continua a lo

largo del crecimiento en las condiciones previamente ensayadas la actividad del promotor del gen *sm8* (*psm8*) en *S. meliloti* 2011, haciendo uso de una cepa reportera isogénica portando en copia única cromosomal una fusión transcripcional del promotor *sm8* con el marco abierto de lectura de la proteína fluorescente verde, GFP; esta construcción fue generada y provista por Ceizel Borella *et al.* (aún no publicado).

De acuerdo a lo indicado, se evaluó entonces el patrón de expresión a nivel transcripcional del gen *sm8* durante el crecimiento de *S. meliloti* en medio RDM. En la Figura 2, se observa que durante el crecimiento exponencial en este medio existe un grado de expresión basal a partir de *psm8*, presentándose luego una etapa de fuerte inducción en la actividad promotora que coincide temporalmente con la transición entre las fases de crecimiento exponencial y lineal, momento en que comienza a ser manifiesto el fenotipo diferencial entre las cepas salvaje y mutante *sm8*, y se extiende con el avance de la curva. Este resultado concuerda con los ensayos de *Northern blot* expuestos anteriormente (Fig. 1B) y los resultados reportados por Valverde *et al.* y Sobrero *et al.* (Valverde, *et al.*, 2008, Sobrero & Valverde, 2011) respecto a la acumulación de Sm8 durante el crecimiento planctónico en este medio de cultivo.

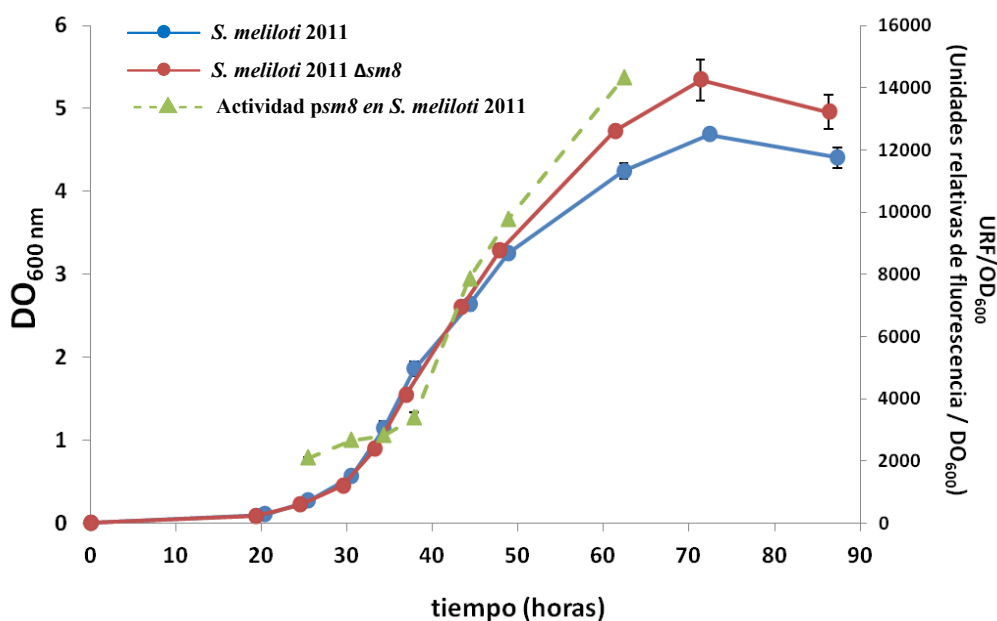


Figura 2. Correlación temporal entre la inducción de *psm8* en *S. meliloti* 2011 y la manifestación del fenotipo diferencial en $\Delta sm8$. Las curvas representan los valores promedio obtenidos a partir del análisis de tres cultivos independientes. Las barras de error indican la desviación estándar entre los valores individuales promediados.

3.3.2 La inducción de Sm8 en la cepa $\Delta sm8$ complementa de forma completa el fenotipo mutante.

Con el propósito de confirmar que la alteración en el comportamiento que experimenta la cepa mutante no se debe a efectos polares derivados de la mutación sobre la expresión de los genes vecinos sino que se encuentra asociada al propio cambio en la actividad del sRNA, resultó imperativo demostrar que es posible la complementación del fenotipo en esta cepa a partir de la expresión controlada del sRNA. La estrategia adoptada para tal propósito se basó en la expresión del transcripto Sm8 a partir de una copia del gen ubicada en *trans* e inducible por IPTG (el diseño y funcionamiento del sistema se detalla en el Capítulo 2). Con el propósito de imitar el patrón de expresión del gen en la cepa salvaje, se indujo la expresión de *sm8* con IPTG cuando los cultivos alcanzaron una $OD_{600} \approx 1,7$ (Fig. 3A). Paralelamente, como control se registró el progreso de la cinética de crecimiento sobre fracciones de los cultivos sin inducir (Fig. 3B). Como se observa en la Figura 3, la expresión de *sm8* en el contexto genómico mutante restableció de forma completa el fenotipo silvestre. Por el contrario, la inducción del sRNA asRNA812 utilizado como control no alteró el curso de las cinéticas de crecimiento de las cepas salvaje y mutante (Fig. 3A). Estos resultados confirman inequívocamente que el fenotipo observado en la cepa $\Delta sm8$ es consecuencia específica de la ausencia de actividad del sRNA Sm8.

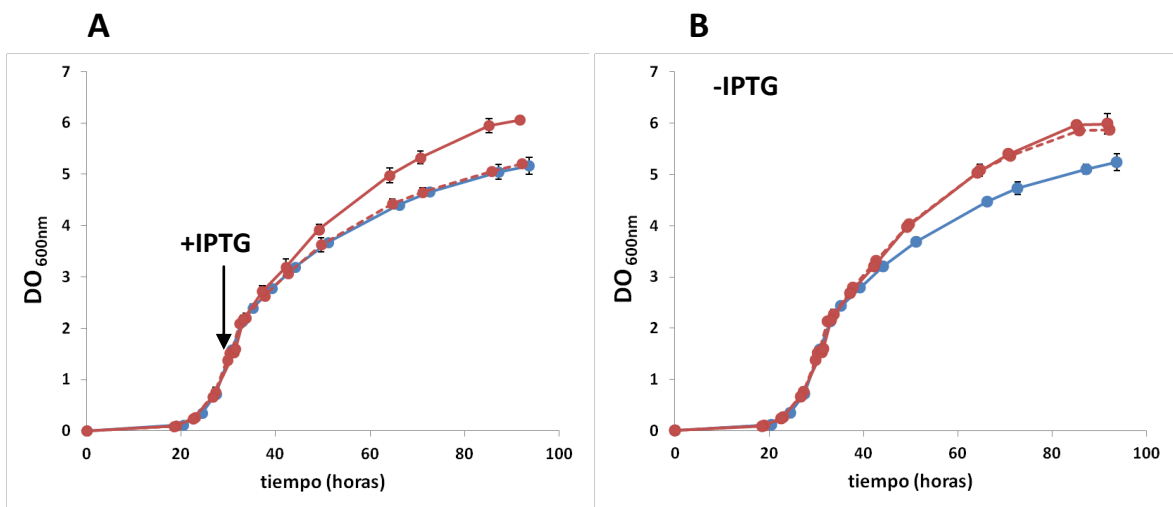


Figura 3. Ensayo de complementación de la cepa mutante $\Delta sm8$. Determinación de la cinética de crecimiento en medio RDM de las cepas *S. meliloti* 2011RI pSRK-812 (—●—), 2011RI $\Delta sm8$ pSRK-control (—●—) y 2011RI $\Delta sm8$ pSRK-Sm8 (- - - ● - - -). (A) Los cultivos fueron inducidos con 500 μ M IPTG cuando alcanzaron una $DO_{600} = 1,7$. (B) No se adicionó inductor. Las curvas representan los valores promedios obtenidos a partir del análisis de tres cultivos independientes. Las barras de error indican la desviación estándar entre los valores individuales promediados.

3.3.3 En condiciones de limitación de nitrógeno y exceso de carbono, *S. meliloti* $\Delta sm8$ acumula mayor biomasa celular que la cepa salvaje.

Con el propósito de comprender las bases celulares del fenotipo descrito, se exploró en primer lugar la correlación entre la DO_{600} y el recuento de células viables a lo largo de las curvas de crecimiento de las cepas salvaje y mutante en medio RDM. Sorpresivamente, observamos que la cinética que presenta la concentración de células viables en los cultivos de ambas cepas es equivalente, a pesar del desfase observado en las respectivas curvas de DO_{600} (Fig. 4).

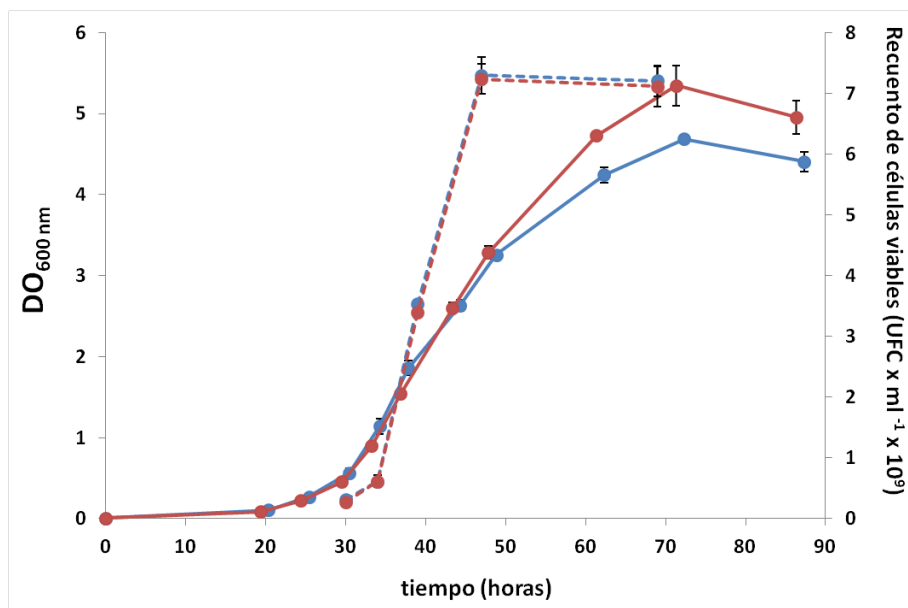


Figura 4. Comparación de las cinéticas de crecimiento basadas en el recuento de células viables (líneas punteadas) y en el seguimiento de la DO_{600} (líneas continuas) de cultivos de *S. meliloti* 2011 salvaje (●) y $\Delta sm8$ (●) en medio RDM. Las curvas que se muestran representan el promedio de los valores obtenidos a partir de 3 réplicas biológicas de los cultivos de cada cepa. Las barras de error indican la desviación estándar entre los valores individuales promediados.

La magnitud de luz de $\lambda=600$ nm dispersada por una suspensión bacteriana, o DO_{600} , resulta un excelente estimador del contenido de biomasa por unidad de volumen del cultivo (Harris & Kell, 1985). Ambas magnitudes guardan, dentro de un cierto rango, una correlación lineal. Más aún, si se trata de una población celular de tamaño y forma homogénea, es válido asumir la proporcionalidad entre la DO_{600} y la densidad celular en el cultivo (Koch, 1961).

En estos términos, se plantean múltiples hipótesis que permitirían la interpretación de los resultados expuestos previamente, sobre la base común establecida de que existe una mayor acumulación progresiva de biomasa celular en el cultivo de la cepa mutante respecto al cultivo de la cepa salvaje al abandonar la fase de crecimiento logarítmico en medio RDM, fenómeno que responde específicamente a la actividad intracelular del sRNA Sm8 en ese estadio del crecimiento.

La primera hipótesis se basa en la asunción de la existencia de equivalencia morfológica entre las poblaciones de células salvajes y mutantes. Considerando la igualdad de los recuentos de células viables en sendos cultivos saturados, cabría esperarse la presencia de una población de células no viables que ganaría representatividad en el cultivo de la cepa mutante respecto al de la cepa silvestre al finalizar el crecimiento exponencial, permitiendo de este modo explicar el desfase que se establece entre el recuento de células viables y la biomasa celular total acumulada en el cultivo de $\Delta sm8$. Para evaluar la validez de esta hipótesis, se realizó una tinción vital, utilizando Ioduro de Propidio y Naranja Tiazol (Nebe-von-Caron, *et al.*, 2000, Nagayoshi, *et al.*, 2004, McHugh & Tucker, 2007), de las células en cultivos en fase estacionaria en medio RDM de las cepas salvaje y mutante, y se cuantificó por citometría de flujo la proporción de la población de células no viables respecto al recuento total en ambos cultivos. La integridad de membrana que presentan las células vivas impide el ingreso del ioduro de propidio al citosol, mientras que el Naranja Tiazol tiñe tanto células vivas como muertas. El análisis por citometría de flujo mostró que no existen diferencias significativas entre la composición poblacional de los cultivos de ambas cepas, siendo despreciable en ambos casos la fracción de células muertas respecto a la de células viables (resultados no mostrados). Este resultado refuta la primera hipótesis, y sugiere en consecuencia que se establecería una diferencia en términos de una mayor acumulación de biomasa celular por parte de las células mutantes respecto a las células salvajes al abandonar el crecimiento exponencial.

Con el propósito de determinar si esta última hipótesis es correcta, se determinó el peso seco celular promedio de las células en cultivos en fase estacionaria en medio RDM de la cepa salvaje y mutante. En la Figura 5 se observa que las células mutantes poseen un 25% mayor biomasa seca que las células de la cepa silvestre en estas condiciones. Paralelamente, para intentar dar luz al posible origen de la diferencia de biomasa acumulada entre las cepas se determinó el contenido de proteínas totales en las células salvajes y mutantes en la condición de crecimiento anteriormente descrita, sirviendo éste como estimador del contenido de biomasa balanceada bacteriana. La comparación del valor correspondiente a este parámetro en células de ambas cepas, nos permitió determinar que el incremento relativo de biomasa que experimenta la cepa mutante no refleja un aumento balanceado de la masa celular, sino que estaría ligado a una mayor acumulación de compuestos de naturaleza no proteica.

Es sabido ya que el metabolismo asociado a la producción de compuestos de reserva en *S. meliloti* se activa durante la vida libre ante diversas condiciones que limitan el crecimiento microbiano y en presencia de un exceso de fuente carbono disponible en el medio de cultivo que sirve de sustrato para la síntesis (Zevenhuizen, 1981).

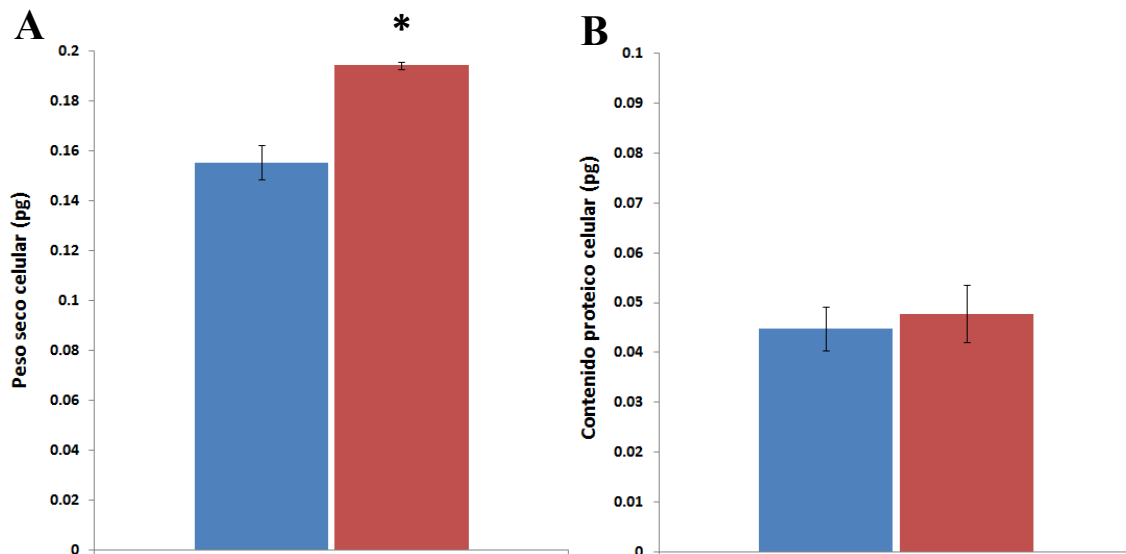


Figura 5. Determinación del peso seco (A) y contenido proteico (B) de células de *S. meliloti* 2011(■) y el mutante isogénico $\Delta sm8$ (■) en fase estacionaria de crecimiento en medio RDM. Los resultados representan el promedio obtenido a través del análisis de 3 réplicas biológicas de cada cepa \pm desviación estándar.

En este punto, haremos una serie de consideraciones breves respecto a la disponibilidad de C en el medio y su utilización por parte de los rizobios. Considerando que los ensayos de crecimiento fueron realizados en su totalidad bajo condiciones aeróbicas, se contempló un rendimiento del uso de C para la producción de biomasa aproximado al 50% respecto al contenido total del nutriente disponible en el medio, siendo el 50% restante del C en su mayor parte eliminado durante la respiración celular bajo la forma de dióxido de carbono, y en menor proporción utilizado para la síntesis de exopolisacáridos y otros productos de excreción (Gonzalez, *et al.*, 1996). De aquí en adelante, el contenido de C que se especifique en un medio de cultivo hará siempre referencia a la fracción de éste que se haya destinada a la generación de biomasa. Por último, adoptaremos como referencia la aproximación universalmente aceptada que establece que la disponibilidad de C y N en una relación molar C:N 5 a 1 se encuentra balanceada para la producción de biomasa microbiana.

En el marco del vínculo que hemos hallado entre los niveles de expresión que presenta *sm8* y la generación de biomasa de reserva en *S. meliloti*, nos preguntamos si el estado fisiológico celular asociado a la etapa de transición de fases del cultivo es condición suficiente para que las células sean sensibles al aumento de la concentración intracelular de Sm8, o si es necesaria adicionalmente la disponibilidad de C en exceso durante esa etapa del crecimiento para modular la respuesta celular a la actividad del sRNA. Según surge del análisis de la composición del medio de cultivo RDM, la relación C:N presenta un valor de 15:1 (6 mM N y 90 mM C). Este hecho representa un exceso de C de 3 veces respecto a la cantidad suficiente para poder metabolizar la totalidad del N disponible.

Para buscar dar luz al interrogante, se modificó la relación C:N del medio de cultivo RDM con el propósito de balancear ambos nutrientes, de modo que ambos resultasen limitantes y se agotasen en forma simultánea. Para balancear la relación molar C:N en un valor 5:1, se triplicó el contenido de N total respecto al correspondiente a la composición original del medio, fijando de este modo una concentración de N de 18 mM.

Como se observa en la Fig. 6B, la condición de crecimiento bajo balance de C y N suprimió completamente el fenotipo mutante. Es interesante destacar el hecho que al analizar el patrón de expresión de *sm8* bajo estas condiciones de crecimiento, se observa la inducción del promotor al finalizar la etapa exponencial, simultánea al agotamiento del C y N. Esta observación nos permite establecer que la expresión de Sm8 obedece a estímulos que son independientes de la propia producción de reservas, aunque la diferencia en la magnitud de la actividad promotora de *psm8* que se determinó en ambas condiciones sugiere que podría existir un componente modulador positivo sobre su activación posiblemente mediado por la presencia de biomasa de reserva acumulada. Esto último es coherente en el marco de una posible función como modulador de la síntesis de reservas.

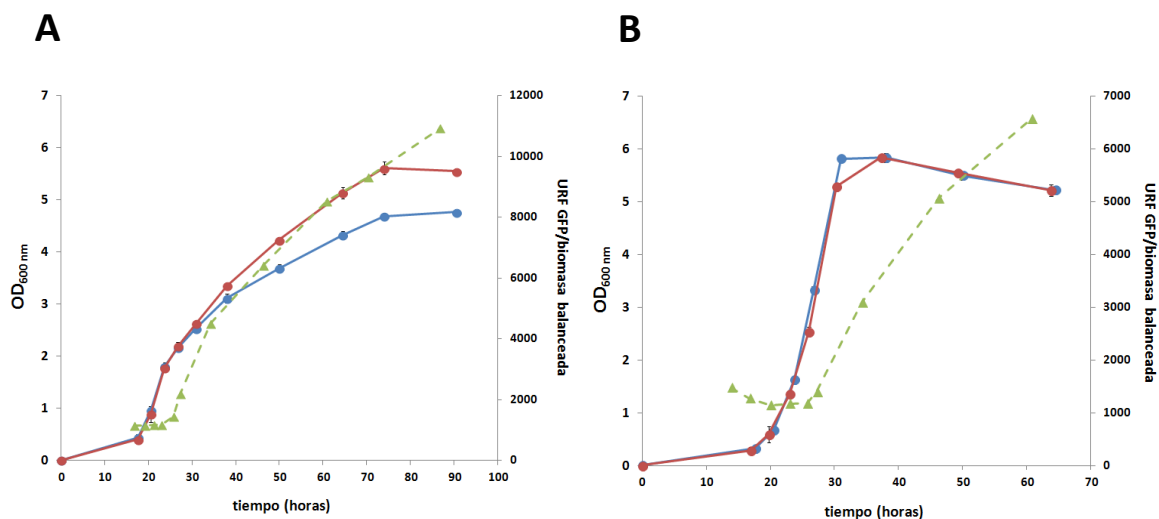


Figura 6. Cinéticas de crecimiento de *S. meliloti* 2011 (—●—) y su mutante isogénico $\Delta sm8$ (—●—) en medio RDM bajo condiciones de exceso en el balance C:N (A), o medio RDM bajo condiciones de C:N balanceadas (B). La actividad del *psm8* (—▲—) se determinó mediante el uso de la fusión transcripcional a *psm8*-GFP como se indicó previamente. Los valores de Unidades Relativas de Fluorescencia (URF) se relativizaron en cada punto a la DO_{600} corregida, considerando que en (A) el incremento de biomasa balanceada en el cultivo satura al alcanzar la DO_{600} un valor de 2 (saturación de la concentración de proteínas totales, datos no mostrados), y que el posterior incremento de este parámetro es consecuencia de la acumulación de compuestos de reserva. En (B), puesto que C y N se hallan balanceados, la DO_{600} es un directo indicador del contenido de biomasa balanceada a lo largo de la extensión completa de la curva. Las curvas representan los valores promedio obtenidos a partir del análisis de tres cultivos independientes. Las barras de error indican la desviación estándar entre los valores individuales promediados.

Hemos demostrado que la eliminación del exceso de C durante el cese del crecimiento exponencial suprime el fenotipo de acumulación diferencial de biomasa por parte de la cepa mutante. Para reunir mayor evidencia a favor de la dependencia del fenotipo mutante con la disponibilidad de carbono durante el período de transición de fases de crecimiento, se evaluó si un incremento en la concentración de carbono disponible al cesar la fase de crecimiento logarítmica repercutía sobre la magnitud del fenotipo mutante. Con tal propósito, se duplicó el contenido de C durante la formulación del medio de cultivo respecto al valor original (elevando de esta manera la relación C:N a 30:1), y se caracterizó el crecimiento de las cepas silvestre y mutante $\Delta sm8$ bajo estas condiciones. Tal como se observa en la Figura 7, si bien el aumento de la concentración de C en el medio de cultivo no afectó significativamente el desarrollo de la curva de crecimiento de la cepa salvaje, por su lado el mutante alcanzó una mayor DO_{600} al ingresar en la fase estacionaria. Se observa que independientemente de la magnitud del exceso de C presente durante el cese del crecimiento, la cepa silvestre limita la metabolización del exceso de C hacia la generación de reservas (y su consecuente aumento de DO_{600}), en tanto que, si bien aún no está claro qué factor bioquímico se ve alterado ante la ausencia de Sm8, la cepa mutante no ejerce el límite en la misma medida y acumula una mayor cantidad de biomasa ante una mayor disponibilidad de sustrato.

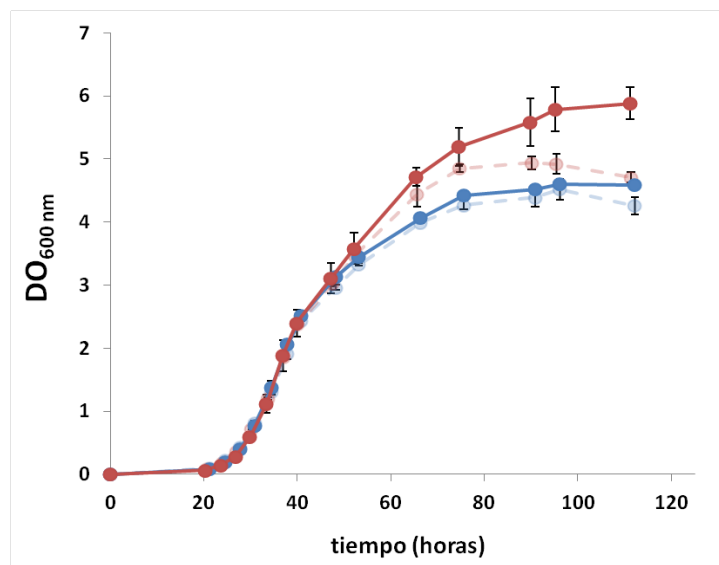


Figura 7. Efecto de la duplicación del contenido de C en el medio de cultivo RDM (C:N 15:1 → 30:1) sobre la acumulación de biomasa en fase estacionaria por parte de *S. meliloti* 2011 salvaje (30:1: —●—, 15:1: - -●- -) y $\Delta sm8$ (30:1: —●—, 15:1: - -●- -). Las curvas representan los valores promedio obtenidos a partir del análisis de tres cultivos independientes. Las barras de error indican la desviación estándar entre los valores individuales.

3.3.4 Sm8 y la acumulación de compuestos de reserva en *S. meliloti*.

Durante el estilo de vida libre y en condiciones de limitación del crecimiento, se sabe que *S. meliloti* habilita las vías de síntesis de glucógeno y polihidroxibutirato (PHB), como principales compuestos de almacenamiento de carbono y energía (Zevenhuizen, 1981). La síntesis de PHB se considera que actúa además como amortiguador del balance redox celular constituyendo una reserva de poder reductor (Trainer & Charles, 2006). La generación de reservas de C y energía bajo la forma de PHB en condiciones de crecimiento saprofito se ha demostrado que permite sostener la duplicación y, por mecanismos de diferenciación fenotípica a nivel poblacional, mejorar el *fitness* y la supervivencia de la población de rizobios ante situaciones de inanición prolongadas (Ratcliff, *et al.*, 2008, Ratcliff & Denison, 2010).

En virtud de los resultados previamente expuestos en este Capítulo, a través de los que se demuestra que la actividad de Sm8 impacta sobre la acumulación de biomasa de reserva en *S. meliloti*, nos preguntamos de qué naturaleza serían los compuestos acumulados diferencialmente en la cepa mutante $\Delta sm8$. Abordamos este interrogante a través de la cuantificación del contenido de glucógeno y de PHB en células salvajes y mutantes $\Delta sm8$ presentes en cultivos saturados en medio RDM.

En primer lugar se determinó el contenido de glucógeno intracelular. De acuerdo a lo que se observa en la Figura 8, no se establece una diferencia significativa entre el contenido de glucógeno que acumulan ambas cepas. Este resultado indica por lo tanto, que no sería el glucógeno el responsable del incremento de biomasa que experimenta la cepa mutante ante la disminución de los niveles de Sm8 y que conduce al fenotipo descripto.

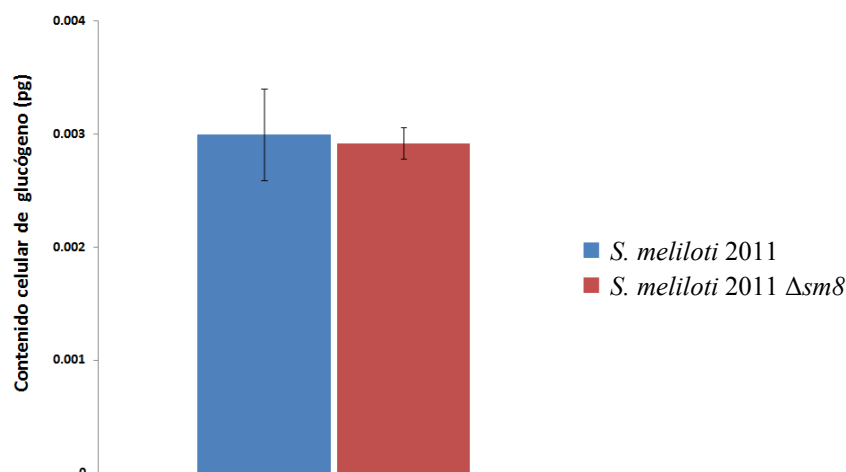


Figura 8. Determinación de las reservas de glucógeno en *S. meliloti* 2011 salvaje y $\Delta sm8$. Los valores que se muestran corresponden al promedio de los resultados del análisis del contenido del polímero en células colectadas a partir de tres cultivos independientes. No se observaron diferencias significativas según el Test estadístico de Student con un $p < 0,05$.

En segundo lugar, procedimos a la determinación del contenido intracelular de PHB a través de su tinción con el fluoróforo específico Rojo de Nilo (Degelau, *et al.*, 1995, Gorenflo, *et al.*, 1999), seguido de la cuantificación de la fluorescencia emitida por célula, mediante el análisis de la población por citometría de flujo. Según ha sido demostrado por Ratcliff y colaboradores, los valores obtenidos a partir de la determinación cuantitativa de PHB en rizobios por cromatografía gaseosa (Braunegg, *et al.*, 1978) tienen una excelente correlación lineal con los resultados de su medición a través de la fluorescencia que emite el complejo que forma con el Rojo de Nilo ($p < 0,0001$, $r^2 = 0,95$) (Ratcliff, *et al.*, 2008).

Se determinaron los niveles de PHB en *S. meliloti* 2011 y su mutante isogénico $\Delta sm8$ luego de 24 y 48 hs de haber abandonado el crecimiento exponencial (post-log). Se buscó de esta forma esclarecer si existe una dinámica diferencial en el proceso de acumulación de PHB en ambas cepas luego del agotamiento de la fuente de N. Tal como se observa en la Figura 9, el análisis citométrico reveló que la cepa mutante logra acumular en promedio una masa intracelular de PHB aproximadamente un 55% mayor que la acumulada por la cepa silvestre.

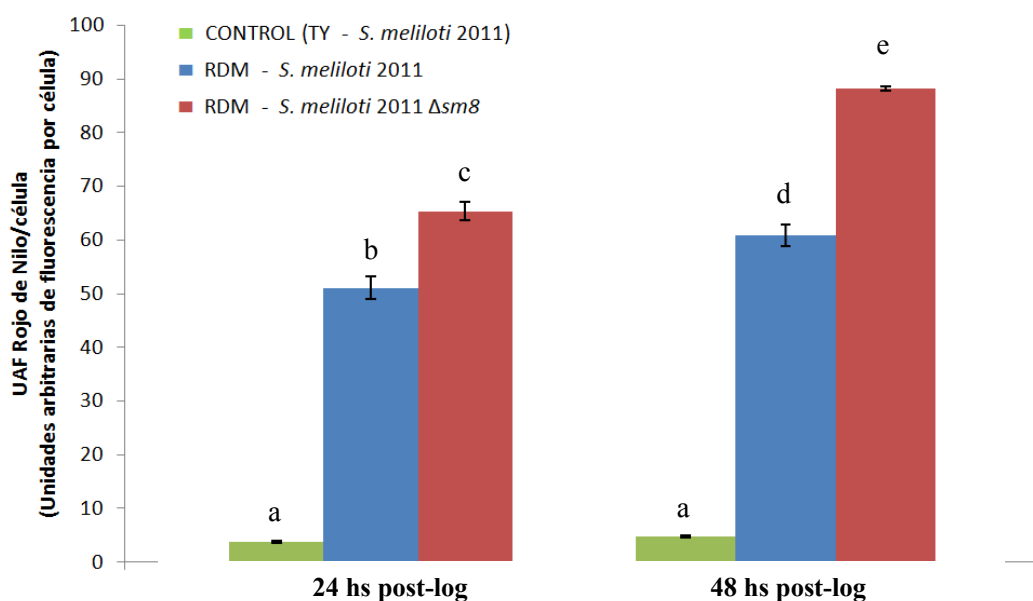


Figura 9. Determinación del contenido intracelular promedio de PHB en células de cultivos estacionados de *S. meliloti* 2011 y el mutante isogénico $\Delta sm8$. El ensayo se llevó a cabo luego de la tinción con Rojo de Nilo de las células en suspensión y la posterior cuantificación de la fluorescencia celular emitida mediante citometría de flujo. Como control, se grafica en color verde el contenido de PHB correspondiente a la población de células de *S. meliloti* 2011 obtenidas a partir de cultivos saturados en medio TY donde no ocurre acumulación de PHB. Los resultados corresponden al promedio de los valores obtenidos a partir tres cultivos independientes de cada cepa. Se grafica en cada caso el valor promedio de la fluorescencia emitida por las células de cada población de rizobios \pm desviación estándar (valores registrados a partir de un total de 100.000 eventos procesados). Los triplicados de los datos de cada cepa y el control en cada condición fueron estadísticamente comparados a través de un test de ANOVA seguido por un test de comparaciones múltiples de Tukey. Diferentes superíndices indican que los promedios fueron estadísticamente significativos con un $p < 0,05$.

Una ventaja que aporta la determinación de PHB por citometría de flujo respecto de los métodos tradicionales de cuantificación del polímero, es que permite visualizar el grado de heterogeneidad en la distribución del contenido del mismo por célula, y en nuestro caso en particular, visualizar cómo el perfil del histograma se desplaza como consecuencia de la mutación introducida en el gen *sm8* (Fig. 10A). Por otro lado, considerando la naturaleza hidrofóbica del polímero y su tendencia a la formación de inclusiones lipídicas insolubles en el citoplasma, se espera que la mayor acumulación intracelular de PHB derive en alteraciones en la morfología de las bacterias. Indirectamente estos cambios fueron confirmados a través del análisis de los parámetros de dispersión frontal (FSC, *forward-scattered light*) y lateral (SSC, *side-scattered light*) de la luz láser por parte de las células, los cuales constituyen estimadores del tamaño y la complejidad celular, respectivamente (Fig. 10, paneles B y C).

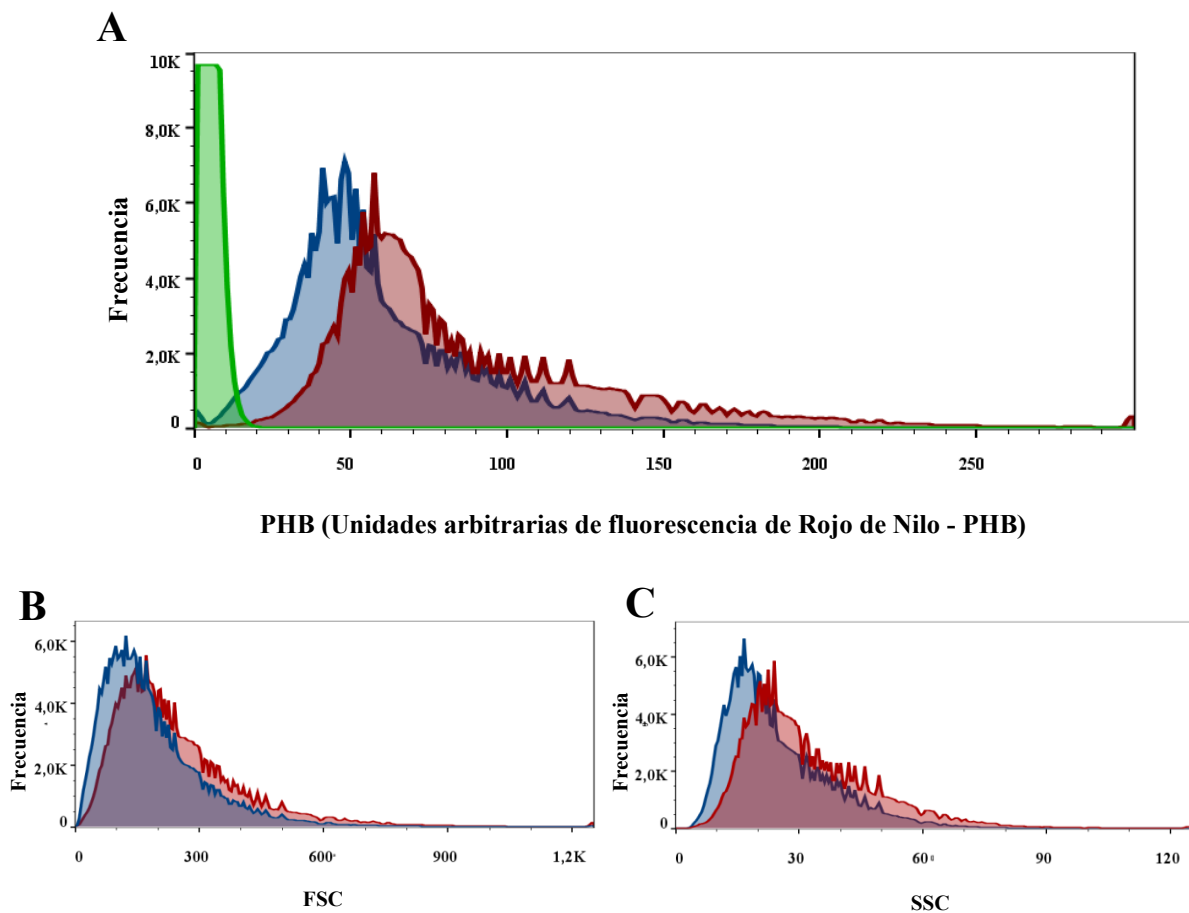


Figura 10. Distribución de la frecuencia de células registradas en las poblaciones de cultivos luego de 48 hs de finalizada la fase exponencial de crecimiento en medio RDM de *S. meliloti* 2011 salvaje (azul) y mutante $\Delta sm8$ (rojo) en función de su contenido de PHB (A), tamaño celular estimado (B), y complejidad intracelular (C). Como control, en (A) se grafica en color verde (verde) la distribución correspondiente a la población de células de *S. meliloti* 2011 obtenidas a partir de cultivos saturados en medio TY donde no ocurre acumulación de PHB. Cada gráfico contiene los eventos totales registrados a partir del procesamiento de tres cultivos independientes de cada cepa.

3.3.5 El análisis ultraestructural comparativo de *S. meliloti* salvaje y $\Delta sm8$ en fase estacionaria de crecimiento confirma diferencias en tamaño y forma de las células, y de los gránulos de reserva intracelulares de características compatibles con PHB.

En virtud de las propiedades que presentan los gránulos de PHB que facilitan su reconocimiento durante la observación de las células mediante técnicas de microscopía electrónica de transmisión (MET) (Ellar, *et al.*, 1968), y con el propósito dar cierre a este Capítulo dando crédito directo de carácter visual a los resultados y el modelo que nos ha permitido explicar el fenotipo presentado por la cepa mutante $\Delta sm8$, llevamos a cabo la observación mediante MET de células de *S. meliloti* 2011 salvaje y $\Delta sm8$ que se encontraban en fase estacionaria del crecimiento en medio RDM, condición que se ha mostrado previamente conduce a la acumulación diferencial de PHB (Fig. 9).

El análisis ultraestructural reveló diferencias morfológicas marcadas entre células de ambas poblaciones. En primer lugar, las células mutantes presentaron una relación largo/ancho un 20% superior a las células salvajes (sobre el análisis de un total de 100 células escogidas al azar en las imágenes, y con una significancia estadística $p < 0,05$). En segundo lugar, la inspección cualitativa de las células mutantes mostró un claro y notable aumento en el número de gránulos con características compatibles con PHB en su citoplasma, aunque de tamaño y morfología heterogénea (Fig. 11B), en comparación a las células salvajes que presentaron por su parte, entre 4 y 6 gránulos del compuesto con bordes bien definidos (Fig. 11A).

Estas observaciones confirman por tanto los hallazgos previos en relación a la desregulación metabólica que sufren los rizobios y deriva en una mayor acumulación de PHB en ausencia del sRNA Sm8.

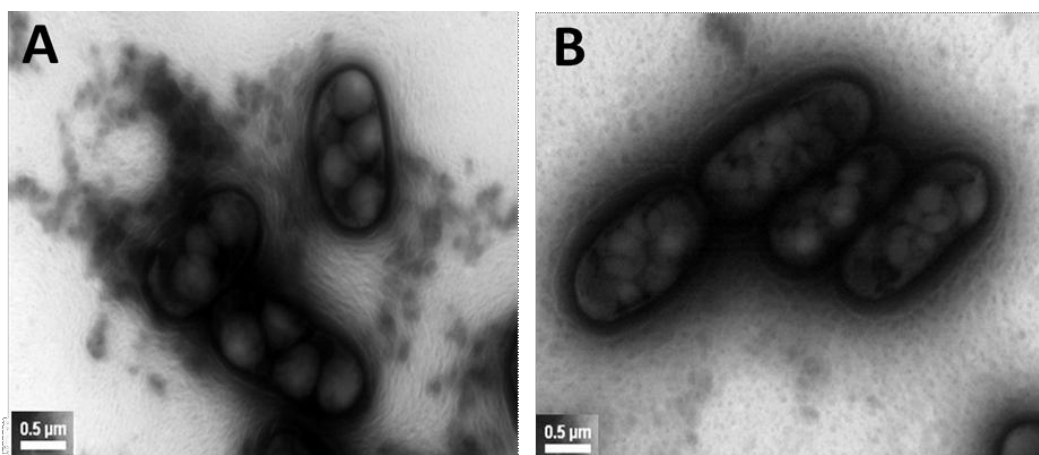


Figura 11. Análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión de células de *S. meliloti* 2011 (A) y su mutante isogénico $\Delta sm8$ (B) provenientes de cultivos estacionados en medio RDM. Las inclusiones intracelulares transparentes al haz de electrones son compatibles con gránulos de PHB. Estas imágenes son representativas de una población de más de 100 células de cada cepa que fue registrada.

3.4 Conclusiones

En el presente capítulo se dio inicio al abordaje de la caracterización del rol del ARN pequeño Sm8 en la vida libre de los rizobios. A través del estudio comparativo del comportamiento de un conjunto de cepas isogénicas de *S. meliloti* 2011 en las que se alteró la concentración intracelular de Sm8 se logró establecer un vínculo entre la actividad intracelular del sRNA y el flujo metabólico de C hacia la acumulación de reservas bajo la forma de polihidroxibutirato (PHB). Por el contrario, la acumulación de proteínas y la generación de glucógeno no se vieron afectadas tras los cambios en la actividad de Sm8.

Hemos descrito que la mutación en el gen *sm8* deriva en una mayor acumulación de PHB ante la limitación de N en el medio de cultivo y en presencia de exceso de fuente de C. En estas condiciones, la expresión del ARN en la cepa parental limita la acumulación del compuesto de reserva, independientemente de la magnitud del exceso de C disponible en el medio. La acumulación diferencial del polímero y su impacto sobre la morfología celular fueron confirmados de modo complementario a través de su observación directa en las células mediante microscopía electrónica de transmisión.

Resta aún esclarecer si la acción del sRNA impacta de forma directa sobre las vías de síntesis o degradación de PHB, o si los cambios en la acumulación de este compuesto son consecuencia de alteraciones metabólicas que conducen a un incremento en el flujo de C hacia su síntesis. La alteración del estado redox celular ($[NAD(P)H]/[NAD^+]$) o el cambio en la relación $[acetil-CoA]/[CoA]$ se han descrito como los principales factores metabólicos que en bacterias regulan la partición del flujo de C a partir de acetil-CoA hacia el ciclo de Krebs o la síntesis de PHB (Haywood, *et al.*, 1988, Lee, *et al.*, 1995, Kessler & Witholt, 2001), sin embargo, regulaciones en estos puntos del metabolismo creemos hubiesen sido puestas de manifiesto a través de alteraciones en la tasa de crecimiento exponencial en presencia de la sobreexpresión constitutiva del sRNA. Debido a que no se observaron cambios fisiológicos asociados al incremento en la actividad de Sm8 durante el crecimiento logarítmico, podría alternativamente hipotetizarse que Sm8 ejercería específicamente la regulación sobre las vías exclusivas de flujo de C hacia PHB en condiciones en las que por razones de mayor rango jerárquico fisiológico, la síntesis de este compuesto se encuentra estimulada. Es posible especular que Sm8 sería capaz de regular la actividad del modulón de síntesis y/o degradación del polímero, de esta forma controlando la permisividad para la acumulación del mismo. Para dar luz a este interrogante, resultará propicio llevar adelante el estudio de las bases moleculares que subyacen al fenotipo descrito. En este sentido, en el Capítulo siguiente se dará lugar al abordaje ómico de la caracterización del regulón asociado a Sm8.

Es importante remarcar que el fenotipo hallado es el primero que se reporta asociado a la pérdida de función de un sRNA en rizobios. El abordaje que ha sido hasta el momento utilizado para llevar adelante la caracterización funcional de riboreguladores en este grupo de especies ha sido principalmente de carácter molecular, a través de la caracterización de sus regulones ómicos y en algunos casos, la demostración de la

interacción directa del sRNA por apareamiento de bases con su(s) mRNA blanco, sin hallar correlación entre modelos de regulación surgidos de las evidencias experimentales con fenotipos biológicos asociados la mutación del regulador (Torres-Quesada, *et al.*, 2013, Torres-Quesada, *et al.*, 2014). Comprender los procesos metabólicos que un sRNA modula y bajo qué condiciones lo hace, es un determinante crítico en el avance hacia la comprensión del rol funcional del gen en la biología de la bacteria.

La exploración del regulón molecular asociado al sRNA Sm8 posiblemente dará lugar al hallazgo de determinantes que sugieran nuevos procesos biológicos que se encuentran regulados por Sm8 durante la vida libre de los rizobios y que no han sido evidenciados en el presente estudio. Esta información sentará las bases para la futura ampliación del abordaje que se ha llevado a cabo en el presente Capítulo.

CAPÍTULO 4

Caracterización del regulón del sRNA Sm8 a través del uso de herramientas transcriptómicas y proteómicas.

4.1 Introducción

Según hemos demostrado en el capítulo precedente, la actividad del sRNA Sm8 en *S. meliloti* se halla vinculada con la regulación del flujo de C hacia la acumulación del polímero PHB en condiciones de limitación de nitrógeno que normalmente estimulan la síntesis de compuestos de reservas (Zevenhuizen, 1981). Con el propósito de comprender las bases moleculares que subyacen al fenómeno observado, hemos llevado a cabo un abordaje de alcance ómico, a través de la caracterización de los cambios que ocurren en el transcriptoma y proteoma de *S. meliloti* ante alteraciones en la concentración intracelular del sRNA. Se espera que el estudio de los perfiles globales de expresión génica permita esclarecer, al menos parcialmente, los determinantes moleculares del rol fisiológico de Sm8 y por tanto de los fenotipos que de los cambios en su actividad derivan.

La aproximación transcriptómica al estudio del regulón de un sRNA es frecuentemente de primera elección debido a las ventajas que provee ésta como método de *screening*, principalmente por su bajo costo, y por el gran potencial que aportan sus resultados en calidad de orientadores, brindando una visión general del impacto de la actividad de una molécula reguladora sobre el perfil de expresión génica global de una célula (Sharma, *et al.*, 2011). Por el contrario, esta técnica presenta limitaciones derivadas de la incapacidad de poner de manifiesto los eventos regulatorios que son de carácter netamente traduccional, en las cuales no ocurre modificación en los niveles del transcripto que se halla regulado (Morita, *et al.*, 2006, Trainer & Charles, 2006).

En razón de las consideraciones que se han mencionado, y con el propósito de validar los resultados del análisis transcriptómico, hemos implementado una estrategia experimental complementaria a través de la exploración de la dinámica que se presenta en el proteoma de *S. meliloti* ante las modificaciones en la actividad de Sm8. Se partió de la hipótesis que los eventos regulatorios mediados por Sm8 se traducen, por mecanismos de diferente naturaleza, en cambios en la abundancia de proteínas que modifican en última instancia el estado metabólico y fisiológico de *S. meliloti*. Es esperable en principio que en la mayor parte de los casos el análisis proteómico refleje de buen modo los cambios que ocurren a nivel transcriptómico.

En el presente Capítulo, se presentan y discuten los resultados que se han obtenido a partir del abordaje ómico al estudio del regulón del sRNA Sm8.

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

Las cepas bacterianas utilizadas en este Capítulo se listan en la Tabla 4.1. La descripción de los oligonucleótidos utilizados en este Capítulo se brinda en la sección 2.2.1.

Tabla 4.1 Cepas bacterianas utilizadas en el presente capítulo *.

Cepa	Genotipo, características	Referencia o fuente
<i>S. meliloti</i>		
2011	Cepa silvestre, Str ^R	(Meade & Signer, 1977)
2011 $\Delta sm8$	2011 mutante en el gen <i>sm8</i>	Este trabajo
2011 pSUP104- <i>sm8</i>	2011 portando pSUP104- <i>sm8</i>	Este trabajo
2011 pSUP104	2011 portando pSUP104	Este trabajo

* La descripción de las características de los plásmidos mencionados en esta Tabla se brinda en la sección equivalente correspondiente al Capítulo 2.

4.2.2 Medios y condiciones de cultivo

Las cepas de *S. meliloti* fueron cultivadas a 28°C en medio complejo TY (*tryptone yeast*, triptona 5 g l⁻¹, extracto de levadura 3 g l⁻¹, CaCl₂·2H₂O 0,7 g l⁻¹; (Beringer, 1974)). Durante los ensayos de transcriptómica comparativa, las cepas de rizobios se crecieron en medio VMM (*Vincent's Modified Medium*, manitol 10 g l⁻¹, MOPS 10 g l⁻¹, MgSO₄·7H₂O 0.246 g l⁻¹, NH₄Cl 1 g l⁻¹, CaCl₂·2H₂O 37 mg l⁻¹, FeCl₃ anhidro 6 mg l⁻¹, H₃BO₃ 3 mg l⁻¹, MnSO₄·H₂O 1.7 mg l⁻¹, ZnSO₄·7H₂O 0.3 mg l⁻¹, NaMo₄·2H₂O 0.12 mg l⁻¹, CoCl₂·6H₂O 0.065 mg l⁻¹, K₂HPO₄ 0.348 g l⁻¹, biotina 1 mg l⁻¹; adaptado de (Vincent, 1970)). Los cultivos para el análisis proteómico se llevaron a cabo en medio RDM (RDM, *Rhizobium Defined Medium*, sacarosa 5 g l⁻¹, MgSO₄·7H₂O 0.25 g l⁻¹, KNO₃ 0.6 g l⁻¹, CaCl₂·2H₂O 100 mg l⁻¹, FeCl₃ anhidro 6 mg l⁻¹, H₃BO₃ 3 mg l⁻¹, MnSO₄·H₂O 1.7 mg l⁻¹, ZnSO₄·7H₂O 0.3 mg l⁻¹, NaMo₄·2H₂O 0.12 mg l⁻¹, CoCl₂·6H₂O 0.065 mg l⁻¹, K₂HPO₄ 1 g l⁻¹, KH₂PO₄ 1 g l⁻¹, biotina 1 mg l⁻¹, tiamina 10 mg l⁻¹; adaptado de (Vincent, 1970)). Cuando fue requerido, los antibióticos fueron suministrados a los medios de cultivo en las siguientes concentraciones: estreptomicina 400 µg ml⁻¹, tetraciclina 5 µg ml⁻¹, kanamicina 100 µg ml⁻¹.

4.2.3 Transcriptómica. Ensayos de microarreglos de ADNc

4.2.3.1 Extracción y purificación del ARN total de *S. meliloti*

Para la realización de ensayos de transcriptómica comparativa, el ARN total de *S. meliloti* se preparó a partir de cultivos en fase exponencial de crecimiento, colectando aproximadamente 5×10⁸ células por centrifugación a 7500×g durante 5 min a temperatura ambiente. Las células se resuspendieron en 1 ml de QIAzol (QIAGEN, Alemania), y se lisaron usando un homogeneizador FastPrep®-24 (MP Biomedicals, EEUU) durante 30

segundos en nivel 5. Se recuperó el sobrenadante de la lisis por centrifugación a 10.000×g durante 1 min a 4°C, y se incubó la solución durante 15 min a temperatura ambiente. Se agregaron 200 µl de cloroformo, se homogeneizó la mezcla, y se incubó en reposo sobre mesada durante 3 min. Luego se centrifugó a 4°C durante 15 min a 12.000×g para separar las fases. Posteriormente se recuperó la fase acuosa y se procedió a la purificación del ARN mediante el uso del kit miRNeasy (QIAGEN, Alemania), de acuerdo al protocolo especificado por el fabricante. Para eliminar el ADN genómico contaminante, el ARN purificado se trató con 10 U de DNasa I (Fermentas) durante 1 hora a 37°C. La enzima fue removida y se purificó el ARN mediante extracción una solución de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y posterior precipitación alcohólica, siguiendo el protocolo descrito en (Sambrook, 1989). El ARN obtenido se utilizó para los ensayos de microarreglos de ADNc y de RT-PCR en tiempo real.

4.2.3.2 Síntesis de ADN complementario

El ARN de las muestras correspondientes a la condición experimental y al control fueron retrotranscriptos de acuerdo al protocolo descrito por Rüberg *et al.* (Rüberg, *et al.*, 2003). 2-15 µg de ARN de cada muestra se incubaron con cebadores hexaméricos de secuencia aleatoria amino-modificados en su extremo 5'- terminal (10 µg) a 70°C durante 10 min, luego se transfirió la mezcla a 0°C para favorecer la hibridación de los cebadores. Inmediatamente se agregó el tampón de reacción, una solución de dNTPs conteniendo aminoalyl-dUTP (12.5 mM dATP, 12.5 mM dCTP, 12.5 mM dGTP, 2.5 mM dTTP, 10 mM aa-dUTP) para el posterior acoplamiento del cDNA sintetizado con la sonda fluorescente correspondiente, y 300 U de transcriptasa reversa Bioscript (Bioline, Alemania). Se incubó la mezcla de reacción a 42°C durante 90 min y se conservó luego a -20°C. Para controlar la generación de ADNc durante la reacción, se llevó a cabo un análisis electroforético en gel de agarosa 1,5% de una alícuota del producto de reacción, en el que se determinó un corrimiento hacia mayor peso molecular, consecuencia de la hibridación ADNc-ARN, del patrón de bandas observados previamente en el análisis electroforético de las muestras de ARN utilizadas como molde para la transcripción reversa.

Se procedió luego a la hidrólisis del ARN molde, incubando las mezclas de reacción durante 10 min a 70°C con NaOH en una concentración final 0.1 M. Se neutralizó inmediatamente la mezcla de reacción adicionando una cantidad equivalente de HCl, y se procedió a la purificación del ADNc mediante el uso del kit QIAquick Nucleotide Removal (QIAGEN, Alemania), siguiendo las instrucciones del comerciante. El ADNc se eluyó de la columna con 60 µl de una solución de NaHCO₃ 0,1 M pH = 9. Se determinó su concentración por espectrofotometría UV utilizando un equipo NanoDrop (Thermo Scientific, EEUU).

4.2.3.3 Acoplamiento de sonda fluorescente Cy3 o Cy5 al ADNc

El ADNc sintetizado y purificado fue acoplado en cada caso al marcador fluorescente correspondiente Cy3 o Cy5, siendo uno de ellos usado para marcar el ADNc correspondiente a la condición experimental, y el otro para marcar el ADNc correspondiente a la condición control. Para controlar un posible efecto dependiente del tipo de marcador fluorescente utilizado, se alternó el esquema de asignación de marca a las condiciones experimental y control entre réplicas biológicas de un mismo ensayo. El acoplamiento se realizó a través de la incubación del ADNc con el éster NHS-Cy3 o NHS-Cy5, según el caso, en oscuridad, a temperatura ambiente durante 60 min. Finalmente se llevó a cabo el *quenching* del exceso de sonda presente en la mezcla mediante tratamiento de la solución con hidroxilamina durante 15 min en oscuridad a temperatura ambiente, y se purificó el ADNc marcado mediante el uso del kit QIAquick Nucleotide Removal (QIAGEN, Alemania), siguiendo las instrucciones del comerciante.

4.2.3.4 Hibridación de las muestras con el microarreglo de ADNc. Adquisición digital de imágenes.

Los procedimientos descritos en la presente y en la siguiente sub-sección (hibridación y escaneo de los microarreglos) fueron realizados por el personal técnico capacitado del laboratorio -Werner Biggot y Barbara Herte- y de forma semi-automatizada con un equipo HS400 Pro Hybridization Station (Tecan, Suiza). La prehibridación de los microarreglos se llevó a cabo por 45 min a 42°C en Easyhyb Hybridization Solution (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), suplementada con 5 µg/ml de ADN de esperma de salmón sonicado, y se realizaron una serie de lavados previos a la incubación con las muestras de ADNc marcadas a hibridar. La hibridación fue llevada a cabo a 42° durante 16 hs en Easyhyb Hybridization Solution suplementada con 50 µg/ml de ADN de esperma de salmón sonicado. Luego de la etapa de hibridación, los microarreglos fueron lavados una vez en solución 2×SSC (Sambrook, 1989), 0,2% p/v SDS (1 min, 42°C); 2 veces en solución 0.2×SSC, 0.1% p/v SDS (1 min, 24°C); 2 veces en solución 0.2×SSC (1 min, 24°C); y una vez en solución 0.05×SSC (1 min, 21°C). Finalmente, los microarreglos se secaron por centrifugación a 1200rpm durante 3-5 min a 20°C. Luego se mantuvieron privados de la luz hasta su escaneo. Se escanearon utilizando un escáner Genepix 4000B Microarray Scanner (Molecular Devices) con un tamaño de pixel de 10 µm.

4.2.3.5 Procesamiento y análisis de los datos

Las imágenes obtenidas a partir del escaneo de los microarreglos fueron procesadas con el software ImaGene 8 (Biodiscovery, EEUU) para obtener la intensidad de señal media y de señal media de fondo de cada sonda fluorescente (canales 1 y 2) en cada una de las posiciones (*spots*) del microarreglo. La intensidad media fue calculada para cada spot i como $A_i = \log_2 (R_i/G_i)^{0.5}$. El valor \log_2 del cociente de las intensidades fue calculado para cada spot i usando la fórmula $M_i = \log_2 (R_i/G_i)$. $R_i = I_{ch1i} - B_{gch1i}$ y $G_i = I_{ch2i} - B_{gch2i}$, donde I_{ch1i} o I_{ch2i} es la intensidad de un spot en el canal 1 o canal 2, y B_{gch1i} o B_{gch2i} es la intensidad

de fondo de un spot en el canal 1 o canal 2, respectivamente. Los valores M_i fueron normalizados utilizando el algoritmo de normalización lowess, y los genes significativamente desregulados se determinaron mediante el análisis estadístico de Student *t*. El procesamiento de los datos se realizó usando la plataforma bioinformática para el análisis de datos transcriptómicos EMMA 2.8.2 (CeBiTec, Bielefeld, Alemania) (Dondrup, *et al.*, 2003). Los marcadores que presentaron un $p < 0,05$ se consideraron aptos para el análisis, sin embargo, se impuso mayor rigurosidad estadística al tratamiento de los transcritos diferencialmente expresados, filtrando solo aquellos cuyo valor $p \leq 0,001$, y valor $M \leq -1,00$ o $\geq 1,00$.

4.2.4 Ensayos de RT-qPCR

El protocolo utilizado se indica oportunamente en la Sección Materiales y Métodos del Capítulo 2. La lista de oligonucleótidos se describe en la Tabla 2.1 del Capítulo 2.

4.2.5 Ensayos de proteómica cuantitativa comparativa basada en marcación isotópica diferencial.

4.2.5.1 Marcado isotópico diferencial con $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. Lisis bacteriana y subfraccionamiento celular de proteínas.

Ambas poblaciones bacterianas de *S. meliloti* cuyos proteomas estarían sujetos a comparación se cultivaron en medio RDM conteniendo $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ o $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, respectivamente, como única fuente de nitrógeno. En todos los ensayos, tres cultivos independientes de cada población bacteriana fueron procesados como réplicas biológicas independientes. Las condiciones de cultivo en las que se colectaron las muestras celulares para el análisis se detallan en la Fig. 4 (sección Resultados y Discusión del presente Capítulo). Alícuotas de cada cultivo conteniendo 32 unidades de DO_{600} fueron mezcladas con su respectivo par para la comparación proteómica, y la suspensión se incubó en hielo durante 5 minutos, y se centrifugó a $7500\times g$ durante 3 min a 4°C . El *pellet* bacteriano se conservó a -80°C . La extracción y preparación de proteínas se realizó a través de un subfraccionamiento celular en fracción citosólica y fracción membrana, con el objetivo de disminuir la complejidad de las muestras para el análisis por espectrometría de masa. El *pellet* se resuspendió en 3 ml de buffer de lisis (10 mM MgCl_2 ; 10 μg de DNasa I; 5 μg RNasa A; 20 mM Tris/HCl pH 8,0) y se pasó 3 veces por la prensa francesa a 20.000 psi. Para descartar las células no lisadas, el extracto celular se centrifugó a $10.000\times g$ durante 5 min a 4°C . El extracto conteniendo los restos celulares se ultracentrifugó a $160.000\times g$ durante 90 min a 4°C , obteniendo en el sobrenadante la fracción de proteínas solubles y en el *pellet*, la fracción insoluble enriquecida en proteínas de membrana. El *pellet* se lavó ligeramente, y luego se resuspendió en 150 μl de buffer 10 mM Tris/HCl pH=8,0 SDS 1%. Se determinó la concentración de proteínas totales a través del ensayo colorimétrico de Bradford (*Bradford Protein Assay Ready-to-use*, BioRad, EEUU) (Bradford, 1976) utilizando una solución de seroalbúmina bovina (BSA) como referencia.

4.2.5.2 Ensayos de SDS-PAGE

La calidad de las preparaciones de proteínas se analizó mediante SDS-PAGE con gradiente de acrilamida 4-12% (Laemmli, 1970). Se sembraron en cada calle del gel 10 µg de proteínas totales de la muestra correspondiente, previamente diluida en buffer de siembra Laemmli (Laemmli, 1970). Las proteínas en el gel fueron detectadas por tinción con *Coomasie blue* (Coomasie brillant Blue R-250 1 g L⁻¹; ácido acético 5% v/v; metanol 50% v/v). Los geles se incubaron en solución de *Coomasie* a temperatura ambiente durante la noche, y se destiñeron mediante una serie de lavados sucesivos con solución decolorante (ácido acético 10% v/v; etanol 25% v/v). El registro digital se realizó sobre transiluminador con luz blanca.

4.2.5.3 Precipitación acetónica de las subfracciones proteicas

Para disminuir los niveles de agentes contaminantes (sales, detergentes, componentes celulares de bajo peso molecular) que pudiesen afectar los pasos posteriores, las proteínas contenidas en cada fracción fueron precipitadas con acetona. 100 µg de proteína de cada fracción se precipitaron mediante la adición progresiva de 3 alícuotas de 2 volúmenes de acetona fría cada una, homogenizando la suspensión entre cada agregado. Las mezclas se incubaron durante la noche a -20°C. La adición fraccionada de acetona causa que la solución se torne nubosa sin formarse grandes agregados proteicos, esto último mejora el rendimiento de la digestión posterior (Duan, *et al.*, 2009). Las mezclas se centrifugaron a 12.000×g durante 20 min a 4°C y se descartaron los sobrenadantes. Los *pellets* se secaron al aire durante 3-5 min, y se conservaron a -20°C hasta ser procesados.

4.2.5.4 Digestión triptica *on-pellet*. Reducción y alquilación de los péptidos

La digestión triptica de las proteínas de cada muestra realizada para obtener los péptidos que serían luego separados e identificados por espectrometría de masa, se llevó a cabo a partir de los *pellets* obtenidos por precipitación acetónica. Cada *pellet* se resuspendió en 50 µL buffer Tris 50 mM pH 8,5; y se le agregó a la solución resultante una cantidad de 1:60 p/p de tripsina (Qu, *et al.*, 2010). La mezcla se agitó vigorosamente por 30 seg, se centrifugó brevemente para colectar el contenido del tubo en el fondo del mismo, y se incubó a 37°C durante 2 hs con agitación de 120 rpm. Se realizó luego un segundo agregado de 1,7 µg de tripsina y se incubó la mezcla con agitación por 5 hs. Para proceder a la reducción de los péptidos, se adicionó DTT (0,7 µmol) y se incubó a 95°C durante 10 min. La protección de los grupos tiol libres se llevó a cabo mediante adición de 2,8 µmoles de iodoacetamida e incubación a 37°C durante 1 h. Para titular el exceso de iodoacetamida, se agregaron de 2,8 µmoles de DTT y se incubó la solución a 37°C durante 1 h. Se agregaron finalmente 4 µg de tripsina y se completó la digestión durante la noche incubando la solución a 37°C.

4.2.5.5 Desalado de muestras. Separación de péptidos por nano-HPLC. Espectrometría de masa ESI-MS/MS-Orbitrap®

El análisis por espectrometría de masa fue realizado por el Servicio de Espectrometría de Masa del Departamento de Química de la Universidad de Marburg. Se utilizó un equipo Orbitrap Velos Pro (Thermo-Scientific, EEUU). Un sistema Ultimate nanoRSLC-HPLC (Dionex) equipado con una columna nano-C18-RP se conectó al espectrómetro mediante un sistema de nano-pulverización Proxeon. 1 μl de la digestión triptica se inyectó en la columna cromatográfica. La captura y desalado se llevó a cabo con un flujo de 6 $\mu\text{l min}^{-1}$ de una solución acuosa de la muestra conteniendo ácido fórmico 0,05% v/v. La separación de los péptidos tripticos se realizó mediante un gradiente del solvente B conteniendo ácido fórmico 0,05% v/v en acetonitrilo al 80% v/v. El gradiente se generó a un caudal de 300 nl min^{-1} . Inicialmente se utilizó durante 5 minutos el solvente B al 4% v/v, luego en el curso de los siguientes 30 minutos se elevó linealmente la concentración hasta un 45% v/v, y en 5 minutos finales se incrementó de modo lineal hasta alcanzar un 95% v/v. El eluyente de la columna se pulverizó directamente sobre el capilar precalentado del espectrómetro de masa con un potencial de 2300 V. Se realizó un escaneo inicial con una resolución de 6000 en el analizador de masas Orbitrap con al menos tres escaneos MS/MS independientes. A la vez, se utilizó la función "exclusión dinámica" durante 30 segundos con la trampa de iones lineal, y una resolución de 7500 en la detección mediante el Orbitrap.

4.2.5.7 QuPE. Análisis bioinformático integral de los datos espectrales.

Se cargaron los datos espectrales en el servidor QuPE (Albaum, *et al.*, 2009) de la Universidad de Bielefeld (Alemania). Se llevó a cabo un pre-procesamiento inicial de los espectros aplicando un filtro según los parámetros predeterminados por el servidor. A partir de los espectros filtrados, se procedió a la asignación de identidad de los péptidos mediante el motor de búsqueda Mascot® en la base de datos *S. meliloti*-Decoy (los parámetros empleados; enzima: tripsina con dos sitios no clivados permitidos; tolerancia para péptidos: 10 ppm; masa de precursores permitidas: 12C; cuantificación con marcaje metabólico ^{15}N ; umbral de tolerancia: 0,05; estados de carga permitidos: +2 y +3; instrumento ESI-TRAP; modificaciones variables permitidas: oxidación (M)). Para la anotación de los péptidos que serían sujetos al análisis cuantitativo, se realizó un análisis de FDR (*false discovery rate*), y se filtraron sólo aquellos que superaron el valor umbral de 0,05. La cuantificación de las intensidades de las variantes isotópicas liviana y pesada de cada péptido se llevó a cabo mediante el algoritmo ReLEX-exclusión lineal (MacCoss, *et al.*, 2003) (utilizando los parámetros predeterminados por el servidor QuPE). Se llevó a cabo un análisis estadístico *t* de Student, considerando únicamente los péptidos únicos (con valor $A > 3,5$) anotados de cada proteína *i* para la estimación del valor M_i correspondiente. El valor A se calculó como el producto de la intensidad de los picos de las variantes isotópicas de cada péptido en los cromatogramas construidos a partir del registro de los espectros. El valor M_i representa el $\log_2(\text{abundancia de proteína } i \text{ en cepa } \Delta sm\delta / \text{abundancia de proteína } i \text{ en cepa parental})$.

4.3 Resultados y Discusión

4.3.1 Impacto de la sobreexpresión de Sm8 sobre el transcriptoma de *S. meliloti* 2011

Se comparó el perfil transcripcional de la cepa de sobreexpresión constitutiva de Sm8 con el de su respectivo control durante el crecimiento en fase exponencial en medio definido VMM (Vincent, 1970). En primer lugar se caracterizó el crecimiento de las cepas *S. meliloti* 2011 pSUP-Sm8 y su control isogénico pSUP en este medio de cultivo (Fig. 1A), y se determinaron los niveles intracelulares del transcripto Sm8 mediante ensayos de RT-qPCR (Fig. 1B). Se observó una relación cercana a 20:1 en términos de la concentración del sRNA en la cepa de sobreexpresión respecto a su cepa control durante el crecimiento exponencial. Es notable destacar que el incremento relativo de Sm8 en la cepa de sobreexpresión constitutiva se mantuvo dentro del orden de magnitud fisiológico, considerando que en la cepa silvestre la inducción natural que se produce durante la transición de fases simultáneo al agotamiento de la fuente de N es del orden de 5-10× (ver Capítulo previo).

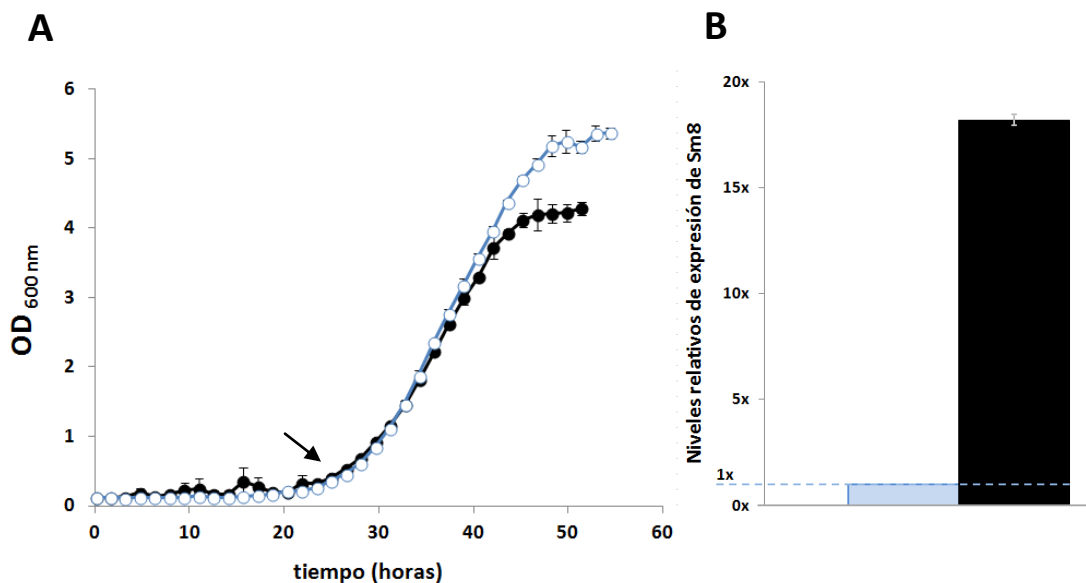


Figura 1. (A) Cinética de crecimiento de *S. meliloti* 2011 pSUP-Sm8 (—●—) y su control isogénico *S. meliloti* 2011 pSUP (—○—) en medio VMM. Se indica con una flecha negra el punto donde fue llevada a cabo la comparación transcriptómica entre ambas cepas. Los valores graficados representan el promedio a partir de 3 cultivos independientes y las barras de error corresponden al valor de una desviación estándar. (B) Expresión relativa de Sm8 en las cepas de sobreexpresión constitutiva (■) y su respectivo control portando el plásmido vacío (□). La cuantificación se llevó a cabo mediante ensayos de RT-qPCR y los resultados que se muestran corresponden al promedio de tres réplicas y las barras de error indican una desviación estándar.

Con el propósito de identificar cambios en la expresión génica consecuentes de la alteración en la actividad de Sm8 pero independientes del fenotipo diferencial asociado que se manifiesta a partir de la transición de fase exponencial a estacionaria (ver Capítulo anterior), llevamos a cabo la exploración transcriptómica en condiciones de crecimiento exponencial. De este modo, esperamos se minimicen los efectos derivados de los cambios fisiológicos que se desencadenarían en las condiciones en las que ocurre una manifestación fenotípica, y toman mayor representación los cambios primarios al incremento de los niveles Sm8.

A través del abordaje transcriptómico hemos podido determinar con significancia estadística ($p \leq 0,05$) la abundancia relativa de los transcritos correspondientes a 2031 genes con función codificante para la síntesis de proteínas (sobre un total de 6207 genes de esta categoría que se encuentran anotados en el genoma de *S. meliloti* 2011) (Fig. 2A). Debe tenerse en cuenta además que no todos los genes que componen el genoma se expresan simultáneamente, sino que sólo una proporción de los mismos está considerablemente activa, en términos generales, aquellos que codifican funciones del tipo *housekeeping*, en conjunto con los que sean adicionalmente requeridos para sustentar el metabolismo en una condición de crecimiento determinada.

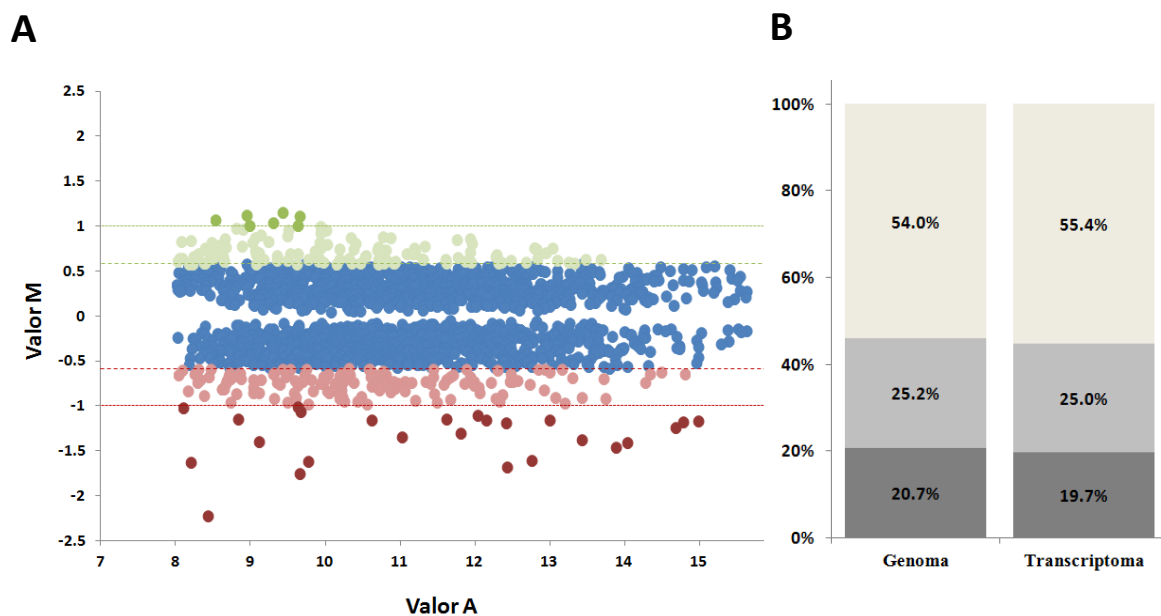


Figura 2. Impacto de la sobreexpresión de Sm8 sobre el transcriptoma de *S. meliloti* 2011. (A) Cada punto en el gráfico representa un transcrito cuya abundancia relativa entre los transcriptomas de la cepa de sobreexpresión y la cepa control ha sido cuantificada con un soporte estadístico significativo ($p < 0,05$). El valor M de un determinado transcrito corresponde al \log_2 (intensidad normalizada del transcrito en la cepa de sobreexpresión / intensidad normalizada del transcrito en la cepa control). El valor A de un determinado transcrito es un indicador de su abundancia absoluta en el transcriptoma. Valores M negativos (demarcados en color rojo) corresponden a transcritos cuya abundancia es menor en la cepa de sobreexpresión, y viceversa (demarcados en color verde). Aquellos transcritos que no presentan diferencias de abundancia entre las cepas se hallan representados en color azul. (B) Distribución de los genes de cuyos transcritos la abundancia relativa fue calculada con parámetros estadísticamente significativos entre réplicas (Test de Student, $p < 0,05$) en los replicones genómicos de *S. meliloti* 2011 (■) pSymA, (■) pSymB y (●) cromosoma, respecto a la distribución total de los genes anotados en el genoma de la especie.

Es importante remarcar que la distribución genómica de los genes cuyos transcritos han sido cuantificados guarda la misma proporción que se establece entre el número de genes pertenecientes a cada replicón respecto al número de genes totales anotados en el genoma de *S. meliloti* (Fig 2B). Esto sugiere que no se produjo un sesgo durante la detección transcriptómica y que la muestra de transcritos que ha sido cuantificada representa una fiel proporción del total de genes que se expresaron en la condición experimental estudiada.

A raíz del vínculo que hemos hallado previamente entre la función del sRNA Sm8 y el metabolismo del N y C, y teniendo en cuenta que, independientemente de la extensión del regulón del sRNA, es de esperarse que los cambios en la expresión de los genes que éste regula sean mayormente de carácter moderado (Hobbs, *et al.*, 2010), resulta interesante llevar a cabo un análisis global de cómo se ve afectada la expresión de genes asociados a los diferentes procesos metabólicos ante la sobreexpresión de Sm8. Para ello, analizamos la distribución de las frecuencias relativas de las categorías COG (*cluster of orthologous genes*) entre: a) los genes que se consideraron moderadamente inducidos ante la sobreexpresión de Sm8; b) genes cuya abundancia se consideró no afectada por los cambios en la concentración de Sm8; c) genes moderadamente reprimidos por el sRNA; y d) genes que se encontraron más fuertemente reprimidos por el sRNA. Esta estrategia permite además elevar la sensibilidad del análisis, ya que en muchos casos existe información relativa a los dominios funcionales presentes en determinadas proteínas que se encuentran anotadas en el genoma de *S. meliloti* (criterio para el agrupamiento en COGs) a pesar de que muchas de ellas no han sido funcionalmente caracterizadas en rizobios.

La exploración a este nivel permitirá por tanto establecer un marco biológico relevante para la discusión e interpretación acerca de la implicancia del grupo reducido de genes que particularmente responden a la actividad de Sm8 de modo más marcado y que posiblemente correspondan a blancos más directamente ligados a la actividad del sRNA.

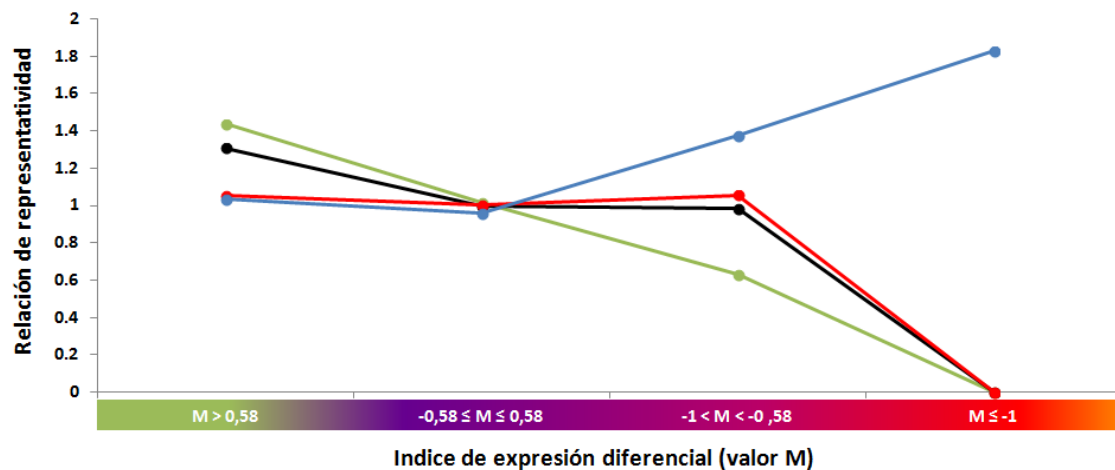


Figura 3. Análisis global del impacto de la sobreexpresión de Sm8 sobre la expresión de genes funcionalmente vinculados al transporte y metabolismo de C y energético (—●—), transporte y metabolismo de aminoácidos (—●—), transporte y metabolismo de nucleótidos (—●—), y al transporte y metabolismo de lípidos (—●—). El índice de representatividad graficado sobre el eje de las ordenadas indica la relación entre la proporción de genes asociados a una función determinada respecto del total de genes en el rango de valor M considerado, respecto a la proporción que representa esa categoría funcional respecto a la totalidad de los genes cuyos transcritos han sido cuantificados. El eje de las abscisas crece conforme disminuye el rango de valores M contemplado, y es acompañado por una transición de colores que varía gradualmente desde el verde (genes levemente inducidos por Sm8, $0,58 < M < 1$), a través del violeta (genes considerados invariantes durante el ensayo, $-0,58 \leq M \leq 0,58$), continuando por el lila (genes levemente reprimidos por Sm8, $-1 < M < -0,58$) hasta el rojo (genes fuertemente reprimidos por Sm8, $M \leq -1$).

A partir del análisis de la Figura 3 podemos observar que entre los genes cuyos transcritos se hallaron moderada y más fuertemente reprimidos ante el incremento de la actividad de Sm8 presentan un incremento en su representatividad aquellos con funciones asociadas al metabolismo y transporte de hidratos de carbono y metabolismo energético. Por el contrario, aquellos genes asociados al metabolismo y transporte de aminoácidos pierden representatividad entre los genes negativamente regulados por Sm8. Estos resultados adquieren relevancia en el marco del modelo planteado para la regulación de la expresión de Sm8, en el que el principal factor inductor del sRNA es la limitación de nitrógeno en el medio. Ante el agotamiento de N en vida libre, la respuesta fisiológica modulada por Sm8 tendería a disminuir la actividad de los procesos metabólicos asociados al C y compensar esto a través del incremento de la actividad de los procesos vinculados al metabolismo del N. En el mismo marco, resulta interesante, teniendo en cuenta el vínculo entre el N y el metabolismo de nucleótidos, el leve aumento en la representatividad que se observa de estos genes entre aquellos que se inducen ante la inducción de Sm8. Por el contrario, y posiblemente pudiendo considerarse como control de esta aproximación al análisis, no se observa una correlación entre la actividad de Sm8 y la expresión diferencial de genes vinculados la metabolismo de lípidos.

En el marco del concepto canónico de la función de un regulador de naturaleza ribonucleica como lo es Sm8, es de esperarse que su sobreexpresión no derive en cambios pleiotrópicos, sino que se presenten modificaciones en la abundancia de un grupo reducido de genes cuya actividad se encuentra regulada -directa o indirectamente- por el sRNA.

Con el propósito de acotar la interpretación de los resultados sobre la base firme del análisis de los marcadores génicos más fuertemente asociados al regulón de Sm8, elevamos la rigurosidad del filtro estadístico aplicado durante la identificación de transcritos diferencialmente expresados considerando sólo aquellos marcadores que presentaron un $p < 0,001$ entre las 4 réplicas biológicas ensayadas. En este marco, si bien hemos centrado la atención en aquellos transcritos cuya abundancia intracelular se ha visto afectada en un factor mayor a 2 (valor $M \geq 1$ o $M \leq -1$) como consecuencia del aumento en la actividad de Sm8, hemos contemplado adicionalmente aquellos transcritos que se han hallado regulados de forma más moderada. Es posible contemplar el hecho de que blancos directos de regulación post-transcripcional muestren cambios débiles en su abundancia a nivel transcriptómico y el efecto se pronuncie mayormente a nivel proteómico.

En la Tabla 4.2 se listan los genes cuyos transcritos se han mostrado regulados más fuertemente por Sm8 en conjunto con aquellos que, a pesar de presentar una regulación más débil a nivel de la abundancia relativa de transcritos, merecen su atención como posibles miembros del regulón a partir de la consideración de información de carácter complementario. Si bien no se descarta la posibilidad de que, a pesar de no haber sido identificados en la exploración actual, existan transcritos que sufran regulación positiva mediada por Sm8, a partir de los resultados de este ensayo reconocemos a Sm8 como un regulador con impacto preferentemente negativo a nivel de la abundancia de transcritos.

Por su parte, la totalidad de los genes cuyos transcritos han sufrido un cambio en su concentración mayor o igual a $1,5\times$ se listan en las Tablas suplementarias S1 y S2 en el Anexo ubicado al final del Trabajo de Tesis.

Tabla 4.2 Genes reprimidos durante la sobreexpresión constitutiva de Sm8^{1,2}.

ID del Gen	Nombre del Gen	Descripción de la proteína codificada	Valor M	Valor P	Valor M Proteoma Δhfq^a	Proteoma $\Delta sm8^?^b$	CoIP Hfq? ^c
Metabolismo del PHB							
<i>SMc02111</i>	<i>phaP2</i>	Fasina - Proteína asociada a gránulos de PHA	-1,60	1,14E-4	2,43	SÍ (↑)	-
<i>SMc03880</i>	<i>phaR/aniA</i>	Regulador del flujo de C	-1,15	1,08E-4	1,50	-	SÍ
Metabolismo del N							
<i>SMc00078</i>	<i>livJ</i>	Proteína de unión a Leu/Ile/Val - Transp. ABC	-0,74	5,14E-5	1,26	SÍ (↑)	SÍ
<i>SMc01140</i>	-	Probable proteína de modulación del factor σ^{54}	-0,74	3,40E-4	-	SÍ (↑)	SÍ
<i>SMc01534</i>	-	Probable omega-aminoácido-piruvato transaminasa	-0,98	1,32E-4	-	-	-
Metabolismo y transporte de Hidratos de Carbono							
<i>SMc01500</i>	<i>smoS</i>	Sorbitol deshidrogenasa	-1,15	2,99E-4	-1,25	-	SÍ
Otras funciones							
<i>SMb20727</i>	-	Proteína hipotética	-1,46	2,10E-4	-	-	-
<i>SMc02374</i>	-	Proteína hipotética	-1,10	1,04E-4	-	-	-

¹ Se incluyen adicionalmente en la tabla aquellos genes cuyo valor $-1 \leq M \leq -0,58$ (factor de represión entre 1,5× y 2×) que ya sea fueron hallados desregulados en el mismo sentido en el proteoma del mutante *sm8* (este trabajo) o de un mutante isogénico *hfq* (Sobrero, *et al.*, 2012), o bien presentan un vínculo funcional de interés que amerita profundizar su análisis.

² Por razones de compatibilización de la información, se utiliza la nomenclatura génica correspondiente a *S. meliloti* 1021 (*SMxnnnnn*), en reemplazo de su equivalente en *S. meliloti* 2011 (*SM2011_xnnnnnn*). *x* indica el replicón (a, pSymA; b, pSymB; c, cromosoma) y *n* indica la numeración asignada a cada gen.

^a Valores M que describen la abundancia relativa de las proteínas correspondientes en el mutante isogénico de *S. meliloti* 2011 en el gen *hfq* respecto a la cepa parental (Sobrero, *et al.*, 2012).

^b Se indica si la proteína correspondiente ha sido hallada desregulada (↑, sobreexpresada) de forma coherente respecto a los cambios en la actividad Sm8 en el proteoma $\Delta sm8$ (ver siguiente sección).

^c Se informa en esta columna si el mRNA correspondiente al gen co-inmunoprecipita de forma selectiva con la proteína Hfq (Torres-Quesada, *et al.*, 2014).

4.3.1.1 *Clusters* funcionales de genes reprimidos durante la sobreexpresión constitutiva de Sm8 en *S. meliloti* 2011

Genes implicados en el metabolismo de PHB

Se reconocen al menos dos transcritos que codifican para proteínas cuya función se halla íntimamente asociada al metabolismo del polihidroxibutirato.

phaR (SMc03880). El producto génico homónimo PhaR, también denominado AniA en *S. meliloti* y rizobios emparentados, es homólogo de PhaR de *Cupriavidus necator* (especie en la cual actúa como represor de la acumulación de polihidroxialcanoatos) (Potter, *et al.*, 2002, York, *et al.*, 2002). Posee un dominio conservado que sugiere su función como factor de transcripción y en *S. meliloti* se ha hipotetizado que PhaR regula la expresión de genes cuyos productos son importantes en la partición del flujo de C, particularmente en presencia de baja tensión de oxígeno, condición en la que el gen se encuentra inducido (Povolo & Casella, 2000). Durante la simbiosis con *M. sativa*, la ausencia del gen *phaR* se ha demostrado que deriva en una menor actividad nitrogenasa (Povolo & Casella, 2000). En *C. necator*, se ha descrito que PhaR se autoregula a nivel transcripcional (Potter, *et al.*, 2002), aunque no ha sido aún confirmado que este fenómeno ocurra en *S. meliloti*.

phaP2 (SMc02111). Codifica para la proteína fasina PhaP2 asociada a gránulos de PHB. Al menos la expresión de PhaP2, o de su proteína paróloga PhaP1 (*SMc00777*), es requerida para la correcta acumulación de PHB en *S. meliloti* (Wang, *et al.*, 2007). Según estudios realizados con proteínas homólogas en *C. necator* (Potter, *et al.*, 2002, York, *et al.*, 2002), la expresión de las proteínas PhaP estaría sujeta a represión transcripcional mediada por PhaR a través de un modelo que explicaría cómo se sincroniza la expresión de las fasinas en condiciones en las que se estimula la síntesis de PHB. Sin embargo, en *S. meliloti* aún no se ha demostrado el control transcripcional de los genes *phaP* por PhaR (Povolo & Casella, 2000).

Genes vinculados al metabolismo del N

livJ (SMc00078). Gen ortólogo de *braC3* en *R. leguminosarum*, el cual codifica para la proteína periplásmica de unión y transporte de aminoácidos ramificados (LIV) leucina, isoleucina y valina, y alanina (Prell, *et al.*, 2009). En *R. leguminosarum*, los transportadores de aminoácidos Aap y Bra, que se encuentran codificados por los operones *aapJQMP*, y *braDEFGC* en conjunto con el gen *braC3*, respectivamente, son responsables del transporte de aminoácidos ramificados que contrarresta el fenómeno de auxotrofia simbiótica que ocurre en los bacteroides como consecuencia de la represión que sufren las vías de biosíntesis de aminoácidos ramificados (Prell, *et al.*, 2009). Mutantes en ambos transportadores de *R. leguminosarum* derivan en fenotipos Fix⁺ Eff⁻. El hambreado de aminoácidos ramificados retrasa el desarrollo de los bacteroides que, aunque mantienen la

actividad fijadora de nitrógeno sobre la base de su contenido proteico, en términos netos disminuyen el contenido de nitrógeno fijado y aportado a la planta. En *S. meliloti*, el doble mutante en las proteínas de unión a sustrato *aapJ livK* (*braC*) no pone de manifiesto el fenómeno de auxotrofia simbiótica (Prell, *et al.*, 2009). Teniendo en cuenta que en bacteroides de *S. meliloti* también se encuentran reprimidos los genes de biosíntesis de aminoácidos LIVs (Barnett, *et al.*, 2004, Capela, *et al.*, 2006), se ha postulado que LivJ sería el responsable de mantener activo el transporte de LIVs en bacteroides de *S. meliloti* *aapJ livK*, tal como lo hace su ortólogo BraC3 en *R. leguminosarum* (Prell, *et al.*, 2009, Prell, *et al.*, 2010) y así evitar que la auxotrofia simbiótica se manifieste fenotípicamente. En este sentido, no se ha esclarecido si existe redundancia funcional o un rol diferencial entre LivJ y LivK en *S. meliloti*. En la sección 4.3.4 se extenderá la discusión en relación al vínculo hallado entre Sm8 y LivJ.

SMc01140. Gen codificante para la proteína probable moduladora del factor σ^{54} (*rpoN*). No se ha caracterizado la función de esta proteína y sus homólogas en especies de rizobios. El dominio N-terminal de *SMc01140* presenta homología remota con la proteína YhbH de *E. coli*. YhbH se induce en *E. coli* durante la transición entre la fase exponencial y estacionaria del crecimiento y ha mostrado ser partícipe del proceso de hibernación de ribosomas que acompaña al cese en el crecimiento (Maki, *et al.*, 2000, Ueta, *et al.*, 2005).

SMc01534. Gen codificante para la enzima con actividad beta-alanina-piruvato transaminasa. No se ha caracterizado funcionalmente en rizobios. Esta enzima participa de una reacción específica de la vía metabólica de degradación del aminoácido valina.

Genes vinculados al metabolismo de Hidratos de Carbono

smoS. Proteína con función sorbitol/manitol deshidrogenasa, involucrada en el metabolismo del sorbitol y manitol. Cataliza la reacción de conversión de manitol en fructosa, primera modificación química que sufre el azúcar luego de ser incorporada en la célula para ser metabolizada. Según Martínez Drets y colaboradores (Martínez De Drets & Arias, 1970), esta enzima se induce en medio conteniendo manitol como única fuente de C. La mutación del gen *smoS* deriva en la incapacidad de los rizobios para crecer en medio conteniendo sorbitol, arabinol o manitol (Jacob, *et al.*, 2008). Esto último indica la relevancia de este gen en la metabolización de la fuente única de C presente en medio VMM. Su represión podría ser un efecto directo de Sm8, o una repercusión secundaria a los cambios metabólicos que se ha demostrado derivan de la modificación en la actividad del sRNA.

4.3.2 Alteraciones proteómicas derivadas de la mutación *sm8* en *S. meliloti* 2011.

Con el propósito de validar que las alteraciones que ocurren en el transcriptoma como consecuencia de cambios en la actividad del sRNA Sm8 derivan en modificaciones a nivel proteómico, y hallar nuevos marcadores génicos que responden al regulador Sm8, llevamos a cabo un abordaje de proteómica cuantitativa en el que se compararon los proteomas de las cepas *S. meliloti* silvestre y su mutante isogénico $\Delta sm8$ a lo largo del curso del crecimiento de éstas en medio definido RDM. Hemos mostrado en el Capítulo 3 que *sm8* presenta una inducción natural al atravesar la transición entre las fases exponencial y estacionaria de cultivo en este medio, y que como consecuencia de la acumulación diferencial del transcripto entre ambas cepas se establece el fenotipo que ha sido caracterizado en términos fisiológicos. Esperamos que las diferencias que se evidencien entre los proteomas sujetos a comparación reflejen a nivel molecular los posibles determinantes del fenotipo que se ha descrito. Considerando que las diferencias de concentración intracelular de Sm8 entre la cepa silvestre y mutante *sm8* se magnifican conforme avanza el crecimiento en medio RDM, la comparación proteómica durante la etapa de crecimiento exponencial se espera resulte un control negativo que acompañe la equivalencia fenotípica en el comportamiento de ambas cepas.

En este sentido, se llevó a cabo el seguimiento de la dinámica de las diferencias a nivel proteómico que se establecen entre las cepas *S. meliloti* 2011 salvaje y su cepa mutante isogénica en el gen *sm8* mediante el estudio comparativo de los mismos en tres puntos definidos a lo largo de la curva de crecimiento en medio RDM (Fig. 4), buscando que cada uno fuese representativo de las diferentes etapas del crecimiento definidas como i) fase exponencial de crecimiento ($DO_{600} = 0,8$), ii) transición entre fase exponencial y fase estacionaria ($DO_{600} = 4$), iii) fase estacionaria temprana ($DO_{600} = 4,5-5,5$). En la Figura 5 se ilustra el diseño experimental empleado para la preparación de las poblaciones celulares cuyos proteomas fueron sujetos a comparación.

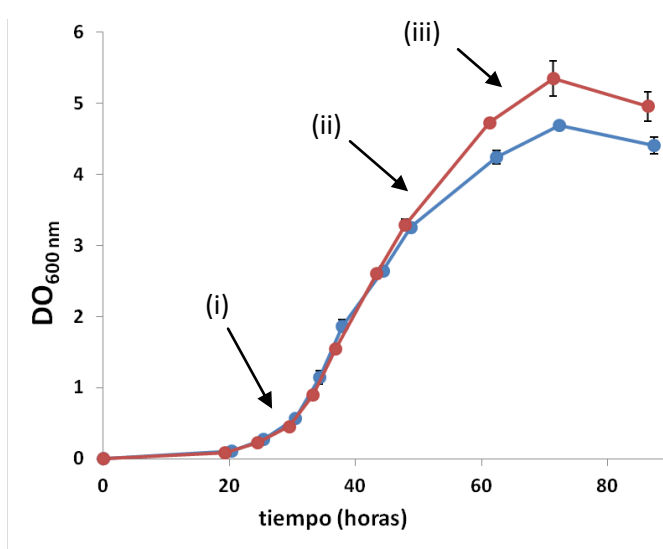


Figura 4. Curvas de crecimiento de las cepas *S. meliloti* 2011 (—●—) y *S. meliloti* 2011 $\Delta sm8$ (—●—) demarcando los puntos definidos en los que se llevó a cabo el análisis proteómico comparativo entre las cepas. (i), (ii) e (iii) denotan los 3 puntos donde se colectaron los pares de poblaciones celulares sujetas a comparación, y corresponden a las etapas de crecimiento exponencial, transición de fases y estacionaria, respectivamente.

La tecnología que se ha utilizado en la última década para llevar a cabo estudios proteómicos, a través de la separación y cuantificación de los componentes mayoritarios del proteoma mediante el uso de geles de poliacrilamida desnaturalizantes bidimensionales, y la posterior asignación de identidad a los mismos de modo individual y semi-automatizado mediante espectrometría de masa, ha sido progresivamente sustituida en los últimos años debido al creciente acceso a nuevas tecnologías de mayor complejidad y poder de resolución que, a través de una separación única cromatográfica de los componentes del proteoma, y omitiendo la separación electroforética, permiten la identificación y cuantificación completamente automatizada de los componentes del proteoma mediante el uso de espectrómetros de masa acoplados de alta resolución del tipo Orbitrap (Thermo Scientific, EEUU) (Duan, *et al.*, 2009, Qu, *et al.*, 2010).

La estrategia experimental que hemos utilizado para realizar el abordaje proteómico comparativo y cuantitativo en este Capítulo se basa en la técnica conocida como SILAC (*Stable Isotopic Labeling of Aminoacids in Cell Culture*) (Ong, *et al.*, 2002). La adaptación y validación de la aplicación de esta herramienta para el estudio de proteomas microbianos fue realizada por un miembro de nuestro grupo de trabajo en colaboración con la Dra. Anke Becker (Sobrero, *et al.*, 2012). En términos generales, poblaciones bacterianas cuyos proteomas son sujetos a comparación se cultivan durante al menos 5 generaciones en medios conteniendo como única fuente de nitrógeno un compuesto enriquecido en una determinada variante isotópica del elemento, a saber, ^{14}N o ^{15}N , de este modo, logrando la marcación diferencial de ambos proteomas. En igual proporción, ambas poblaciones celulares se mezclan y se lleva a cabo la purificación conjunta de las proteínas totales correspondientes a ambas poblaciones isotópicas. Se aplica una estrategia de fraccionamiento subcelular que, a través de la disminución de la complejidad de las muestras proteicas, permite mejorar la sensibilidad de la detección. Las proteínas de la mezcla, previa reducción y digestión a sus péptidos trípticos, se someten a un proceso de separación cromatográfica e inmediatamente luego son identificadas mediante espectrometría de masa. La elevada precisión que presenta esta técnica, permite resolver las diferencias de masa entre péptidos equivalentes que han sido marcados con diferentes isótopos del N, de esta forma, posibilitando determinar la abundancia relativa de ambas poblaciones isotópicas de cada péptido en la mezcla. En la Figura 5A, se resume la estrategia experimental empleada para llevar a cabo el experimento proteómico. En cada caso, se controló la calidad de las fracciones proteicas preparadas mediante la separación de las proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida SDS-PAGE (Laemmli, 1970). En la Figuras 5 B, C y D se presentan las distribuciones M-A de los péptidos que han sido cuantificados en cada una de las tres condiciones experimentales ensayadas. La distribución centrada en $M = 0$ obtenida luego de la normalización de los datos cuantitativos es coherente con la asunción previa de que sólo una pequeña fracción del proteoma responde a la actividad de Sm8.

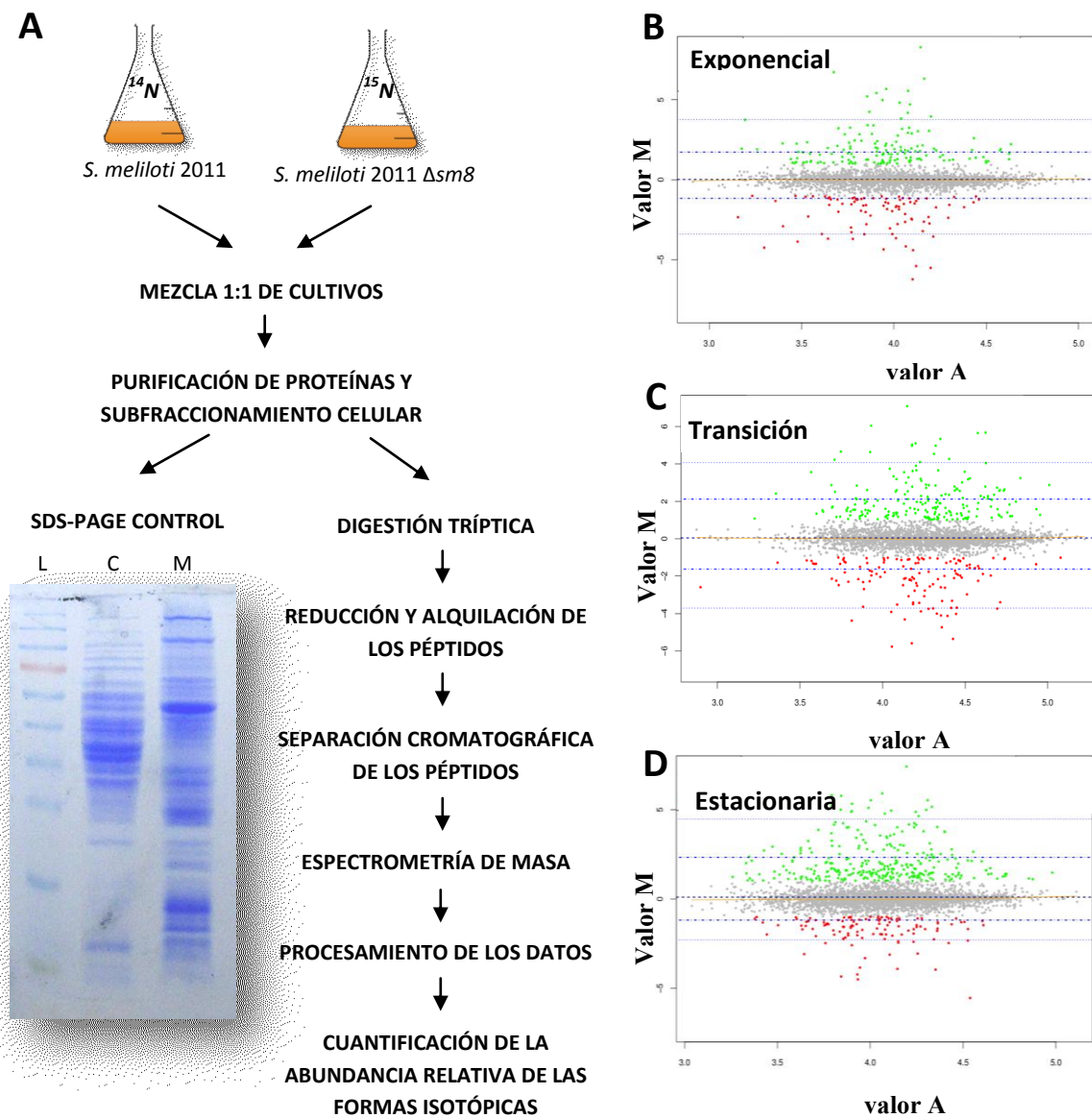


Figura 5. Diseño experimental y análisis de control de calidad del abordaje proteómico. (A) Esquema experimental del abordaje proteómico e imagen de gel SDS-PAGE revelado como control de la integridad del perfil de proteínas en las fracciones citosólica -C- y de membrana -M- representativo del conjunto de muestras. -L- corresponde al marcador de peso molecular PageRuler Prestained (Thermo Scientific, EEUU). (B), (C) y (D) corresponden a las representaciones de los valores M-A de cada péptido que ha sido identificado en la condición de cultivo exponencial, transición de fase, y estacionaria, respectivamente. En color gris se representan los péptidos cuyo valor $-1 \leq M \leq 1$. Los péptidos acumulados ($M \geq 1$) o reprimidos ($M \leq -1$) en la cepa mutante se ilustran en color verde y rojo, respectivamente.

Considerando en conjunto los resultados correspondientes a las dos subfracciones celulares analizadas, se lograron identificar en total 1859 proteínas únicas (1125 en fase exponencial, 1404 en la transición de fases, y 1338 en fase estacionaria), representando este número un $\approx 30\%$ del total de genes que codifican proteínas en el genoma de *S. meliloti* 2011. Sin embargo, sobre la base de este número de proteínas identificadas, sólo una pequeña fracción de las mismas -el 8%- pudo ser cuantificada con $p < 0,05$. No obstante, hemos podido validar en gran medida los resultados obtenidos mediante la aproximación transcriptómica y detectar nuevos miembros posibles del regulón. Considerando que la profundidad alcanzada en la caracterización del proteoma fue relativamente baja, esperamos a través de este abordaje evidenciar los cambios únicamente de una proporción del regulón proteómico de Sm8.

En las Tablas 4.3 y 4.4 se listan las proteínas cuya abundancia diferencial en la cepa mutante ha sido estadísticamente validada en al menos una de las tres condiciones ensayadas durante el crecimiento. Las proteínas LivJ, SMC01140 y PhaP2 se destacan por la coherencia respecto a la regulación que se ha observado previamente que Sm8 ejerce sobre ellas a nivel transcriptómico. Respecto al resto de las proteínas encontradas por intermedio de esta aproximación, podría por un lado suceder que la regulación ejercida a nivel post-transcripcional no altere significativamente los niveles del transcrito correspondiente y por tanto no se observen cambios a nivel transcriptómico, o bien que las diferencias existentes en los diseños experimentales empleados sólo permitan poner de manifiesto en común un grupo limitado de elementos del regulón, mientras que otro grupo se haga explícito de manera específica y dependiente de las condiciones empleadas en cada experimento.

Tabla 4.3 Proteínas inducidas en el mutante $\Delta sm8$.

ID del Gen	Nombre del Gen	Descripción de la proteína codificada	Valor M ^a		
			Condición de crecimiento		
			Exponencial	Transición	Estacionaria
Metabolismo del PHB					
<i>SMc02111</i>	<i>phaP2</i>	Fasina - Proteína asociada a gránulos de PHA		1,85	1,62
<i>SMc00777</i>	<i>phaP1</i>	Fasina - Proteína asociada a gránulos de PHA		2,10	
Metabolismo del N					
<i>SMc00078</i>	<i>LivJ</i>	Probable proteína de unión a Leu/Ile/Val	1,38	2,75	1,82
<i>SMc01140</i>	-	Probable proteína de modulación del factor σ^{54}	0,65	0,91	1,02
Metabolismo y transporte de Fe					
<i>SMc00784</i>	<i>fbpA</i>	Transportador ABC de Fe^{3+} - Proteína de unión a Fe^{+3}	0,45	0,94	1,30

^a Valores M que describen la abundancia relativa de las proteínas correspondientes en el mutante isogénico *S. meliloti* 2011 $\Delta sm8$ respecto a la cepa parental en cada condición ensayada (Exponencial, Transición y Estacionaria) según se describe en la sección Materiales y Métodos del presente Capítulo.

Tabla 4.4 Proteínas reprimidas en el mutante $\Delta sm8$.

ID del Gen	Nombre del Gen	Descripción de la proteína codificada	Valor M ^a		
			Condición de crecimiento		
			Exponencial	Transición	Estacionaria
<i>SMa0585</i>	<i>nrtA</i>	Transportador de NO_3^- - Proteína periplásmica de unión a NO_3^-	-	-1,86	-1,27
<i>SMa0583</i>	<i>nrtB</i>	Transportador de NO_3^- - Proteína permeasa	-	-2,18	-

^a Los valores M indicados describen la abundancia relativa de las proteínas correspondientes en el mutante isogénico *S. meliloti* 2011 $\Delta sm8$ respecto a la cepa parental en cada condición ensayada (Exponencial, Transición y Estacionaria) según se describe en la sección Materiales y Métodos del presente Capítulo.

Proteínas que se hayan inducidas en el mutante sm8*

** se amplía la descripción de aquellas que sólo han sido identificadas mediante el análisis proteómico.*

FbpA. Proteína periplásmica de unión a Fe^{+3} , componente del sistema de transporte del ión férrico (Parker Siburt, *et al.*, 2012). Si bien no ha sido estudiada en *S. meliloti*, se sabe que su expresión es dependiente del regulador de respuesta a hierro RirA (Chao, *et al.*, 2005). Se encuentra inducida en el mutante Δhfq (Sobrero, *et al.*, 2012) y su transcrito co-immunoprecipita de forma selectiva con Hfq (Torres-Quesada, *et al.*, 2014).

Proteínas que se hayan reprimidas en el mutante sm8*

** se amplía la descripción de aquellas que sólo han sido identificadas mediante el análisis proteómico.*

NrtA y NrtB. Proteínas codificadas en el operón *nrtAB* situado en el plásmido simbiótico pSymA. Posibles componentes del transportador tipo ABC de nitrato y nitrito (Barnett, *et al.*, 2001). Se ha descrito que el promotor de *SMa0585 (nrtA)* se induce ante la limitación de nitrógeno en el medio. Sin embargo, no hay estudios que describan el rol fisiológico de este posible transportador en rizobios. No se describen como pertenecientes al regulón de Hfq ni se las ha encontrado durante los ensayos de CoIP con la proteína (Torres-Quesada, *et al.*, 2014).

4.3.3 Exploración *in silico* de posibles determinantes moleculares de interacción directa entre Sm8 y los ARNs mensajeros vinculados a su regulón.

En virtud de los hallazgos presentados en las secciones previas, y considerando como potencial mecanismo regulatorio la interacción directa por apareamiento de bases sRNA-mRNA entre Sm8 y los ARN mensajeros de los transcritos vinculados al regulón del sRNA, exploramos el grado de complementariedad secuencial entre Sm8 y los transcritos candidatos.

El valor de esta aproximación predictiva radica en el hecho que la ausencia de una potencial zona de interacción permite descartar en primera instancia un fenómeno de regulación directa por apareamiento de bases y concentrar la atención en determinar los factores intermediarios. Por el contrario, la predicción de una posible región de complementariedad, si bien no confirma que la regulación sea ejercida, resulta un criterio valioso para seleccionar los candidatos a ser caracterizados.

Se buscaron zonas potenciales de interacción por apareamiento de bases entre el sRNA y cada mRNA a lo largo de la secuencia completa del ARN Sm8 y de la región de los ARN mensajeros comprendida entre el sitio de inicio de la transcripción que ha sido anotado (Schluter, *et al.*, 2013) y la posición que se halla a 60 nucleótidos en sentido río abajo del codón de inicio de la traducción a través del uso de la herramienta bioinformática IntaRNA (Smith, *et al.*, 2010). Este criterio se aplicó debido a que es en esta zona donde se focalizan mayoritariamente las interacciones canónicas descritas en la bibliografía para esta clase de riboreguladores (Waters & Storz, 2009). El programa IntaRNA basa las predicciones en el cálculo de los aspectos energéticos de la interacción ARN-ARN y de la accesibilidad a nivel estructural de las regiones involucradas de cada molécula. Sin embargo, en nuestro caso optamos por dar mayor relevancia al primer factor, ya que la posible mediación de la interacción por parte de la chaperona Hfq (a la cual Sm8 se encuentra vinculado (Torres-Quesada, *et al.*, 2014), y de la cual su estabilidad depende (Sobrero & Valverde, 2011)) podría disminuir considerablemente las restricciones impuestas por factores estructurales (Zhang, *et al.*, 2002, Geissmann & Touati, 2004, Vogel & Luisi, 2011).

Las predicciones se realizaron sobre el conjunto de transcritos correspondientes a los genes que se listan en las Tablas 4.3, 4.4 del presente capítulo, y S1 del Anexo (al final del Trabajo). Únicamente para los transcritos de los genes *livJ*, *phaP1*, *phaP2*, *phaR*, *SMc01140* y *SMc01534* fueron predichas interacciones que involucraron no solo al sitio de unión a ribosoma en el mRNA y la secuencia del núcleo conservado del sRNA (ver Capítulo 1) sino que adicionalmente se extendieron por fuera de esta región. Estos resultados son consistentes con los hallazgos experimentales que se presentaron en este Capítulo en relación a la regulación negativa ejercida por Sm8 sobre la expresión de estos genes.

En la Figura 6 se listan de modo esquemático las interacciones que fueron predichas.

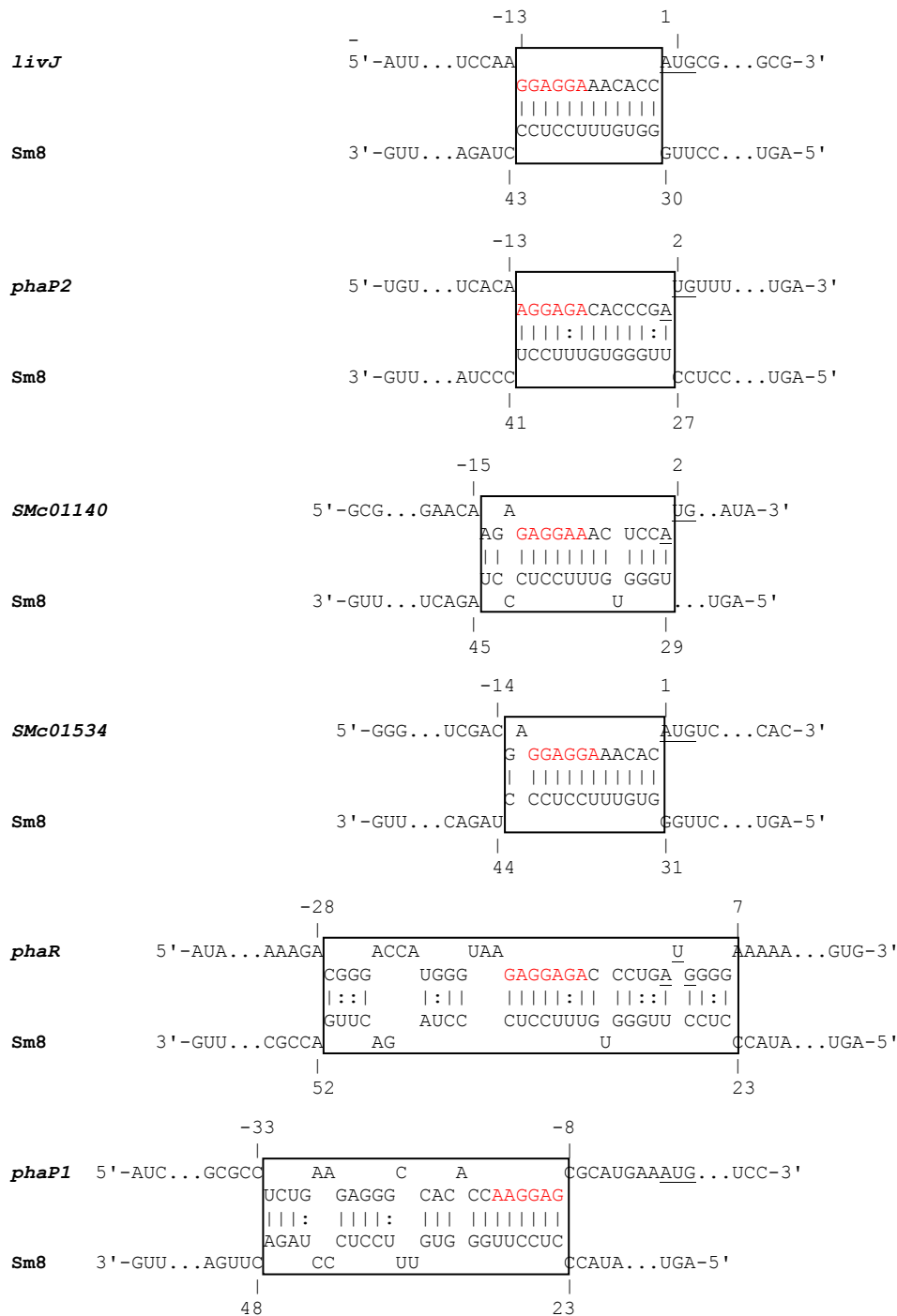


Figura 6. Predicción de interacciones Sm8-mRNA. Se presentan de modo esquematizado las interacciones predichas entre Sm8 y los mRNAs. Se indica en las secuencia correspondiente a cada ARN mensajero la región de unión a ribosoma en color rojo, y subrayado el codón de inicio de la traducción. Las posiciones en el ARN mensajero son relativas al primer nucleótido del marco abierto de lectura, mientras que en el sRNA se numeran comenzando desde el extremo 5' del mismo. Se indican con "|" los pares apareados mediante interacciones del tipo Watson y Crick, mientras que las interacciones del tipo *wooble* entre G y U se indican con ":". Se recuadran las regiones que estarían involucradas en cada interacción predicha.

En los mensajeros de los genes *livJ*, *phaP2*, *SMc01134* y *phaR* se reconoce en primer lugar una región de interacción que se extiende entre 12 y 13 nucleótidos, y presentando no más de 1 nucleótido desapareado, desde el sitio de unión a ribosoma hasta el codón de inicio de la traducción. En el caso del transcripto *phaR*, la región semilla predicha es más débil, aunque la interacción se desplegaría aún más hacia ambos extremos del núcleo inicialmente descrito. El transcripto *SMc00777* presenta por su parte una región de complementariedad que se extiende a partir del sitio de inicio de unión a ribosoma en sentido inverso al mencionado previamente. Se ha descrito extensamente ya en la bibliografía que un determinado sRNAs puede ser capaz de regular la traducción/estabilidad de más de un ARN mensajero a través de interacciones que difieren en términos de las regiones del sRNA y mRNA involucradas (Papenfort, *et al.*, 2010, Sharma, *et al.*, 2011, Overloper, *et al.*, 2014). En términos generales, la presencia de nucleótidos desapareados, o de pares G:U parece estar compensada por un aumento en la longitud de la interacción.

El compromiso de la región conservada de Sm8 (Fig. 6, posiciones 35 a 44 en la secuencia del transcripto Sm8) para interactuar con múltiples blancos podría constituir, al menos en parte, la presión para la estricta conservación a nivel secuencial del núcleo interno del sRNA, tal como se ha descrito en el Capítulo 1 de la Tesis.

La interacción predicha entre Sm8 y el transcripto *livJ* adquiere relevancia si consideramos los resultados de un análisis que llevamos a cabo utilizando el algoritmo de búsqueda BLASTN, a través del cual hemos determinado que existen sólo 3 genes en el genoma de *S. meliloti* (*livJ*, *paaG*, *SMB20114*) cuyos transcriptos serían capaces de establecer una interacción por apareamiento de bases con Sm8 de una extensión de 12 nucleótidos y con perfecta complementariedad, focalizada en la región contigua al codón de inicio de la traducción del ARN mensajero y la zona mayormente conservada del sRNA (no hallamos en el genoma de *S. meliloti* posibles regiones blanco de mayor longitud y complementariedad perfecta la secuencia del transcripto Sm8). Entre los 3 genes recientemente mencionados, únicamente el transcripto *livJ* y la proteína que éste codifica han sido experimentalmente vinculados a la proteína Hfq (Sobrero, *et al.*, 2012, Torres-Quesada, *et al.*, 2014) y han mostrado ser regulados negativamente por Sm8 (este Trabajo). En conjunto, estas evidencias sugieren fuertemente que existiría una regulación directa a nivel post-transcripcional de la expresión de *livJ* mediada por el sRNA Sm8, la cual resta ser verificada experimentalmente.

4.3.4 Efecto de los cambios en la actividad de Sm8 sobre los componentes del modulón vinculado a la síntesis y degradación de PHB.

Considerando el impacto que Sm8 ejerce sobre la acumulación de reservas de PHB en *S. meliloti*, tal como se describió en el Capítulo previo, y el hallazgo de un grupo de genes marcadamente desregulados en contextos de cambio en la actividad del sRNA y que están vinculados al metabolismo del polímero, nos propusimos dar un marco integral al análisis de la respuesta del modulón asociado a la síntesis y degradación de PHB (Trainer & Charles, 2006) frente a la modificación del nivel celular de Sm8. El análisis transcriptómico, realizado en condiciones de crecimiento exponencial en las que por razones de mayor orden jerárquico no se encuentra activa la acumulación de reservas (Zevenhuizen, 1981), presenta la ventaja de permitir llevar a cabo la evaluación del impacto primario de Sm8 sobre la expresión de los genes implicados en el metabolismo del PHB; por su parte, las condiciones en las que fue realizado el análisis proteómico hacen su análisis más complejo ya que integran el efecto regulatorio causado por Sm8 con las modificaciones secundarias que ocurren como consecuencia de la acumulación diferencial del polímero.

En la Tabla 4.5 se resumen los resultados correspondientes al presente análisis.

Tabla 4.5 Resumen del impacto de Sm8 sobre el modulón de síntesis y degradación de PHB.

ID del gen	Nombre del gen	Descripción de la proteína codificada	Transcriptoma pSUP _{sm8} (Valor M)	Proteoma Δ _{sm8} (Valor M)	CoIP Hfq ^a	sRNA-mRNA ^b
Síntesis de PHB						
SMc03879	<i>phbA</i>	Acetil-CoA acetiltransferasa	= (-0,40)	=	NO	NO
SMc03878	<i>phbB</i> *	Acetoacetil-CoA reductasa	= (-0,03)	N.D.	NO	NO
SMc00296	<i>phbC</i>	PHB polimerasa	= (-0,09)	N.D.	NO	NO
Degradación de PHB						
SMc02770	<i>phaZ</i>	PHB depolimerasa	↓ (-1,01)	N.D.	NO	NO
SMb21010	<i>bdhA</i>	β-hidroxibutirato deshidrogenasa	= (-0,41)	N.D.	NO	NO
SMc00774	<i>acsA2</i>	Acetoacetil-CoA sintetasa	= (-0,50)	N.D.	NO	NO
Funciones regulatorias y estructurales						
SMc03880	<i>phaR</i>	Regulador del flujo de C	↓ (-1,15)	N.D.	SÍ	SI
SMc02111	<i>phaP2</i>	Fasina - Proteína de unión a PHB	↓ (-1,60)	↑	NO	SI
SMc00777	<i>phaP1</i>	Fasina - Proteína de unión a PHB	= (-0,45)	↑	SÍ	SI

* *phbB* se cotranscribe con *phbA* bajo la forma de un ARN mensajero bicistrónico (no se ha determinado un sitio de inicio de la transcripción exclusivamente asociado a *phbB* según Schluter *et al.* (Schluter, *et al.*, 2013))

^a Se informa en esta columna si el mRNA correspondiente al gen co-inmunoprecipita de forma selectiva con la proteína Hfq (Torres-Quesada, *et al.*, 2014).

^b Se informa en esta columna si ha sido predicha la interacción sRNA-mRNA (sección 4.3.3.)

En la Figura 7 se resumen en el marco de un esquema, los hallazgos en relación a la regulación ejercida por Sm8 sobre los genes implicados en el metabolismo de PHB.

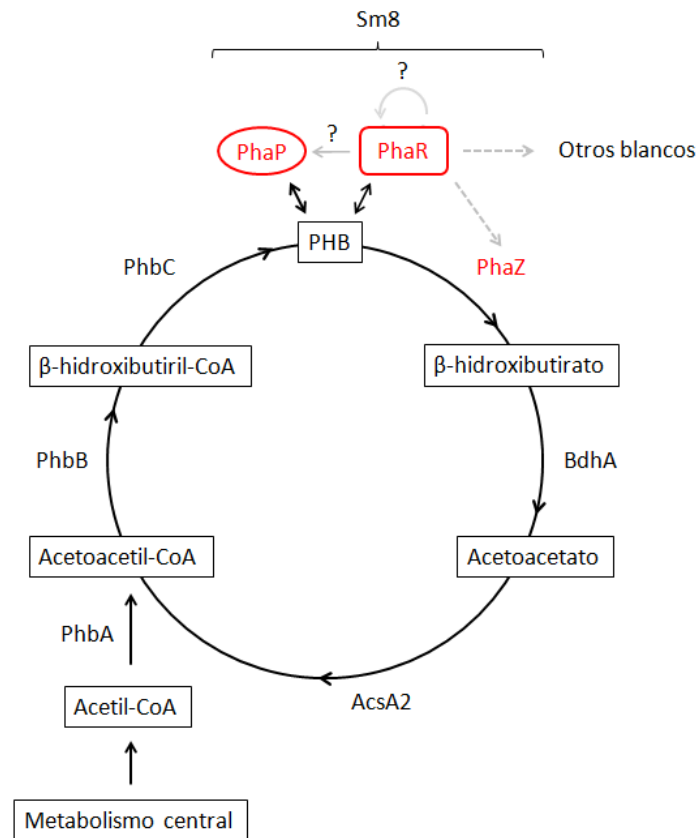


Figura 7. Esquema simplificado del metabolismo del PHB en rizobios indicando (en color rojo) las proteínas/transcriptos que han sufrido alteraciones producto de la mutación o sobreexpresión de Sm8. Los nombres de las enzimas que catabolizan cada reacción esquematizada con una flecha negra se indican justo a su lado. Se recuadran los metabolitos implicados en la vía. En color rojo se remarcan aquellos genes que, ya sea en el análisis transcriptómico, en el proteómico, o en ambos, se han hallado desregulados y de modo coherente en función de los cambios en la concentración de Sm8. Se indican con signos de interrogación aquellos eventos regulatorios que si bien no se han demostrado en rizobios, han sido reportados en otras especies. Con líneas grises se indican los vínculos de carácter regulatorio. Las líneas punteadas indican conexiones hipotéticas (Povolo & Casella, 2000, Trainer & Charles, 2006, Wang, *et al.*, 2007, Trainer, *et al.*, 2010)

La totalidad de los genes correspondientes al modulón implicado en el metabolismo del PHB fueron cuantificados satisfactoriamente en el ensayo transcriptómico con $p < 0,05$. La nueva exploración de los resultados transcriptómicos nos ha permitido detectar que el transcripto del gen *SMc02770*, el cual codifica para la enzima PHB depolimerasa, se halla reprimido ante el incremento en los niveles de Sm8. Este resultado no había sido expuesto previamente puesto que no reunió el estricto criterio estadístico (valor $p = 3,1E-3 > 1,0E-3$) impuesto durante el primer filtro analítico. Si bien se ha caracterizado a la enzima PhaZ en *S. meliloti*, no se ha descrito hasta el momento cómo su expresión se encuentra regulada (Trainer, *et al.*, 2010).

Por el contrario, no se observaron cambios en los niveles de los transcritos de los genes *phbAB* y *phbC*, ambos correspondientes a la vía de síntesis de PHB. Confirma de modo complementario estos resultados, el hallazgo de niveles invariantes de la proteína PhbA en el proteoma del mutante $\Delta sm8$ respecto al de la cepa parental en condiciones en las que se establece el fenotipo de acumulación diferencial del polímero (transición de fases y fase estacionaria temprana de crecimiento). Por su parte, *bdhA* y *acsA2* tampoco presentaron diferencias en la abundancia de sus transcritos. No obstante, se desconoce qué ocurre a nivel proteómico en relación a la abundancia de las proteínas correspondientes.

El rol de la proteína PhaR en *S. meliloti* no se halla del todo claro aún, y en particular, no se ha establecido a través de qué mecanismo ésta regula la síntesis de las fasinas, proteínas estructurales de los gránulos de PHB, y de otras proteínas relacionadas con el metabolismo del polímero. El incremento en la abundancia de las fasinas PhaP1 y PhaP2 que presenta la cepa mutante $\Delta sm8$ en relación a la cepa parental conforme avanza la curva de crecimiento es coherente con la mayor acumulación de PHB en ausencia de Sm8 en esas condiciones (Capítulo 3). En este sentido, si bien sería posible *a priori* especular que los cambios en la expresión de los genes cuyos productos están involucrados en la constitución de los gránulos de PHB sean consecuentes a una desregulación metabólica primaria originada por Sm8 que deriva en una mayor acumulación del polímero, el hallazgo de la regulación de los mensajeros de *phaR*, *phaZ* y *phaP2* (que precisamente PhaR regula, tal como se extrapola a partir de lo descrito del estudio de genes homólogos) en condiciones de crecimiento exponencial en las que no se han generado aún reservas de PHB, eleva la sospecha acerca de una posible regulación primaria de estos genes mediada por el sRNA. En relación a esta última hipótesis, se ha descrito que el sRNA ArrF en la gama-proteobacteria *Azotobacter vinelandii* capaz de regular de forma directa la traducción del ARN mensajero del gen homólogo de *phaR* en esa especie (Pyla, *et al.*, 2009, Pyla, *et al.*, 2010, Muriel-Millan, *et al.*, 2014). Dado que no existe evidencia alguna de homología entre los ARNs ArrF y Sm8, eventos evolutivos independientes y análogos podrían haber conducido a establecer la regulación a nivel post-transcripcional del gen *phaR* mediada por un sRNA. Esta hipótesis abre una nueva etapa de exploración para determinar si Sm8 regula a nivel post-transcripcional en rizobios al ARN mensajero que codifica para la proteína PhaR en *S. meliloti*.

La ausencia de efecto ante la sobreexpresión de Sm8 sobre los niveles del mensajero del gen *phaP1* podría explicarse a partir de diversas hipótesis. En primer lugar, podría pertenecer al regulón directo del sRNA Sm8, pero ser regulado exclusivamente a nivel traduccional, es decir, que no derive en la alteración significativa de la estabilidad del mensajero. Alternativamente, PhaP1 podría no estar asociada al regulón directo del sRNA sino que se acumularía en el mutante de modo secundario acompañando el incremento en los niveles de PHB. Finalmente, podría estar sometido a un complejo conjunto de regulaciones en diferentes niveles que de forma neta no alteran los niveles del transcripto. Cabe mencionar, que se ha descrito ya la regulación diferencial de los genes de las fasinas en otras especies (Potter, *et al.*, 2005).

4.3.5 Sm8 y la regulación del transportador de aminoácidos ramificados LivJ. Potencial relevancia simbiótica.

Entre los genes que con mayor confianza podemos afirmar que son miembros del regulón de Sm8, se encuentra *livJ*. Como hemos anticipado anteriormente, este gen codifica para la subunidad de unión a sustrato homónima del transportador tipo ABC (de su sigla en inglés *ATP binding cassette*) de alanina y aminoácidos ramificados. La proteína LivJ ha mostrado acumularse conforme el avance de la curva de crecimiento en la cepa mutante $\Delta sm8$ respecto a la cepa silvestre, acompañando las diferencias que se establecen entre ambas cepas en términos de la concentración intracelular del regulador. Adicionalmente, la sobreexpresión del sRNA derivó en una discreta represión ($M = -0,74$; $p = 1E-5$) en los niveles del transcripto que codifica para el transportador. Si bien no se incluyen los datos en este Trabajo debido a su condición de resultados preliminares, cabe mencionar aquí que hemos explorado la dinámica del proteoma a tiempos cortos luego de la inducción de Sm8 y verificado que la abundancia de la proteína LivJ disminuye progresivamente en el curso de 90 minutos posterior a la inducción del sRNA.

En el marco de estas observaciones es importante remarcar, tal como se muestra en la Tabla 4.2, que el ARN mensajero de este gen co-inmunoprecipita de modo selectivo con la proteína Hfq (Torres-Quesada, *et al.*, 2014); más aún, los niveles de LivJ en el mutante Δhfq se hayan incrementados más de 2 veces (Sobrero, *et al.*, 2012). Esto último resulta coherente considerando que Sm8 se encuentra fuertemente reprimido bajo el contexto fenotípico de este mutante (Sobrero & Valverde, 2011). No obstante, debemos tener presente que el análisis puede ser más complejo y depender de un mayor número de factores que aún se desconocen.

El mutante Δhfq presenta un incremento generalizado en la abundancia de los transportadores de aminoácidos, dipéptidos y oligopéptidos que daría un marco para la interpretación de una posible regulación de *livJ* específicamente efectuada por Sm8. Es posible que los transportadores sufran regulación a nivel post-transcripcional de modo individual, o en *clusters*, para mantener el ajuste fino independiente en pos de un compromiso global en el transporte de metabolitos. El vínculo entre Hfq y la regulación de este grupo de transportadores se extiende más allá de *S. meliloti*; en *R. leguminosarum* se ha descrito que Hfq regula la abundancia de los transcriptos de los operones *aap*, *bra* y *opp*, entre otros (Mulley, *et al.*, 2011).

Se ha reportado recientemente la regulación directa mediante apareamiento de bases del tipo sRNA-mRNA del mensajero *livK* en *S. meliloti*, y de su ortólogo *Atu2422* en *A. tumefaciens*, por parte de los ARNs pequeños homólogos AbcR1. Adicionalmente en *S. meliloti*, AbcR1, en conjunto con el sRNA AbcR2 -el cual se expresa desde la misma región intergénica-, regulan la traducción de los mensajeros de los genes *SMa0495* y *SMc01645*, ambos codificantes para sistemas de transporte del tipo ABC. Sin embargo, no se han reportado hasta el momento fenotipos asociados a la supresión de tales regulaciones en los mutantes de los sRNAs pequeños.

Independientemente del mecanismo a través del cual Sm8 regula negativamente la expresión de LivJ, resulta de marcado interés este fenómeno dada la importancia que presuntamente tendría esta proteína en el transporte de aminoácidos ramificados en los bacteroides. Como se mencionó previamente, el gen *livJ* constituye un parálogo de *livK* en *S. meliloti*. Según se ha reportado, el mutante *aapJ livK* no presenta alteraciones en la eficiencia simbiótica con alfalfa, tal como se esperaría si se abortara completamente el transporte de aminoácidos ramificados. En virtud de esta observación, se ha postulado que sería LivJ el responsable de mantener el transporte. Teniendo en cuenta las similitudes entre las interacciones que establece *S. meliloti* con alfalfa y *M. truncatula* (Jones, *et al.*, 2007), y considerando que es en el modelo de interacción con esta última que contamos en la bibliografía reciente con información transcriptómica muy precisa acerca de la dinámica de la expresión génica en los rizobios en los diferentes estadios de la simbiosis, nos permitimos hacer uso de ella y extrapolar los resultados del análisis en carácter de preliminares y orientadores respecto de los fenómenos que ocurrirían durante la interacción con alfalfa. A partir del análisis de los resultados publicados por Roux y colaboradores (Roux, *et al.*, 2014), observamos que existe represión de los mensajeros de los genes *aapJ* y *livK* en los bacteroides de *S. meliloti* durante la interacción con *M. truncatula*, y por el contrario, se observa un incremento significativo en los niveles del transcripto *livJ* que resultarían, según los valores que han sido reportados, cerca de 100 veces mayores que los correspondientes a *livK* en los bacteroides maduros (Fig. 8). Si bien resta confirmar la relevancia biológica de *livJ* en la simbiosis entre *S. meliloti* y alfalfa, los resultados de la caracterización de transportadores homólogos en especies emparentadas (Prell, *et al.*, 2010), y las evidencias que remarcamos acerca de su expresión parecerían indicar que tendría un rol durante el metabolismo simbiótico. En este sentido nos preguntamos, ¿se encuentra vinculada la inducción que presenta el transcripto Sm8 al control de la expresión de *livJ* que se enciende conforme progresa la diferenciación de los bacteroides? Estos interrogantes extienden el interés hacia el estudio del rol del sRNA en la vida simbiótica de los rizobios.

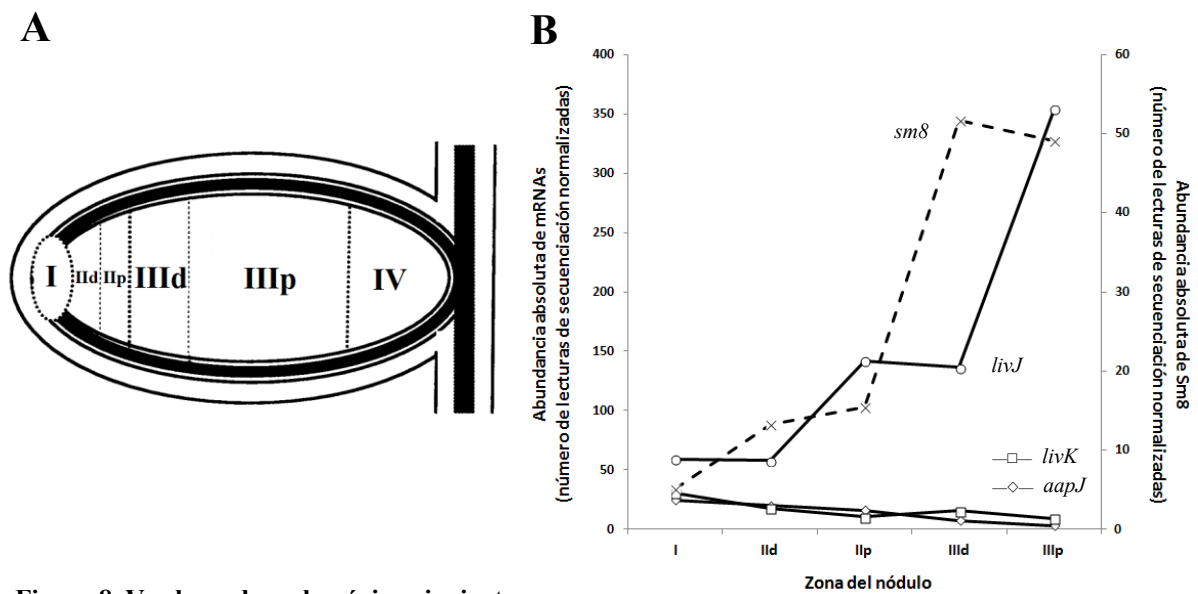


Figura 8. Ver leyenda en la página siguiente

Figura 8. Esquema de la estructura de un nódulo indeterminado maduro (A), y patrón de expresión de *livJ*, *livK*, *aapJ* y *sm8* en los diferentes estadios de diferenciación intranodular de *S. meliloti* en interacción con *M. truncatula* (B). Los datos utilizados para realizar el panel (B) fueron tomados de las Tablas Suplementaria S4 de (Roux, *et al.*, 2014). **(A)** Se indican las regiones del nódulo en función del grado de infección. I: zona meristemática; II: zona de infección (II_d: distal o temprana; II_p: proximal o tardía); III: zona de simbiosis (III_d: distal o temprana; III_p: proximal o tardía); IV: zona de senescencia. La barra de escala corresponde a 100 μ m. Esquema tomado y adaptado de (Franssen, *et al.*, 1992). **(B)** Las zonas del nódulo se indican según se detalla en (A).

Por su parte, en condiciones de cultivo en medio mínimo como las que se han optado para los ensayos ómicos en el presente Trabajo, no parecería *a priori* que la proteína LivJ jugara un rol relevante y se encontrase por tanto involucrada al fenotipo descrito en el Capítulo previo. Esperamos poder esclarecer esta inquietud con el avance en las investigaciones en torno a la caracterización del rol particular de LivJ en *S. meliloti*.

4.4 Conclusiones

En el presente capítulo hemos presentado el abordaje al estudio del regulón del sRNA Sm8 a nivel transcriptómico y proteómico. La estrategia implementada a través de la evaluación de los cambios globales en la expresión génica en sendos niveles producto de la sobreexpresión o mutación del sRNA, respectivamente, nos ha permitido reconocer con alto grado de confianza un grupo de genes cuya actividad responde a las alteraciones en la concentración intracelular de Sm8 (Tablas 4.2, 4.3, 4.4 y 4.5; Fig. 7). Dan soporte adicional a las observaciones experimentales la evidencias en relación al solapamiento por parte de los miembros reconocidos del regulón de Sm8 con el regulón de la proteína Hfq, de la cual depende tanto la expresión como la estabilidad del sRNA en estudio (Sobrero & Valverde, 2011, Torres-Quesada, *et al.*, 2014). Adicionalmente, hemos detectado un grupo de genes que desde el punto de vista experimental se hallan más débilmente asociados a Sm8, y cuyo vínculo funcional en el marco del modelo de interpretación propuesto ha resultado más difícil de establecer (Tablas 4.2, 4.3 y 4.4). Finalmente, a pesar de la asociación física que presentan *sm8* y los miembros de la subfamilia $\alpha 8s1$ con ortólogos del gen *SMc04043* (Capítulo 1), resulta apropiado resaltar el hecho de que no hemos hallado evidencias (al menos mediante esta aproximación experimental), que conecten al sRNA Sm8 con el transcripto del gen *SMc04043* ni la proteína que éste codifica.

Hemos presentado evidencia a favor de una tendencia global por parte de Sm8 hacia la represión de genes involucrados en el metabolismo del C y energético, y una paralela activación de genes vinculados al metabolismo del N. Si bien esta respuesta no la hemos asociado a marcadores génicos particulares, resulta válida en cuanto que provee una visualización ómica global del impacto de Sm8 sobre el metabolismo de los rizobios.

Claramente la relación que vincula a Sm8 con el metabolismo de N y C se ve -al menos parcialmente- reflejada en el grupo de genes identificados como parte del regulón del sRNA. Una mirada focalizada en este conjunto de genes, nos permitió reconocer un impacto negativo de la actividad del sRNA sobre genes asociados al comienzo de la metabolización de la fuente de carbono presente en el medio (*smoS*), y al metabolismo de acumulación de carbono bajo la forma de polihidroxibutirato. Estos hallazgos sugieren que Sm8 interviene en estrategias de control del ingreso y acumulación de C en la célula. Cabe recordar que el marco en el que naturalmente Sm8 se induce durante el crecimiento saprofitico está ligado a un déficit de nitrógeno en el medio de cultivo (Capítulo 3 y resultados de Ceizel Borella *et al.*, aún no publicados).

En lo que refiere particularmente a las bases moleculares del fenotipo descrito en el Capítulo previo, la sobreexpresión de Sm8 se vinculó con una represión en los niveles de los transcriptos de los genes *phaR*, *phaZ* y *phaP2*. No está claro el mecanismo a través del cual esto ocurre, sin embargo parecerían ser consecuencia del impacto primario de la actividad Sm8 puesto que fueron evidenciados en condiciones en las que la célula no sintetiza PHB. Tal como era de esperarse, el aumento en los niveles del polímero que ocurre en el mutante a

partir del agotamiento de la fuente nitrógeno en presencia de exceso de C se ve acompañado por una mayor concentración de las proteínas fasinas asociadas a gránulos PhaP1 y PhaP2.

En estas mismas condiciones, y respecto a la regulación que ejerce Sm8 sobre genes involucrados en el metabolismo del N, hemos evidenciado a nivel proteómico un efecto positivo mediado por el sRNA sobre la abundancia de transportadores de nitrato, única fuente de N en las condiciones ensayadas. Sin embargo, tal efecto no parece ser consecuencia de la interacción directa entre el riboregulador y el ARN mensajero, puesto que no se han hallado posibles regiones de complementariedad secuencial entre ambas moléculas. Es factible que la regulación sea ejercida por intermedio de un regulador general aún no identificado.

La complementación de los resultados de la caracterización de los fenotipos asociados a la actividad de Sm8 llevada a cabo en el Capítulo precedente, con los hallazgos experimentales que hemos presentado en el presente Capítulo, plantea un plano interesante para la discusión y proyección de nuevas investigaciones que permitan esclarecer con mayor resolución el mecanismo de acción del sRNA. **Nuestro análisis constituye el primer reporte en rizobios en el que se logran hallar determinantes moleculares pertenecientes al regulón de un sRNA vinculados con un fenotipo asociado a la pérdida de función del mismo.**

Respecto a la regulación negativa que Sm8 ejerce sobre el gen *livJ*, puesta de manifiesto experimentalmente a nivel transcriptómico y proteómico, y respaldada por el vínculo previamente demostrado con la proteína Hfq (Sobrero, *et al.*, 2012, Torres-Quesada, *et al.*, 2014), serán importantes los avances en relación a lograr establecer la relevancia funcional de la proteína transportadora que éste codifica en *S. meliloti* para poder comprender el significado biológico de la regulación a la que está sujeta. En este mismo sentido, la escasa información funcional respecto al gen *SMc01140* dificulta, aunque sin restarle importancia, la interpretación del impacto de su regulación sobre la biología de los rizobios.

Por su parte, a través de la aproximación proteómica hemos determinado que la proteína FbpA presenta un patrón de acumulación coherente con el esperado asumiendo una regulación negativa mediada por Sm8. Es posible especular que la actividad de Sm8, ya sea a través de una intervención directa o como consecuencia fisiológica a sus efectos primarios, modula la expresión de genes asociados al metabolismo y transporte del Fe. Si bien no se ha avanzado aún en la caracterización de la relevancia biológica de tales cambios, serán blanco inmediato de futuras investigaciones.

De carácter predictivo, y en virtud de sentar las bases para los avances futuros en relación a los resultados presentados en este Capítulo, la integración de los mismos con los resultados obtenidos a partir de la implementación de la estrategia bioinformática de predicción de potenciales determinantes de interacción directa por apareamiento de base entre moléculas de ARN, nos permite especular con la segmentación del regulón de Sm8 en

dos subgrupos de genes en base al mecanismo a través del cual el sRNA los regularía; un primer conjunto de genes cuya regulación sería fruto de la interacción directa entre Sm8 y sus ARN mensajeros (entre ellos situamos a *phaP2*, *phaR*, *livJ*, *SMc01140*), y un segundo grupo de genes que se verían regulados de forma indirecta por intermedio de factores que aún no han sido identificados (*fbpA*, *nrtAB*). No obstante, a pesar de las evidencias presentadas, será necesario demostrar experimentalmente que existe la interacción física entre el sRNA y los mRNAs en cuestión, y que ésta tiene consecuencias de carácter regulatorio sobre la función de los mismos.

Las condiciones particulares en las que se llevaron a cabo los ensayos en conjunto con las limitaciones propias de las herramientas utilizadas sin dudas constituyen un condicionamiento para llegar a conocer la total extensión del regulón de Sm8. La mayor profundidad potencial que puede ser alcanzada por el análisis proteómico, creemos que permitirá en un futuro próximo expandir el alcance del regulón que al momento hemos descrito. En este sentido, hemos realizado ensayos en los que exploramos la dinámica del proteoma a tiempos menores que una duplicación luego de la inducción de Sm8 en la cepa mutante con el objetivo de enriquecer el perfil de la respuesta celular al cambio en los niveles del sRNA en sus blancos de regulación primaria (resultados aún no disponibles).

En resumen, en este Capítulo hemos logrado a través de abordajes transcriptómico y proteómico obtener una visión global del impacto de la actividad del sRNA Sm8 sobre la expresión génica en rizobios. Esta aproximación nos permitió identificar un conjunto de marcadores moleculares que responden primariamente a Sm8, que se encuentran estrechamente vinculados y podrían ser causales del fenotipo que en el Capítulo previo se ha descrito se halla asociado a la actividad del sRNA. A su vez, nos ha permitido ampliar nuestro conocimiento en relación al alcance del regulón del sRNA hacia nuevos genes que, a través de su caracterización futura, nos permitirá comprender de modo más acabado el rol fisiológico de Sm8.

Puesto que existen marcadas diferencias en torno a la regulación del metabolismo de N y C en los rizobios durante la vida libre respecto a lo que ocurre en los bacteroides simbióticos (Prell & Poole, 2006, Udvardi & Poole, 2013), la extrapolación del modelo que surge a partir del análisis funcional del sRNA en condiciones de vida saprofítica a condiciones de vida en simbiosis debe realizarse con precaución. Para poder establecer el paralelismo con mayor claridad, y comprender aquellos fenómenos regulatorios exclusivamente vinculados a la vida simbiótica, será necesario obtener evidencias adicionales de la función y rol del regulador durante la interacción de los rizobios con su planta hospedadora. Se ampliará la discusión al respecto en el próximo capítulo.

CAPÍTULO 5

Impacto de la mutación en el gen *sm8* sobre la simbiosis entre *S. meliloti* y *Medicago sativa*.

5.1 Introducción

El desarrollo de una simbiosis productiva entre rizobios y raíces de leguminosas se encuentra condicionado por la correcta sucesión de eventos de diferenciación estrictamente coordinados entre ambos simbioses (Gage, 2004, Jones, *et al.*, 2007). Tal como se ha detallado en el Capítulo Introductorio a este Trabajo, la interacción ha sido formalmente dividida en diversas etapas, las cuales se inician previo al contacto físico entre los rizobios y la raíz a través del intercambio de señales en la rizósfera, y finalizan con la formación de nódulos radiculares maduros en los que los rizobios diferenciados en bacteroides se especializan en llevar a cabo el proceso de fijación biológica de nitrógeno.

Según se ha descrito en el Capítulo previo, el reciente trabajo realizado por Roux y colaboradores (2014), a través del cual son caracterizados los perfiles transcriptómicos de *S. meliloti* en diferentes estadios de diferenciación dentro del nódulo durante su interacción con la planta hospedadora *M. truncatula*, indica que el sRNA Sm8 se acumula progresivamente conforme los rizobios progresan desde la zona de infección temprana hacia la zona en que se encuentran ya diferenciados en bacteroides maduros fijadores de nitrógeno. Los estudios de expresión realizados en nuestro laboratorio, junto a estas evidencias, sugieren la posible participación del sRNA Sm8 en instancias avanzadas de la interacción simbiótica.

En relación al rol del metabolismo de PHB durante la simbiosis entre *S. meliloti* y alfalfa (Trainer & Charles, 2006), se ha descrito la acumulación del polímero en etapas tempranas de la infección pero no se detecta su presencia en bacteroides maduros (Hirsch, *et al.*, 1983). No obstante, las vías de síntesis y degradación parecen estar activas a lo largo de la maduración del nódulo puesto que la mutación en la enzima PHB depolimerasa (PhaZ) deriva en la aparición de gránulos citoplasmáticos del polímero en bacteroides maduros (Trainer, *et al.*, 2010). En este Trabajo de Tesis hemos demostrado la participación de Sm8 en la regulación del metabolismo de PHB durante la vida libre de los rizobios y su vínculo con la proteína transportadora de aminoácidos LivJ, posiblemente importante para la simbiosis, circunstancias ambas que conllevan a la necesidad de investigar si la correcta expresión de este sRNA en simbiosis es un factor de peso para el desarrollo de la misma y para la expresión de una actividad normal fijadora de nitrógeno.

En relación a ambos aspectos mencionados, Wang y colaboradores, a partir de la caracterización funcional de los genes codificantes para las fasinas PhaP1 y PhaP2, dieron inicio a una discusión acerca de la posible conexión entre los niveles de expresión de estas proteínas, la actividad fijadora de nitrógeno de los nódulos, la eficiencia simbiótica neta y el transporte de aminoácidos entre los bacteroides y la planta hospedadora (Wang, *et al.*, 2007).

En el presente Capítulo presentamos la caracterización morfológica (MET) y simbiótica tardía (fijación biológica de nitrógeno) de rizobios alterados en la expresión del sRNA Sm8.

5.2 Materiales y Métodos

5.2.1 Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas en este Capítulo se listan en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1 Cepas bacterianas utilizadas en el presente capítulo.

Cepa	Genotipo	Referencia o fuente
<i>S. meliloti</i>		
2011	Cepa silvestre, Str ^R	(Meade & Signer, 1977)
2011 $\Delta sm8$	2011 mutante en el gen <i>sm8</i>	Este trabajo

5.2.2 Esterilización de semillas en superficie y germinación

Se utilizó *Medicago sativa* (alfalfa) cv. Key 1 para realizar los ensayos en planta. Las semillas de alfalfa fueron esterilizadas en superficie por inmersión en etanol 96° durante 30 seg, seguido de una incubación en solución 20% v/v de lavandina comercial a 100 rpm durante 30 min. Finalmente, se lavaron 3 veces con agua destilada estéril y se distribuyeron de forma aséptica sobre la superficie de placas conteniendo agar-agua (1,2% p/v) en agua destilada, aprox. 50 semillas por placa, y se incubaron para su germinación en oscuridad a 22-24°C durante 24 hs.

5.2.3 Cultivo axénico de plantas

Se utilizaron macetas con vermiculita estéril previamente saturadas con medio Jensen sin nitrógeno (CaHPO₄, 1,0 g l⁻¹; K₂HPO₄, 0,2 g l⁻¹; MgSO₄.7H₂O, 0,2 g l⁻¹; NaCl, 0,2 g l⁻¹; FeCl₃, 0,1 g l⁻¹, solución de micronutrientes de Hoagland 1× (Hoagland & Arnon, 1938)) como soporte para el desarrollo vegetal (Jensen, 1942). Las plántulas se sembraron una vez que alcanzaron ≈50 mm de longitud de radícula (8 plantas por maceta). Las plantas fueron crecidas durante un período de 30 días post-inoculación (d.p.i) en invernáculo, bajo condiciones de temperatura controlada entre 22-24°C y con un fotoperíodo de 16 hs (iluminación natural suplementada con lámparas de mercurio). El riego de las plantas se realizó con medio Jensen sin nitrógeno 0,5×.

5.2.4 Inoculación de plántulas

Las plántulas se inocularon 72 hs luego de haber sido sembradas en las macetas. Para la inoculación se preparó una suspensión en medio Jensen conteniendo ≈1x10⁶ bacterias ml⁻¹, previamente colectadas de un cultivo en fase exponencial (DO₆₀₀ = 0,5) creciendo en medio TY a 28°C. Se dispensó 1 ml de la suspensión sobre toda la superficie de la vermiculita en cada maceta.

5.2.5 Determinación de biomasa seca aérea de las plantas y de nódulos

A los 30 días post-inoculación se procedió al descalce de las macetas. Se determinó la biomasa seca aérea de cada planta y la biomasa seca de nódulos del total de raíces en cada

maceta. Para ello, las fracciones aéreas se colocaron por separado en bolsas de papel y se deshidrataron a 65°C durante 48 hs. Los nódulos se colectaron y sometieron al mismo proceso de secado. Se determinaron los pesos secos mediante el uso de una balanza analítica.

5.2.6 Ensayos de Reducción de Acetileno (ARA)

Se realizó la determinación de ARA (Huss-Danell, 1978) sobre macetas conteniendo 8 plantas de alfalfa luego de 30 d.p.i. con la cepa silvestre o mutante $\Delta sm8$ de *S. meliloti* 2011. Cada maceta se colocó en una cubeta de 5 litros de capacidad con un volumen gaseoso disponible de aprox. 2 litros (reducido mediante el agregado de grava inerte) y se cerró herméticamente. Se inició la reacción enzimática con una inyección de acetileno hasta alcanzar una concentración inicial de 10% v/v. Se retiraron muestras de gas de 0,4 ml a los 15, 20, 25 y 30 minutos luego de iniciada la reacción. Las muestras de gas se inyectaron y fueron analizadas en un cromatógrafo gaseoso Hewlett-Packard HP6890plus conteniendo una columna Haysept con malla 80/100. La temperatura de la cámara de inyección se programó en 100°C, y la separación en la columna se realizó a 90°C. Se utilizó N₂ como gas portador con un flujo de 30 ml min⁻¹. El detector de ionización en llama (FID) funcionó con aire (300 ml min⁻¹) e H₂ (30 ml min⁻¹). Se determinó la cantidad de etileno presente en cada muestra por comparación con la respuesta del cromatógrafo a cantidades conocidas de etileno. Se expresó la actividad nitrogenasa como la cantidad de etileno producido (nmoles) por hora de reacción. Para realizar los cálculos se empleó la siguiente fórmula: ARA (nmol C₂H₄ hora⁻¹) = S × V × C, donde S es la tasa de producción de etileno (en ppm min⁻¹), V es el volumen de gas accesible en la cuba (en ml, determinado con agua al final del experimento), y C es una constante de conversión. Se aplicó la ley universal de los gases a 25°C para la transformación de volumen a moles de etileno.

5.2.7 Microscopía electrónica

Se colectaron nódulos luego de 30 d.p.i. de las raíces de plantas inoculadas con *S. meliloti* 2011 salvaje o mutante $\Delta sm8$ e inmediatamente se sumergieron y fijaron en una solución de glutaraldehído 2,5% p/v en buffer fosfato de sodio 200 mM (pH 7,2) durante 30 minutos a presión reducida. Los nódulos fijados se conservaron a 4°C en la solución fijadora hasta su posterior procesamiento. La deshidratación, inclusión y corte de los nódulos, así como la tinción y observación de los cortes preparados fueron realizados por el Servicio de Microscopía del Instituto de Patología Vegetal (INTA - Córdoba), bajo la supervisión de la Dra. Claudia Nome Docampo.

5.3 Resultados y Discusión

5.3.1 Bacteroides de *S. meliloti* 2011 $\Delta sm8$ localizados en la zona simbiótica proximal de fijación de nitrógeno en nódulos de alfalfa presentan gránulos de morfología compatible con PHB.

A la luz de los resultados que hemos expuesto en el Capítulo 3, nos preguntamos si, tal como describimos que ocurre en condiciones de vida libre ante la limitación de N y el exceso de C, la mutación en el gen *sm8* conduce a alteraciones del metabolismo de PHB que redundan en su acumulación en los rizobios durante la simbiosis con alfalfa. La acumulación de Sm8 conforme progresa la diferenciación de *S. meliloti* dentro del nódulo en el marco de la analogía que se presenta entre el entorno de los bacteroides y las condiciones en que se hallan las bacterias al abandonar el crecimiento exponencial saprofítico en ausencia de N y disponibilidad de C, sugieren que los rizobios debieron evolutivamente compatibilizar la presencia del sRNA y optimizar su impacto sobre el metabolismo en ambas situaciones. Nos propusimos por tanto evaluar si existe acumulación diferencial de PHB como consecuencia de la mutación de *sm8* en rizobios simbiosis de alfalfa. Para ello, llevamos a cabo el análisis de la presencia de estructuras con características compatibles con gránulos PHB (Hirsch, *et al.*, 1983) en bacteroides maduros (30 d.p.i) de *S. meliloti* 2011 silvestre, y de su mutante $\Delta sm8$. Como hemos mencionado en la Introducción de esta Tesis, *S. meliloti* no acumula cantidades significativas de PHB que deriven en la formación de gránulos visibles en tal estadio simbiótico. Sin embargo, sí se observa PHB con frecuencia en *S. meliloti* durante la infección temprana (hilo de infección dentro del nódulo previo a la diferenciación terminal). En el Capítulo anterior (Fig. 8A) presentamos un esquema en el que se indicaron sobre un nódulo típico indeterminado, las zonas asociadas al meristema (I), a la infección inicial (II), la fijación de nitrógeno (III), y a la de senescencia de los rizobios (IV).

En las fotografías presentadas en las Figuras 1A y 1B, se muestran bacteroides $\Delta sm8$ correspondientes a la zona simbiótica proximal de un nódulo maduro de alfalfa (zona IIIp) en los que se observan imágenes compatibles con gránulos de PHB. Contrastando con esta observación, y tal como era de esperarse en base a la bibliografía, no se encontraron estructuras con tales características en los bacteroides salvajes en el mismo estadio de diferenciación (Fig. 1C). Las imágenes presentadas son representativas de un total de 5 campos observados para cada una de las cepas.

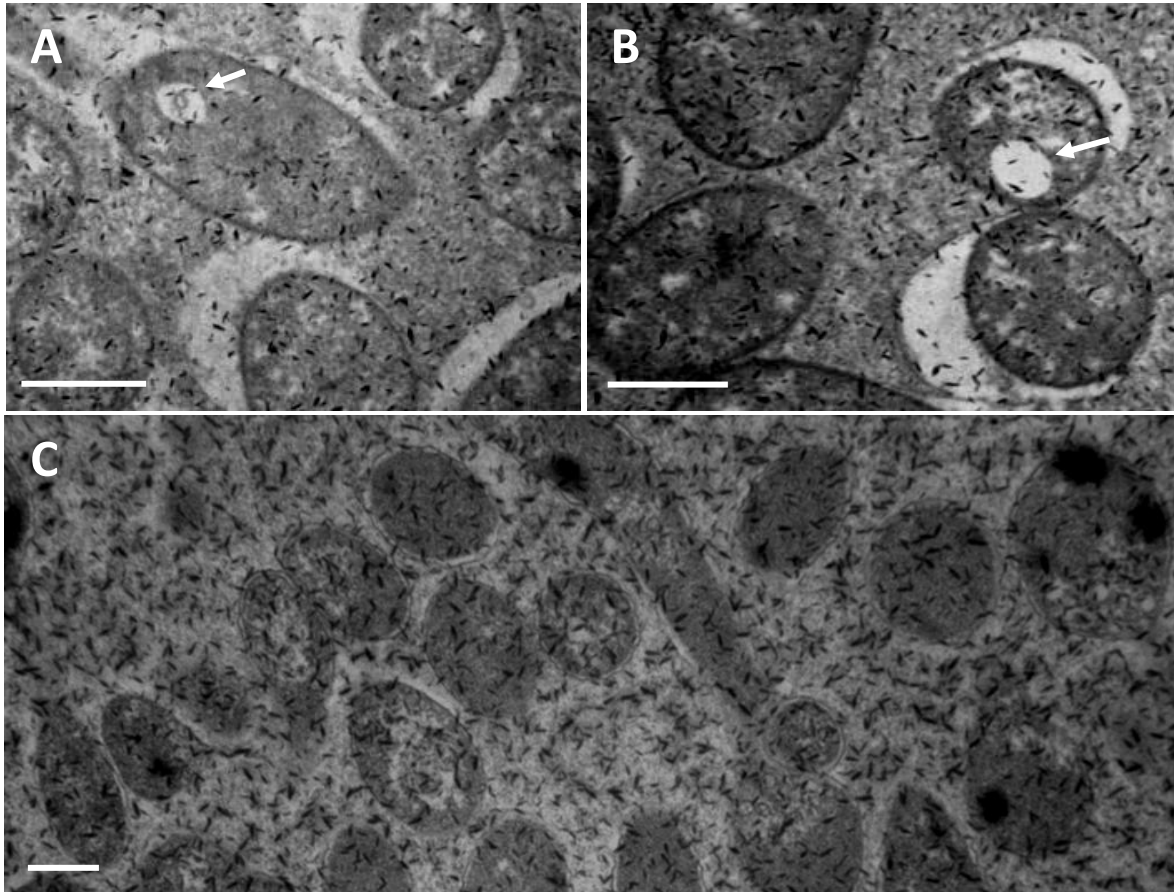


Figura 1. Ultraestructura de bacteroides maduros de *S. meliloti* 2011 salvaje (C) y $\Delta sm8$ (A y B) presentes en la región proximal a la raíz de la zona de fijación de nitrógeno (IIIp). Con flechas blancas se resaltan las estructuras de morfología compatible con gránulos de PHB. La barra de escala representa una longitud de 1 μm .

Una tendencia similar de acumulación de PHB en la cepa mutante $\Delta sm8$ se observó en la zona de fijación distal respecto de la raíz (zona IIIId) (Fig. 2) correspondiente, como se mencionó previamente, a bacterias que en promedio se encuentran menos diferenciadas que las enfocadas en la Figura 1 (zona IIIp). Sólo se observan gránulos compatibles con PHB en las bacterias mutantes.

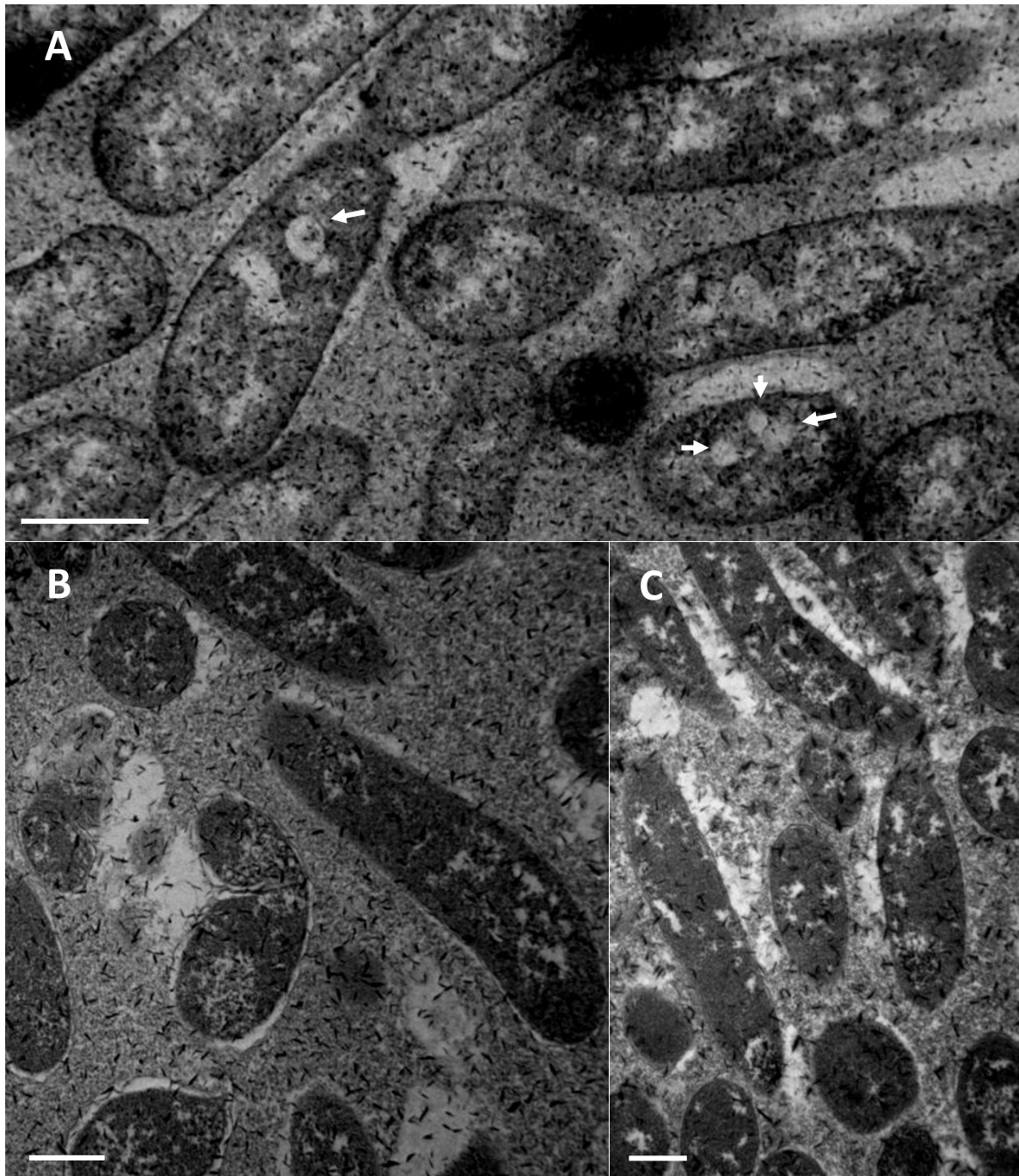


Figura 2. Ultraestructura de bacteroides maduros de *S. meliloti* 2011 salvaje (B y C) y $\Delta sm8$ (A) presentes en la región distal a la raíz de la zona de fijación de nitrógeno (III d). Con flechas blancas se resaltan las estructuras de morfología compatible con gránulos de PHB. La barra de escala representa una longitud de 1 μm .

5.3.2 Determinación del impacto de la mutación en el gen *sm8* sobre la actividad nitrogenasa específica en nódulos maduros mediante ensayos de ARA (ensayos de reducción de acetileno).

Con el propósito de estimar los niveles de fijación de nitrógeno de la cepa mutante $\Delta sm8$ respecto de la cepa salvaje en asociación con plantas de alfalfa, se determinó en primer lugar la actividad específica reductora de acetileno de nódulos de un mes (cuatro semanas post-inoculación). Los resultados obtenidos muestran que los nódulos infectados por la cepa mutante poseen una actividad específica fijadora de nitrógeno 20% mayor que la correspondiente a la cepa parental ($p < 0,01$) (Fig. 3).

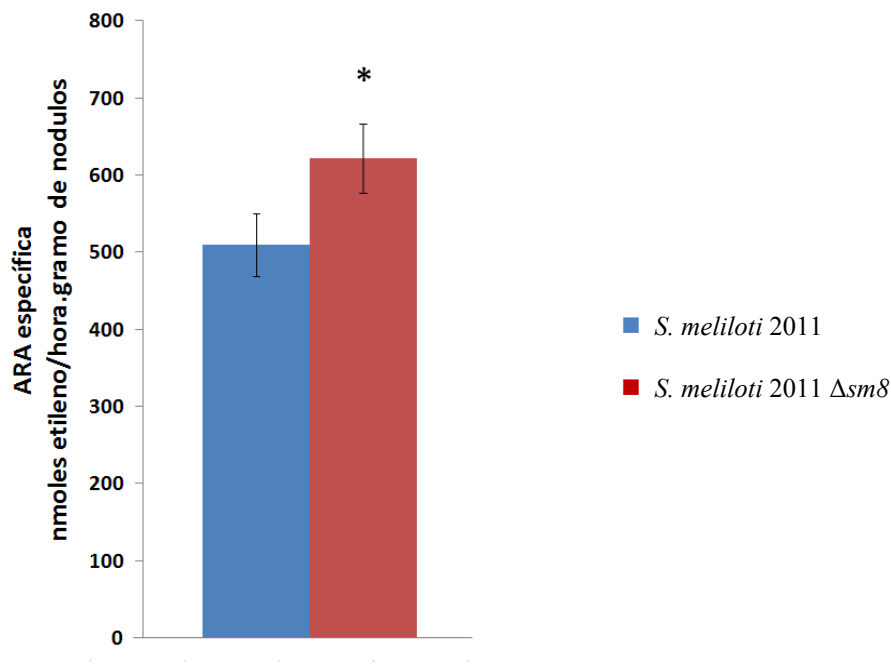


Figura 3. Actividad de fijación biológica de nitrógeno en nódulos infectados por la cepa *S. meliloti* 2011 silvestre y $\Delta sm8$. Los resultados corresponden al promedio de cuatro réplicas biológicas de la determinación, y representan el comportamiento observado en tres ensayos independientes. Los valores se informan como el promedio \pm desviación estándar.

* Las diferencias fueron estadísticamente significativas con un $p < 0,01$.

La morfología macroscópica de los nódulos infectados por ambas cepas no presentó diferencias significativas en relación al tamaño y forma, observándose en ambos casos la coloración rosada característica adoptada por la presencia de leghemoglobina en nódulos fijadores. No hemos observado diferencias significativas en el número de nódulos (ni en la competitividad) de las cepas en ensayos preliminares que hemos realizado (resultados no mostrados). Esta observación sugiere que la actividad nitrogenasa observada es posiblemente consecuencia de alteraciones fisiológicas en los propios nódulos maduros de la cepa mutante. Con la evidencia obtenida deberá analizarse si la mutación *sm8* afecta, además de la actividad fijadora tardía, la cinética con que se induce la misma a lo largo de la simbiosis.

5.3.3 Caracterización de la simbiosis del mutante $\Delta sm8$ con alfalfa.

En virtud del resultado precedente y de los fenotipos y marcadores moleculares asociados a Sm8 presentados en los capítulos 3 y 4 (acumulación de PHB, expresión de fasinas asociadas al polímero, expresión de un transportador de aminoácidos ramificados) analizamos si el aumento en la actividad de fijación biológica de nitrógeno observado como consecuencia de la mutación en el gen *sm8* se ve o no reflejado en un cambio en la eficiencia simbiótica (Olah, *et al.*, 2001) de la asociación. Para ello se determinó el peso seco promedio de la porción aérea de las plantas, y el peso del total de los nódulos presentes en las raíces inoculadas con cada una de las cepas. Cabe mencionar que el peso seco de la porción aérea de las plantas sin inocular fue un orden de magnitud inferior que el de las respectivas plantas inoculadas, acompañado este hecho por su apariencia clorótica.

Resultó interesante que la eficiencia simbiótica, en términos de la producción de biomasa seca aérea en relación la biomasa seca total de nódulos infectados por la cepa mutante, no acompañó al incremento de la actividad fijadora de nitrógeno observada para la cepa mutante (Fig. 4).

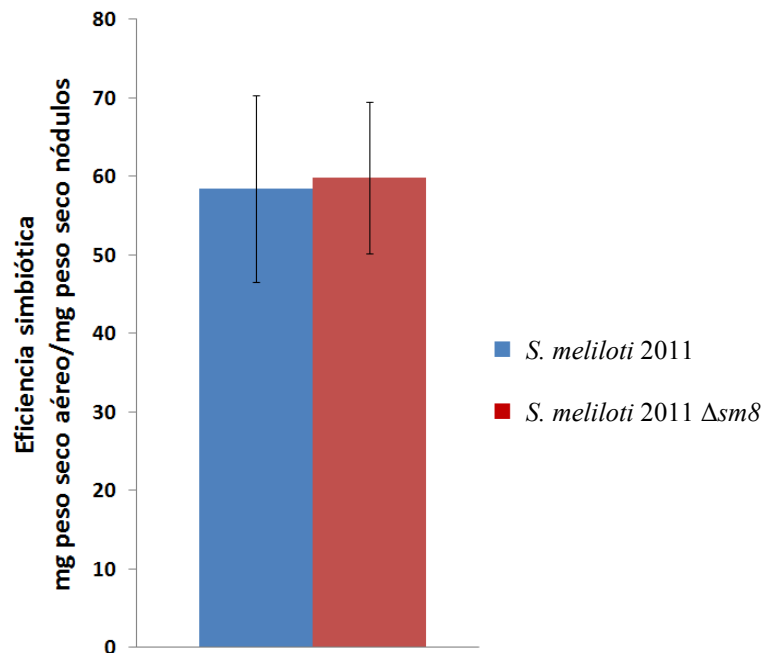


Figura 4. Estimación de la eficiencia de las simbiosis entre alfalfa y *S. meliloti* 2011 silvestre y $\Delta sm8$. Los resultados corresponden al promedio de cuatro réplicas biológicas de la determinación, y representan el comportamiento observado en tres ensayos idénticos independientes. Los valores se informan como el promedio \pm desviación estándar.

En consonancia con estos resultados, los promedios de biomasa seca aérea y de nódulos por planta no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,1$) entre plantas inoculadas por las diferentes cepas. Una masa seca aérea similar para ambas cepas, con una actividad específica (ARA)/nódulo mayor para la cepa mutante $\Delta sm8$, implica una menor eficiencia en la forma en que la cepa mutante transfiere el nitrógeno fijado a la planta en crecimiento, o una menor asimilación del amonio por parte de la célula vegetal y la posible excreción al medio extracelular.

5.4 Conclusiones

La compatibilización e integración que deben establecer los rizobios en términos de la regulación de los procesos metabólicos que son funcionales tanto durante la fase de vida libre como en las instancias simbióticas es muy compleja atento a la cantidad de variables y espacios de regulación que debe atender (Prell & Poole, 2006). Se trata de un balance fino que evolutivamente ha debido optimizar y compatibilizar el ajuste (*fitness*) de los microorganismos en su fase de vida libre y en simbiosis con la planta hospedadora.

El patrón de expresión que presenta el sRNA Sm8 en rizobios simbióticos, en conjunto con los hallazgos presentados en Capítulos previos nos impulsó a evaluar el posible rol de este sRNA durante la vida asociativa de los rizobios, haciendo foco en el comportamiento simbiótico tardío. Consistente con la correlación entre la expresión de Sm8 y la acumulación de PHB en vida libre, hemos observado también presencia de gránulos compatibles con la presencia de dicho polímero en bacteroides mutantes en estadíos simbióticos (zonas proximal y distal de fijación) en los que la cepa salvaje no mostró presencia de dicho polímero.

Hemos encontrado que la mutación en el gen *sm8* conduce a un incremento en la actividad específica de fijación de nitrógeno de nódulos colonizados por *S. meliloti* durante su interacción con alfalfa. Sin embargo, este fenómeno no se tradujo en un incremento de la eficiencia simbiótica (peso seco aéreo de plantas/peso seco de nódulos) hecho que hubiera sido esperable si el aumento del nitrógeno fijado se hubiese trasladado a la biomasa vegetal. Habrá que analizar cuáles son los factores que desacoplan el uso por parte de la planta del mayor nitrógeno fijado, así como el destino de este último. La preservación de Sm8 debe ser consistente con beneficios en la capacidad de adaptación, supervivencia, y competición por parte del rizobio en el entorno suelo. Desde la mirada simbiótica a partir de los datos que hemos colectado, aparece como inconveniente para el hospedador la pérdida de un sRNA cuya ausencia redundaría en el uso de recursos en una actividad fijadora que no será trasladada en la misma proporción a los tejidos de la planta. Se han descrito previamente mutaciones que conducen a alteraciones fisiológicas en los rizobios que derivan en fenotipos $\text{Fix}^+ \text{Eff}^-$, entre ellas las mutaciones *aap bra* en *R. leguminosarum*, o en los genes *glnD* o *glnB* en *S. meliloti* (Arcondeguy, *et al.*, 1997, Lodwig, *et al.*, 2003, Yurgel & Kahn, 2008). Podrá analizarse si en estos casos operan los mismos mecanismos restrictivos que en el mutante Sm8 para que los aumentos de fijación de nitrógeno no se trasladen luego al uso eficiente del producto generado por parte de la planta. Al mismo tiempo, y atendiendo al alto grado de conservación de Sm8 en rizobios, podrá investigarse el rol de dicho sRNA en otras simbiosis (nódulos determinados) donde la presencia y dinámica de síntesis de PHB es diferente a la conocida para las simbiosis de *S. meliloti* con *Medicago* spp. Dichos análisis deberán ser integrados con el rol del mismo sRNA en el metabolismo del rizobio durante la vida saprofítica que hemos discutido en los capítulos precedentes.

CONCLUSIONES GENERALES

Durante los últimos 8 años, el campo de estudio de la riboregulación en *S. meliloti* se ha centrado principalmente en la caracterización de la estructura y dinámica del transcriptoma de ARNs pequeños no codificantes y de la función biológica de las proteínas involucradas en la mediación de los mecanismos riboregulatorios (Jimenez-Zurdo, *et al.*, 2013). La creciente detección de ARNs pequeños que se expresan desde el genoma de *S. meliloti* motivó a llevar adelante su caracterización funcional. Sin embargo, y como consecuencia de las limitaciones técnicas existentes para promover un abordaje sistemático al estudio de la función biológica de los mismos, en gran medida éstas permanecen aún desconocidas. En este Trabajo de Tesis hemos iniciado la caracterización funcional del ARN pequeño Sm8 de *S. meliloti* basados principalmente en las características que observamos en su perfil de expresión no constitutivo en vida libre, y en los indicios de la conservación evolutiva en otros rizobios y géneros bacterianos filogenéticamente distantes y con estilos de vida variados. El abordaje adoptado para la caracterización funcional del gen *sm8* contempló un análisis integral de su evolución y distribución filogenética (Capítulo 1), la búsqueda y estudio de fenotipos asociados a alteraciones en la actividad del sRNA en la vida libre (Capítulo 3) y simbiótica de los rizobios (Capítulo 5), y la exploración mediante herramientas transcriptómicas y proteómicas de los determinantes moleculares asociados al regulón del sRNA (Capítulo 4). Para ello, fue necesario y fundamental, desarrollar herramientas que permitan modificar los niveles intracelulares del transcripto Sm8 (Capítulo 2).

Hemos mostrado que *sm8* pertenece a una familia de genes de ARNs homólogos - que hemos denominado $\alpha 8$ - la cual ha evolucionado a partir de un ancestro común que ha divergido del orden de los Rickettsiales para dar origen a los miembros presentes en el resto de las especies de la clase de las alfa-proteobacterias (Capítulo 1). A lo largo de la evolución, los miembros de esta familia han conservado rasgos estructurales y secuenciales, destacándose la presencia de un núcleo interno invariante de 10 nucleótidos de longitud. La estricta conservación de esta región la señala como un elemento clave para su función biológica, a juzgar por los efectos derivados de su mutación (Capítulos 2 a 5), y que muy posiblemente esté involucrada en interacciones de apareamiento de bases de Sm8 con sus moléculas de mRNA blanco. El trazado evolutivo del gen *sm8*, facilitado por el elevado grado de microsintenia que presentaron miembros de la familia $\alpha 8$ con ortólogos de un gen codificante para una proteína con probable actividad N-formilglutamato amidohidrolasa, nos ha permitido identificar una subfamilia de genes ortólogos de *sm8*, la cual denominamos $\alpha 8s1$, que ha evolucionado verticalmente en las alfa-proteobacterias desde el origen más remoto de la familia y hasta las especies actuales. Resultó especialmente interesante, y promueve nuevos interrogantes, la moderada variabilidad secuencial asociada a la región 5' de los miembros de esta subfamilia de ortólogos: ¿qué motiva la conservación del núcleo secuencial interno en todos los miembros de la familia, con mucho menos conservación en el extremo 5' terminal del gen acotada sólo a pequeños *clusters* y en géneros filogenéticamente emparentados? ¿Puede la variabilidad observada entre *clusters* asociarse a diferencias funcionales entre los sRNA de los distintos grupos filogenéticos que integran la subfamilia?

¿Existe un rol funcional general canónico para esta familia de sRNAs conservada en genomas de especies cuya biología difiere tan marcadamente? Los avances respecto a la caracterización funcional y de los determinantes moleculares a través de los que operan cada uno de los miembros de la subfamilia $\alpha 8s1$, nos permitirán sin duda disponer de criterios adicionales para la inclusión de nuevos miembros y apreciar de mejor modo su extensión filogenética. La funcionalidad de los genes homólogos de *sm8* en otras especies resta aún ser explorada y, en este sentido, resultados preliminares de nuestro grupo indican que la expresión de ortólogos del gen en otras especies del orden de los Rizobiales distintas de *S. meliloti* (*A. tumefaciens*, *R. leguminosarum* y *R. etli*) respondería a estímulos similares.

La comprensión de modo más acabado del origen y la evolución del gen *sm8* (y de su entorno), que aquí hemos abordado (Capítulo 1), permitirá ensayar correlaciones entre la distribución de este elemento regulatorio, y las actividades metabólicas específicas en las que impacta en los distintos géneros en los que los ortólogos de *sm8* están presente.

El estudio del rol de Sm8 en la biología en vida libre de *S. meliloti*, a través de la caracterización de fenotipos asociados a la pérdida de su función (Capítulo 2), nos permitió hallar un vínculo entre la actividad del sRNA y la generación de polihidroxibutirato en condiciones de limitación de nitrógeno y disponibilidad de carbono en el medio de cultivo (Capítulo 3). Si bien se han descrito múltiples puntos de regulación sobre el metabolismo de síntesis y degradación de PHB en bacterias, la ausencia de efectos secundarios por sobreexpresión de Sm8 en los rizobios nos permite especular que el sRNA no actuaría a nivel del metabolismo central sino que estaría implicado en la regulación de las vías exclusivas de flujo de C hacia PHB. Según hemos visto, la inducción de Sm8 modula el metabolismo de PHB de modo de restringir su acumulación, contribuyendo de esta forma al ajuste fino de la biosíntesis de PHB; la ventaja biológica asociada a esta regulación no está clara, y deberá ser explorada en condiciones que simulen de mejor modo las condiciones naturales en que habitan los rizobios.

Con el propósito de dar luz a los factores moleculares asociados a la función de Sm8 y reconocer los mediadores de la respuesta celular al mismo, exploramos los cambios en el perfil transcriptómico y proteómico de los rizobios asociados a la sobreexpresión o la pérdida del regulador. Dicho análisis nos permitió identificar y validar la presencia de un grupo de marcadores génicos cuya abundancia se encuentra vinculada a Sm8 (Capítulo 4).

En lo que respecta al modulón de síntesis y degradación de PHB, la sobreexpresión de Sm8 redujo considerablemente la abundancia de los transcriptos de los genes *phaR*, *phaP1* y *phaZ*. El hecho de haber evidenciado esta regulación en condiciones de crecimiento exponencial en las que la síntesis de PHB no se halla naturalmente estimulada, sugiere fuertemente el posible efecto primario mediado por Sm8 sobre la expresión de estos genes. Por su parte, el análisis proteómico reveló que el fenotipo correspondiente a la mayor acumulación del polímero en la cepa mutante, es acompañado a nivel molecular por un incremento relativo de los niveles de las proteínas fasinias asociadas a gránulos de PHB. Si bien no hemos demostrado la interacción directa de Sm8 con los mensajeros de los productos

identificados, en varios de ellos hemos reconocido secuencias potenciales de interacción con el sRNA en las cercanías del codón de inicio, y cuya significación deberá ser validada con herramientas ya disponibles en el laboratorio para el análisis de la eficiencia traduccional de regiones líderes de mensajeros.

Si bien no sería la regulación sobre el metabolismo de PHB el único punto de regulación modulado por Sm8, resulta interesante el hecho que tanto el regulador como la capacidad de metabolizar el C bajo la forma de PHB se hallan ampliamente distribuidas en alfa-proteobacterias (Capítulo 1). En ciertos casos, eventos de reducción genómica han llevado a la pérdida conjunta del sRNA y las funciones metabólicas asociadas a PHB (*Brucella*, *Bartonella*, *Zymomonas*). La presencia de *sm8* en un genoma que carece de los genes que codifican para la maquinaria del metabolismo de PHB sólo se ha observado en *O. anthropi*. Si bien puede haber tenido lugar una divergencia funcional del sRNA, el fenómeno observado en *O. anthropi* refuerza la idea de la complejidad y posible multiplicidad de blancos regulatorios de Sm8 más allá de la regulación de acumulación de reservas de PHB.

En relación a otros blancos de regulación en *S. meliloti* resultó especialmente interesante el hallazgo de la regulación ejercida por Sm8 sobre la abundancia de la proteína LivJ, ortóloga del transportador de aminoácidos ramificados y alanina BraC3 de *R. leguminosarum* (Capítulo 4). Si bien en condiciones de crecimiento saprofítico en medio definido, la importación de aminoácidos no resultaría crítica para sustentar el metabolismo microbiano, el rol de este transportador parecería cobrar relevancia durante la vida simbiótica de *S. meliloti* (Prell, *et al.*, 2010, Roux, *et al.*, 2014). El análisis de la abundancia relativa del mRNA de LivJ respecto a la de los mensajeros de los transportadores AapJ y LivK conforme progresa la infección en el nódulo y la diferenciación de los rizobios a bacteroides maduros, sugiere un rol predominante de LivJ en el transporte de aminoácidos ramificados provistos por la célula vegetal. No está claro aún si la ausencia de fenotipo asociado a la mutación de *aapJ* y *livK* en la simbiosis entre *S. meliloti* y alfalfa se ve fundada en la ausencia del fenómeno de auxotrofia simbiótica que se ha caracterizado en interacciones entre otras especies de rizobios y leguminosas (Prell, *et al.*, 2010), o en la existencia de un transportador adicional (posiblemente LivJ) que permite sostener el flujo de aminoácidos ramificados hacia la bacteria. Según hemos demostrado, los niveles de Sm8 regulan la abundancia del transportador LivJ en vida libre (¿y en simbiosis?), poniendo en evidencia un rol del sRNA que se extiende claramente más allá del propio PHB como polímero de reserva.

Finalmente, la acumulación progresiva del transcripto Sm8 conforme los rizobios progresan desde la zona de infección temprana hacia la zona de bacteroides maduros (Roux, *et al.*, 2014), en conjunto con las evidencias experimentales que hemos hallado en vida libre sobre la regulación que Sm8 ejerce sobre el metabolismo de PHB y los niveles del transportador LivJ, conllevaron a la necesidad de investigar si la correcta expresión del sRNA durante la simbiosis es un factor de peso para el desarrollo de la misma y la expresión de una actividad normal fijadora de nitrógeno. Las observaciones microscópicas que hemos

realizado mostraron que la mutación en el gen *sm8* conduce en los rizobios a la aparición de gránulos compatibles con la presencia de PHB en bacteroides maduros, situación que no se observa en los rizobios salvajes. Al mismo tiempo, determinamos que en el mutante $\Delta sm8$ existe un incremento de la actividad específica de fijación de nitrógeno (actividad/masa nodular), aunque este fenómeno no se tradujo en un aumento de la eficiencia simbiótica que hubiera sido esperable si el aumento del nitrógeno fijado se hubiese trasladado a la biomasa vegetal. En relación a esta observación debe considerarse la posibilidad de que la mayor eficiencia fijadora de los nódulos mutantes sólo se exprese tardíamente, y que por esa razón no haya impactado en diferencias en el peso aéreo de las plantas al mes de la inoculación. Para aclarar estas cuestiones podrán evaluarse las capacidades de fijación a distintos tiempos post-inoculación, realizar medidas de peso seco sobre plantas adultas de mayor edad (tiempos más largos post-inoculación), y determinar contenidos de nitrógeno de la parte aérea. Podrán además caracterizarse las etapas más tempranas del proceso simbiótico en el mutante, atendiendo especialmente la infección inicial durante la que naturalmente tiene lugar la síntesis y metabolización de PHB.

Los resultados que hemos presentado en este trabajo de tesis han abordado la caracterización de aspectos evolutivos, genéticos, bioquímicos, y simbióticos de un nuevo sRNA en *S. meliloti*, el simbiote de alfalfa. En particular, se destaca la caracterización de un claro y consistente fenotipo asociado a la pérdida de función de un sRNA, un hecho poco frecuente en la literatura sobre riboregulación tanto de rizobios, como de otros microorganismos procarióticos. Los resultados han mostrado que la expresión del gen *sm8* está asociada a la modulación del destino del carbono en situaciones relevantes para la vida del rizobio (limitaciones de N en vida libre, zona de bacteroides maduros en el nódulo). Asociado a esos cambios se han identificado -con diferentes herramientas- genes y proteínas cuya abundancia está asociada a cambios en el sRNA, y en directa relación con los cambios bioquímicos observados.

A partir de los resultados alcanzados podrán evaluarse individualmente interacciones directas entre *Sm8* y sus potenciales mRNA blanco, profundizar el análisis de los factores que regulan la expresión del propio sRNA (Trabajo en curso Lic. Germán Ceizel Borella), y extender el estudio funcional a otros rizobios con hincapié en aquellos en los que se desarrollan nódulos determinados con una dinámica de síntesis de PHB diferente a la del modelo simbiótico estudiado en este Trabajo de Tesis.

ANEXO

Tabla S1. Genes fuerte y moderadamente reprimidos durante la sobreexpresión constitutiva de Sm8^{a,b}

ID del Gen	Nombre del Gen	Descripción	Valor M	Proteoma $\Delta sm8^a$	Valor M Proteoma Δhfq^b	CoIP Hfq? ^c	sRNA-mRNA
<i>SMc01200</i>	-	Proteína hipotética transmembrana	-0,61	-	-	-	-
<i>SMb20649</i>	<i>nadE1</i>	Probable NAD ⁺ sintetasa amonio-dependiente	-0,63	-	-	-	-
<i>SMc00326</i>	<i>fabI2</i>	Probable proteína NADH reductasa transportadora enoil-acil	-0,64	-	-	-	-
<i>SMc03134</i>	-	Proteína hipotética transmembrana	-0,65	-	-	-	-
<i>SMb20488</i>	-	Proteína hipotética conservada	-0,66	-	-0,30	-	-
<i>SMc00740</i>	-	Proteína hipotética conservada	-0,68	-	-	-	-
<i>SMc03201</i>	<i>bkdAa</i>	Probable 2-oxoisovalerato deshidrogenasa subunidad alfa	-0,68	-	-	SÍ	-
<i>SMc03961</i>	<i>sqdB</i>	Proteína de biosíntesis de sulfolípidos	-0,69	-	-	-	-
<i>SMc01842</i>	-	Probable regulador transcripcional - metiltransferasa	-0,71	-	-	-	-
<i>SMc04459</i>	<i>ftsH</i>	Proteína transmembrana metaloproteasa	-0,71	-	-	-	-
<i>SMc02373</i>	-	Transposasa	-0,72	-	-	-	-
<i>SMc00078</i>	<i>livJ</i>	Probable Proteína de unión a Leu/Ile/Val - Transportador ABC	-0,73	SÍ	1,26	SÍ	SÍ
<i>SMc02479</i>	<i>mdh</i>	Malato deshidrogenasa	-0,74	-	-	SÍ	-
<i>SMc03783</i>	<i>ctpA</i>	Péptido señal de precursor de proteasa carboxi-terminal	-0,74	-	-	-	-
<i>SMc01140</i>	-	Probable proteína de modulación del factor σ^{54}	-0,74	SÍ	-	SÍ	SÍ
<i>SMc03925</i>	<i>pgm</i>	Fosfoglucomutasa	-0,75	-	-	-	-
<i>SMc04018</i>	-	Probable precursor de 5'-nucleotidasa	-0,75	-	-	-	-
<i>SMc01339</i>	<i>TRm11a</i>	Transposasa	-0,78	-	-	-	-
<i>SMc01033</i>	-	Probable proteína arilesterasa	-0,79	-	-	-	-
<i>SMA1803</i>	<i>TRm2011-2a</i>	Transposasa	-0,79	-	-	-	-
<i>SMc02689</i>	-	Probable aldehído deshidrogenasa	-0,79	-	-	SÍ	-
<i>SMc02544</i>	-	Proteína hipotética conservada	-0,81	-	-	-	-
<i>SMc00737</i>	-	Proteína hipotética conservada	-0,82	-	-	-	-
<i>SMc03780</i>	<i>rsfS</i>	Factor de silenciamiento de ribosomas	-0,83	-	1,13	-	-
<i>SMc03313</i>	-	Transposasa	-0,83	-	-	-	-
<i>SMc03948</i>	-	Transposasa	-0,84	-	-	-	-
<i>SMc00949</i>	-	Proteína hipotética conservada	-0,85	-	-	-	-
<i>SMc02398</i>	<i>TRm11a</i>	Transposasa	-0,86	-	-	-	-

Continuación Tabla S1

ID del Gen	Nombre del Gen	Descripción	Valor M	Proteoma $\Delta sm8^a$	Valor M Proteoma Δhfq^b	CoIP Hfq? ^c	sRNA-mRNA
<i>SMc00766</i>	-	Probable factor de transcripción	-0,88	-	-	-	-
<i>SMa0018</i>	<i>TRm2011-2a</i>	Transposasa	-0,90	-	-	-	-
<i>SMc01260</i>	-	Probable factor de transcripción	-0,92	-	-	-	-
<i>SMc03088</i>	<i>TRm11a</i>	Transposasa	-0,92	-	-	-	-
<i>SMc02373</i>	-	Proteína hipotética	-0,93	-	-	-	-
<i>SMc02173</i>	-	Proteína hipotética conservada	-0,94	-	-	SÍ	-
<i>SMc01905</i>	<i>lon</i>	Proteasa dependiente de ATP	-0,96	-	-	SÍ	-
<i>SMc02146</i>	-	Proteína periplásmica de unión a fosfato	-0,96	-	-	SÍ	-
<i>SMc03979</i>	<i>gap</i>	Gliceraldehído 3-P deshidrogenasa	-0,97	-	-	-	-
<i>SMc01534</i>	-	Probable omega-aminoácido-piruvato transaminasa	-0,98	-	-	-	SÍ
<i>SMc02374</i>	-	Proteína hipotética	-1,10	-	-	-	-
<i>SMc01500</i>	<i>smoS</i>	Sorbitol deshidrogenasa	-1,15	-	-1,25	SÍ	-
<i>SMc03880</i>	<i>phaR/aniA</i>	Regulador del flujo de C	-1,15	-	1,50	SÍ	SÍ
<i>SMb20727</i>	-	Proteína hipotética	-1,46	-	-	-	-
<i>SMc02111</i>	<i>phaP2</i>	Fasina - Proteína asociada a gránulos de PHA	-1,60	SÍ	2,43	-	SÍ

^a En gris se remarcan aquellos genes sobre los que se ha ampliado la discusión en el curso del Capítulo 4.

^b La descripción del contenido de cada columna se encuentra detallada en la tabla 4.2.

Tabla S2. Genes moderadamente inducidos durante la sobreexpresión constitutiva de $Sm8^a$

ID del Gen	Nombre del Gen	Descripción	Valor M	Proteoma $\Delta sm8^a$	Valor M Proteoma a Δhfq^b	CoIP Hfq? ^c
<i>SMb20911</i>	-	Proteína hipotética	0,82	-	-	-
<i>SMa0063</i>	-	Probable factor de transcripción de la familia GntR	0,75	-	-	-
<i>SMa0951</i>	-	Proteína permeasa de transportador ABC tipo AttB	0,64	-	-	-

^a La descripción del contenido de cada columna se encuentra detallada en la tabla 4.2.

BIBLIOGRAFÍA

- Aiba H.** 2007. Mechanism of RNA silencing by Hfq-binding small RNAs. *Curr Opin Microbiol* **10**: 134-139.
- Albaum SP, Neuweiger H, Franzel B, Lange S, Mertens D, Trotschel C, Wolters D, Kalinowski J, Nattkemper TW & Goesmann A.** 2009. Qupe--a rich Internet application to take a step forward in the analysis of mass spectrometry-based quantitative proteomics experiments. *Bioinformatics* **25**: 3128-3134.
- Altuvia S, Weinstein-Fischer D, Zhang A, Postow L & Storz G.** 1997. A small, stable RNA induced by oxidative stress: role as a pleiotropic regulator and antimutator. *Cell* **90**: 43-53.
- Altuvia S, Zhang A, Argaman L, Tiwari A & Storz G.** 1998. The *Escherichia coli* OxyS regulatory RNA represses *fhlA* translation by blocking ribosome binding. *EMBO J* **17**: 6069-6075.
- Andersen J & Delihias N.** 1990. *micF* RNA binds to the 5' end of *ompF* mRNA and to a protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **29**: 9249-9256.
- Antal M, Bordeau V, Douchin V & Felden B.** 2005. A small bacterial RNA regulates a putative ABC transporter. *J Biol Chem* **280**: 7901-7908.
- Arcondeguy T, Huez I, Tillard P, Gangneux C, de Billy F, Gojon A, Truchet G & Kahn D.** 1997. The *Rhizobium meliloti* PII protein, which controls bacterial nitrogen metabolism, affects alfalfa nodule development. *Genes Dev* **11**: 1194-1206.
- Argaman L, Hershberg R, Vogel J, Bejerano G, Wagner EG, Margalit H & Altuvia S.** 2001. Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*. *Curr Biol* **11**: 941-950.
- Arias A, Cervenansky C, Gardiol A & Martinez-Drets G.** 1979. Phosphoglucose isomerase mutant of *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **137**: 409-414.
- Barnett MJ, Toman CJ, Fisher RF & Long SR.** 2004. A dual-genome symbiosis chip for coordinate study of signal exchange and development in a prokaryote-host interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 16636-16641.
- Barnett MJ, Fisher RF, Jones T, Komp C, Abola AP, Barloy-Hubler F, Bowser L, Capela D, Galibert F, Gouzy J, Gurjal M, Hong A, Huizar L, Hyman RW, Kahn D, Kahn ML, Kalman S, Keating DH, Palm C, Peck MC, Surzycki R, Wells DH, Yeh K-C, Davis RW, Federspiel NA & Long SR.** 2001. Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 9883-9888.
- Barra-Bily L, Pandey SP, Trautwetter A, Blanco C & Walker GC.** 2010. The *Sinorhizobium meliloti* RNA chaperone Hfq mediates symbiosis of *S. meliloti* and alfalfa. *J Bacteriol* **192**: 1710-1718.

- Barra-Bily L, Fontenelle C, Jan G, Flechard M, Trautwetter A, Pandey SP, Walker GC & Blanco C.** 2010. Proteomic alterations explain phenotypic changes in *Sinorhizobium meliloti* lacking the RNA chaperone Hfq. *J Bacteriol* **192**: 1719-1729.
- Barrangou R & Marraffini LA.** 2014. CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Mol Cell* **54**: 234-244.
- Batut J, Andersson SG & O'Callaghan D.** 2004. The evolution of chronic infection strategies in the alpha-proteobacteria. *Nat Rev Microbiol* **2**: 933-945.
- Becker A, Overloper A, Schluter JP, Reinkensmeier J, Robledo M, Giegerich R, Narberhaus F & Evguenieva-Hackenberg E.** 2014. Riboregulation in plant-associated alpha-proteobacteria. *RNA Biol* **11**: 550-562.
- Becker A, Berges H, Krol E, Bruand C, Ruberg S, Capela D, Lauber E, Meilhoc E, Ampe F, de Bruijn FJ, Fourment J, Francez-Charlot A, Kahn D, Kuster H, Liebe C, Puhler A, Weidner S & Batut J.** 2004. Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Mol Plant Microbe Interact* **17**: 292-303.
- Beisel CL & Storz G.** 2010. Base pairing small RNAs and their roles in global regulatory networks. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 866-882.
- Benson DR.** 1988. The genus *Frankia*: actinomycete symbionts of plants. *Microbiol Sci* **5**: 9-12.
- Beringer JE.** 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* **84**: 188-198.
- Bernhart SH, Hofacker IL, Will S, Gruber AR & Stadler PF.** 2008. RNAalifold: improved consensus structure prediction for RNA alignments. *BMC Bioinformatics* **9**: 474.
- Bouche F & Bouche JP.** 1989. Genetic evidence that DicF, a second division inhibitor encoded by the *Escherichia coli* *dicB* operon, is probably RNA. *Mol Microbiol* **3**: 991-994.
- Boussau B, Karlberg EO, Frank AC, Legault BA & Andersson SG.** 2004. Computational inference of scenarios for alpha-proteobacterial genome evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 9722-9727.
- Boysen A, Moller-Jensen J, Kallipolitis B, Valentin-Hansen P & Overgaard M.** 2010. Translational regulation of gene expression by an anaerobically induced small non-coding RNA in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **285**: 10690-10702.
- Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.

- Braunegg G, Sonnleitner B & Lafferty RM.** 1978. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *European journal of applied microbiology and biotechnology* **6**: 29-37.
- Breaker RR.** 2011. Prospects for riboswitch discovery and analysis. *Mol Cell* **43**: 867-879.
- Brownlee GG.** 1971. Sequence of 6S RNA of *E. coli*. *Nat New Biol* **229**: 147-149.
- Burge SW, Daub J, Eberhardt R, Tate J, Barquist L, Nawrocki EP, Eddy SR, Gardner PP & Bateman A.** 2013. Rfam 11.0: 10 years of RNA families. *Nucleic Acids Res* **41**: D226-232.
- Capela D, Filipe C, Bobik C, Batut J & Bruand C.** 2006. *Sinorhizobium meliloti* differentiation during symbiosis with alfalfa: a transcriptomic dissection. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 363-372.
- Caswell CC, Gaines JM & Roop RM, 2nd.** 2012. The RNA chaperone Hfq independently coordinates expression of the VirB type IV secretion system and the LuxR-type regulator BabR in *Brucella abortus* 2308. *J Bacteriol* **194**: 3-14.
- Cook DR.** 2004. Unraveling the mystery of Nod factor signaling by a genomic approach in *Medicago truncatula*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 4339-4340.
- Coornaert A, Lu A, Mandin P, Springer M, Gottesman S & Guillier M.** 2010. MicA sRNA links the PhoP regulon to cell envelope stress. *Mol Microbiol* **76**: 467-479.
- Corbino KA, Barrick JE, Lim J, Welz R, Tucker BJ, Puskarz I, Mandal M, Rudnick ND & Breaker RR.** 2005. Evidence for a second class of S-adenosylmethionine riboswitches and other regulatory RNA motifs in alpha-proteobacteria. *Genome Biol* **6**: R70.
- Coyer J, Andersen J, Forst SA, Inouye M & Delihans N.** 1990. *micF* RNA in *ompB* mutants of *Escherichia coli*: different pathways regulate *micF* RNA levels in response to osmolarity and temperature change. *J Bacteriol* **172**: 4143-4150.
- Chain PS, Lang DM, Comerci DJ, Malfatti SA, Vergez LM, Shin M, Ugalde RA, Garcia E & Tolmasky ME.** 2011. Genome of *Ochrobactrum anthropi* ATCC 49188 T, a versatile opportunistic pathogen and symbiont of several eukaryotic hosts. *J Bacteriol* **193**: 4274-4275.
- Chao TC, Buhrmester J, Hansmeier N, Puhler A & Weidner S.** 2005. Role of the regulatory gene *rirA* in the transcriptional response of *Sinorhizobium meliloti* to iron limitation. *Appl Environ Microbiol* **71**: 5969-5982.
- Chao Y & Vogel J.** 2010. The role of Hfq in bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol* **13**: 24-33.
- Chen S, Zhang A, Blyn LB & Storz G.** 2004. MicC, a second small-RNA regulator of Omp protein expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**: 6689-6697.

- De Lay N & Gottesman S.** 2009. The Crp-activated small noncoding regulatory RNA CyaR (RyeE) links nutritional status to group behavior. *J Bacteriol* **191**: 461-476.
- Degelau A, Scheper T, Bailey JE & Guske C.** 1995. Fluorometric measurement of poly- β hydroxybutyrate in *Alcaligenes eutrophus* by flow cytometry and spectrofluorometry. *Appl Microbiol Biotechnol* **42**: 653-657.
- del Val C, Rivas E, Torres-Quesada O, Toro N & Jimenez-Zurdo JI.** 2007. Identification of differentially expressed small non-coding RNAs in the legume endosymbiont *Sinorhizobium meliloti* by comparative genomics. *Mol Microbiol* **66**: 1080-1091.
- del Val C, Romero-Zaliz R, Torres-Quesada O, Peregrina A, Toro N & Jimenez-Zurdo JI.** 2012. A survey of sRNA families in alpha-proteobacteria. *RNA Biol* **9**: 119-129.
- Dixon R & Kahn D.** 2004. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat Rev Microbiol* **2**: 621-631.
- Dondrup M, Goesmann A, Bartels D, Kalinowski J, Krause L, Linke B, Rupp O, Sczyrba A, Puhler A & Meyer F.** 2003. EMMA: a platform for consistent storage and efficient analysis of microarray data. *J Biotechnol* **106**: 135-146.
- Dos Santos PC & Dean DR.** 2011. Co-ordination and fine-tuning of nitrogen fixation in *Azotobacter vinelandii*. *Mol Microbiol* **79**: 1132-1135.
- Douchin V, Bohn C & Boulloc P.** 2006. Down-regulation of porins by a small RNA bypasses the essentiality of the regulated intramembrane proteolysis protease RseP in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **281**: 12253-12259.
- Drummond MH.** 1984. The nitrogen fixation genes of *Klebsiella pneumoniae*: a model system. *Microbiol Sci* **1**: 29-33.
- Duan X, Young R, Straubinger RM, Page B, Cao J, Wang H, Yu H, Canty JM & Qu J.** 2009. A straightforward and highly efficient precipitation/on-pellet digestion procedure coupled with a long gradient nano-LC separation and Orbitrap mass spectrometry for label-free expression profiling of the swine heart mitochondrial proteome. *J Proteome Res* **8**: 2838-2850.
- Dunn MF.** 1998. Tricarboxylic acid cycle and anaplerotic enzymes in rhizobia. *FEMS Microbiol Rev* **22**: 105-123.
- Durand S & Storz G.** 2010. Reprogramming of anaerobic metabolism by the FnrS small RNA. *Mol Microbiol* **75**: 1215-1231.
- Ebeling S, Kundig C & Hennecke H.** 1991. Discovery of a rhizobial RNA that is essential for symbiotic root nodule development. *J Bacteriol* **173**: 6373-6382.
- Ellar D, Lundgren DG, Okamura K & Marchessault RH.** 1968. Morphology of poly-beta-hydroxybutyrate granules. *J Mol Biol* **35**: 489-502.

- Faubladier M, Cam K & Bouche JP.** 1990. *Escherichia coli* cell division inhibitor DicF-RNA of the *dicB* operon. Evidence for its generation in vivo by transcription termination and by RNase III and RNase E-dependent processing. *J Mol Biol* **212**: 461-471.
- Figueroa-Bossi N, Valentini M, Malleret L, Fiorini F & Bossi L.** 2009. Caught at its own game: regulatory small RNA inactivated by an inducible transcript mimicking its target. *Genes Dev* **23**: 2004-2015.
- Fischer HM.** 1994. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol Rev* **58**: 352-386.
- Foucher F & Kondorosi E.** 2000. Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. *Plant Mol Biol* **43**: 773-786.
- Franssen HJ, Vijn I, Yang WC & Bisseling T.** 1992. Developmental aspects of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Mol Biol* **19**: 89-107.
- Gage DJ.** 2002. Analysis of infection thread development using Gfp- and DsRed-expressing *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **184**: 7042-7046.
- Gage DJ.** 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 280-300.
- Galibert F, Finan TM, Long SR, Puhler A, Abola P, Ampe F, Barloy-Hubler F, Barnett MJ, Becker A, Boistard P, Bothe G, Boutry M, Bowser L, Buhrmester J, Cadieu E, Capela D, Chain P, Cowie A, Davis RW, Dreano S, Federspiel NA, Fisher RF, Gloux S, Godrie T, Goffeau A, Golding B, Gouzy J, Gurjal M, Hernandez-Lucas I, Hong A, Huizar L, Hyman RW, Jones T, Kahn D, Kahn ML, Kalman S, Keating DH, Kiss E, Komp C, Lelaure V, Masuy D, Palm C, Peck MC, Pohl TM, Portetelle D, Purnelle B, Ramsperger U, Surzycki R, Thebault P, Vandenbol M, Vorholter FJ, Weidner S, Wells DH, Wong K, Yeh KC & Batut J.** 2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293**: 668-672.
- Gallusci P, Dedieu A, Journet EP, Huguet T & Barker DG.** 1991. Synchronous expression of leghaemoglobin genes in *Medicago truncatula* during nitrogen-fixing root nodule development and response to exogenously supplied nitrate. *Plant Mol Biol* **17**: 335-349.
- Gao M, Barnett MJ, Long SR & Teplitski M.** 2010. Role of the *Sinorhizobium meliloti* global regulator Hfq in gene regulation and symbiosis. *Mol Plant Microbe Interact* **23**: 355-365.
- Geddes BA & Oresnik IJ.** 2014. Physiology, genetics, and biochemistry of carbon metabolism in the alphaproteobacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Can J Microbiol* **60**: 491-507.
- Geissmann TA & Touati D.** 2004. Hfq, a new chaperoning role: binding to messenger RNA determines access for small RNA regulator. *EMBO J* **23**: 396-405.

- Georg J & Hess WR.** 2011. cis-antisense RNA, another level of gene regulation in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**: 286-300.
- Geurts R, Fedorova E & Bisseling T.** 2005. Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium infection*. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 346-352.
- Gibson KE, Kobayashi H & Walker GC.** 2008. Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annu Rev Genet* **42**: 413-441.
- Gonzalez JE, York GM & Walker GC.** 1996. *Rhizobium meliloti* exopolysaccharides: synthesis and symbiotic function. *Gene* **179**: 141-146.
- Gorenflo V, Steinbuchel A, Marose S, Rieseberg M & Scheper T.** 1999. Quantification of bacterial polyhydroxyalkanoic acids by Nile red staining. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**: 765-772.
- Gottesman S & Storz G.** 2011. Bacterial small RNA regulators: versatile roles and rapidly evolving variations. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**.
- Guillier M & Gottesman S.** 2006. Remodelling of the *Escherichia coli* outer membrane by two small regulatory RNAs. *Mol Microbiol* **59**: 231-247.
- Guillier M & Gottesman S.** 2008. The 5' end of two redundant sRNAs is involved in the regulation of multiple targets, including their own regulator. *Nucleic Acids Res* **36**: 6781-6794.
- Gyaneshwar P, Hirsch AM, Moulin L, Chen WM, Elliott GN, Bontemps C, Estrada-de Los Santos P, Gross E, Dos Reis FB, Sprent JI, Young JP & James EK.** 2011. Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. *Mol Plant Microbe Interact* **24**: 1276-1288.
- Halfmann A, Kovacs M, Hakenbeck R & Bruckner R.** 2007. Identification of the genes directly controlled by the response regulator CiaR in *Streptococcus pneumoniae*: five out of 15 promoters drive expression of small non-coding RNAs. *Mol Microbiol* **66**: 110-126.
- Harris CM & Kell DB.** 1985. The estimation of microbial biomass. *Biosensors* **1**: 17-84.
- Haywood GW, Anderson AJ, Chu L & Dawes EA.** 1988. The role of NADH- and NADPH-linked acetoacetyl-CoA reductases in the poly-3-hydroxybutyrate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol Lett* **52**: 259-264.
- Hess WR, Berghoff BA, Wilde A, Steglich C & Klug G.** 2014. Riboregulators and the role of Hfq in photosynthetic bacteria. *RNA Biol* **11**.
- Hindley J.** 1967. Fractionation of ³²P-labelled ribonucleic acids on polyacrylamide gels and their characterization by fingerprinting. *J Mol Biol* **30**: 125-136.
- Hirsch AM, Bang M & Ausubel FM.** 1983. Ultrastructural analysis of ineffective alfalfa nodules formed by nif::Tn5 mutants of *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **155**: 367-380.

- Hoagland DR & Arnon DI.** 1938. *The water-culture method for growing plants without soil.* University of California.
- Hobbs EC, Astarita JL & Storz G.** 2010. Small RNAs and small proteins involved in resistance to cell envelope stress and acid shock in *Escherichia coli*: analysis of a bar-coded mutant collection. *J Bacteriol* **192**: 59-67.
- Horvath B, Kondorosi E, John M, Schmidt J, Torok I, Gyorgypal Z, Barabas I, Wieneke U, Schell J & Kondorosi A.** 1986. Organization, structure and symbiotic function of *Rhizobium meliloti* nodulation genes determining host specificity for alfalfa. *Cell* **46**: 335-343.
- Huss-Danell K.** 1978. Nitrogenase activity measurements in intact plants of *Alnus incana*. *Physiologia Plantarum* **43**: 372-376.
- Ikemura T & Dahlberg JE.** 1973. Small ribonucleic acids of *Escherichia coli*. I. Characterization by polyacrylamide gel electrophoresis and fingerprint analysis. *J Biol Chem* **248**: 5024-5032.
- Jacob AI, Adham SA, Capstick DS, Clark SR, Spence T & Charles TC.** 2008. Mutational analysis of the *Sinorhizobium meliloti* short-chain dehydrogenase/reductase family reveals substantial contribution to symbiosis and catabolic diversity. *Mol Plant Microbe Interact* **21**: 979-987.
- Jensen H.** 1942. Nitrogen fixation in leguminous plants. I. General characters of root-nodule bacteria isolated from species of *Medicago* and *Trifolium* in Australia. ed.^eds.), p.^pp.
- Jimenez-Zurdo JI, Valverde C & Becker A.** 2013. Insights into the noncoding RNome of nitrogen-fixing endosymbiotic alpha-proteobacteria. *Mol Plant Microbe Interact* **26**: 160-167.
- Johansen J, Rasmussen AA, Overgaard M & Valentin-Hansen P.** 2006. Conserved small non-coding RNAs that belong to the σE regulon: Role in down-regulation of outer membrane proteins. *J Mol Biol* **364**: 1-8.
- Johansen J, Eriksen M, Kallipolitis B & Valentin-Hansen P.** 2008. Down-regulation of outer membrane proteins by noncoding RNAs: unraveling the cAMP-CRP- and sigmaE-dependent CyaR-ompX regulatory case. *J Mol Biol* **383**: 1-9.
- Jones KM, Kobayashi H, Davies BW, Taga ME & Walker GC.** 2007. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat Rev Microbiol* **5**: 619-633.
- Jousselin A, Metzinger L & Felden B.** 2009. On the facultative requirement of the bacterial RNA chaperone, Hfq. *Trends Microbiol* **17**: 399-405.
- Kacmar J, Carlson R, Balogh SJ & Srienc F.** 2006. Staining and quantification of poly-3-hydroxybutyrate in *Saccharomyces cerevisiae* and *Cupriavidus necator* cell populations using automated flow cytometry. *Cytometry Part A* **69A**: 27-35.

- Kalamorz F, Reichenbach B, Marz W, Rak B & Gorke B.** 2007. Feedback control of glucosamine-6-phosphate synthase GlmS expression depends on the small RNA GlmZ and involves the novel protein YhbJ in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **65**: 1518-1533.
- Kessler B & Witholt B.** 2001. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. *J Biotechnol* **86**: 97-104.
- Khan SR, Gaines J, Roop RM, 2nd & Farrand SK.** 2008. Broad-host-range expression vectors with tightly regulated promoters and their use to examine the influence of TraR and TraM expression on Ti plasmid quorum sensing. *Appl Environ Microbiol* **74**: 5053-5062.
- Koch AL.** 1961. Some calculations on the turbidity of mitochondria and bacteria. *Biochim Biophys Acta* **51**: 429-441.
- Koonin EV.** 2005. Orthologs, paralogs, and evolutionary genomics. *Annu Rev Genet* **39**: 309-338.
- Krol E & Becker A.** 2011. ppGpp in *Sinorhizobium meliloti*: biosynthesis in response to sudden nutritional downshifts and modulation of the transcriptome. *Mol Microbiol* **81**: 1233-1254.
- Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Landt SG, Abeliuk E, McGrath PT, Lesley JA, McAdams HH & Shapiro L.** 2008. Small non-coding RNAs in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* **68**: 600-614.
- Lease RA & Belfort M.** 2000. Riboregulation by DsrA RNA: trans-actions for global economy. *Mol Microbiol* **38**: 667-672.
- Lee IY, Kim MK, Chang HN & Park YH.** 1995. Regulation of poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis by nicotinamide nucleotide in *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol Lett* **131**: 35-39.
- Lenz DH, Mok KC, Lilley BN, Kulkarni RV, Wingreen NS & Bassler BL.** 2004. The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*. *Cell* **118**: 69-82.
- Lerouge P, Roche P, Faucher C, Maillet F, Truchet G, Prome JC & Denarie J.** 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* **344**: 781-784.
- Liu Y, Wu N, Dong J, Gao Y, Zhang X, Mu C, Shao N & Yang G.** 2010. Hfq is a global regulator that controls the pathogenicity of *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* **5**.
- Lodeiro AR, Di Lorenzo O, Petrucci S, Molina-Ortiz S & Sorgentini D.** 1994. An experiment on glycogen biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochemical Education* **22**: 213-215.

- Lodwig EM, Hosie AH, Bourdes A, Findlay K, Allaway D, Karunakaran R, Downie JA & Poole PS.** 2003. Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Nature* **422**: 722-726.
- MacCoss MJ, Wu CC, Liu H, Sadygov R & Yates JR, 3rd.** 2003. A correlation algorithm for the automated quantitative analysis of shotgun proteomics data. *Anal Chem* **75**: 6912-6921.
- Madhugiri R, Pessi G, Voss B, Hahn J, Sharma CM, Reinhardt R, Vogel J, Hess WR, Fischer HM & Evgenieva-Hackenberg E.** 2012. Small RNAs of the *Bradyrhizobium/Rhodopseudomonas* lineage and their analysis. *RNA Biol* **9**: 47-58.
- Majdalani N, Hernandez D & Gottesman S.** 2002. Regulation and mode of action of the second small RNA activator of RpoS translation, RprA. *Mol Microbiol* **46**: 813-826.
- Majdalani N, Cunning C, Sledjeski D, Elliott T & Gottesman S.** 1998. DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 12462-12467.
- Majdalani N, Chen S, Murrow J, St John K & Gottesman S.** 2001. Regulation of RpoS by a novel small RNA: the characterization of RprA. *Mol Microbiol* **39**: 1382-1394.
- Maki Y, Yoshida H & Wada A.** 2000. Two proteins, YfiA and YhbH, associated with resting ribosomes in stationary phase *Escherichia coli*. *Genes Cells* **5**: 965-974.
- Mandin P & Gottesman S.** 2010. Integrating anaerobic/aerobic sensing and the general stress response through the ArcZ small RNA. *EMBO J* **29**: 3094-3107.
- Mandin P, Repoila F, Vergassola M, Geissmann T & Cossart P.** 2007. Identification of new noncoding RNAs in *Listeria monocytogenes* and prediction of mRNA targets. *Nucleic Acids Res* **35**: 962-974.
- Martinez-Abarca F, Martinez-Rodriguez L, Lopez-Contreras JA, Jimenez-Zurdo JI & Toro N.** 2013. Complete genome sequence of the alfalfa symbiont *Sinorhizobium / Ensifer meliloti* strain GR4. *Genome Announc* **1**.
- Martinez-De Drets G & Arias A.** 1972. Enzymatic basis for differentiation of *Rhizobium* into fast- and slow-growing groups. *J Bacteriol* **109**: 467-470.
- Martinez-Romero E.** 2009. Coevolution in *Rhizobium*-legume symbiosis? *DNA Cell Biol* **28**: 361-370.
- Martinez De Drets G & Arias A.** 1970. Metabolism of some polyols by *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **103**: 97-103.
- Marzi S & Romby P.** 2012. RNA mimicry, a decoy for regulatory proteins. *Mol Microbiol* **83**: 1-6.
- Masse E & Gottesman S.** 2002. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 4620-4625.

- Masse E, Vanderpool CK & Gottesman S.** 2005. Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**: 6962-6971.
- Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X & Batut J.** 2009. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol* **17**: 458-466.
- McWilliam H, Li W, Uludag M, Squizzato S, Park YM, Buso N, Cowley AP & Lopez R.** 2013. Analysis tool web services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res* **41**: W597-600.
- McHugh IO & Tucker AL.** 2007. Flow cytometry for the rapid detection of bacteria in cell culture production medium. *Cytometry A* **71**: 1019-1026.
- Meade HM & Signer ER.** 1977. Genetic mapping of *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 2076-2078.
- Mizuno T, Chou MY & Inouye M.** 1984. A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 1966-1970.
- Moller T, Franch T, Udesen C, Gerdes K & Valentin-Hansen P.** 2002. Spot 42 RNA mediates discoordinate expression of the *E. coli* galactose operon. *Genes Dev* **16**: 1696-1706.
- Moon K & Gottesman S.** 2009. A PhoQ/P-regulated small RNA regulates sensitivity of *Escherichia coli* to antimicrobial peptides. *Mol Microbiol* **74**: 1314-1330.
- Moon K & Gottesman S.** 2011. Competition among Hfq-binding small RNAs in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **82**: 1545-1562.
- Morita T, Mochizuki Y & Aiba H.** 2006. Translational repression is sufficient for gene silencing by bacterial small noncoding RNAs in the absence of mRNA destruction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 4858-4863.
- Mortier V, Holsters M & Goormachtig S.** 2012. Never too many? How legumes control nodule numbers. *Plant Cell Environ* **35**: 245-258.
- Mulley G, White JP, Karunakaran R, Prell J, Bourdes A, Bunnell S, Hill L & Poole PS.** 2011. Mutation of GOGAT prevents pea bacteroid formation and N₂ fixation by globally downregulating transport of organic nitrogen sources. *Mol Microbiol* **80**: 149-167.
- Muriel-Millan LF, Castellanos M, Hernandez-Eligio JA, Moreno S & Espin G.** 2014. Posttranscriptional regulation of PhbR, the transcriptional activator of polyhydroxybutyrate synthesis, by iron and the sRNA ArrF in *Azotobacter vinelandii*. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**: 2173-2182.
- Nagayoshi M, Fukuizumi T, Kitamura C, Yano J, Terashita M & Nishihara T.** 2004. Efficacy of ozone on survival and permeability of oral microorganisms. *Oral Microbiology and Immunology* **19**: 240-246.

- Naville M, Ghullot-Gaudeffroy A, Marchais A & Gautheret D.** 2011. ARNold: a web tool for the prediction of Rho-independent transcription terminators. *RNA Biol* **8**: 11-13.
- Nawrocki EP & Eddy SR.** 2013. Infernal 1.1: 100-fold faster RNA homology searches. *Bioinformatics* **29**: 2933-2935.
- Nebe-von-Caron G, Stephens PJ, Hewitt CJ, Powell JR & Badley RA.** 2000. Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *J Microbiol Methods* **42**: 97-114.
- Oberto J.** 2013. SyntTax: a web server linking synteny to prokaryotic taxonomy. *BMC Bioinformatics* **14**: 4.
- Oka-Kira E & Kawaguchi M.** 2006. Long-distance signaling to control root nodule number. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 496-502.
- Olah B, Kiss E, Gyorgypal Z, Borzi J, Cinege G, Csanadi G, Batut J, Kondorosi A & Dusha I.** 2001. Mutation in the *ntnR* gene, a member of the *vap* gene family, increases the symbiotic efficiency of *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 887-894.
- Oldroyd GE & Downie JA.** 2004. Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 566-576.
- Oldroyd GE & Downie JA.** 2006. Nuclear calcium changes at the core of symbiosis signalling. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 351-357.
- Oldroyd GE, Murray JD, Poole PS & Downie JA.** 2011. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu Rev Genet* **45**: 119-144.
- Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A & Mann M.** 2002. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* **1**: 376-386.
- Opdyke JA, Kang JG & Storz G.** 2004. GadY, a small-RNA regulator of acid response genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**: 6698-6705.
- Overgaard M, Johansen J, Moller-Jensen J & Valentin-Hansen P.** 2009. Switching off small RNA regulation with trap-mRNA. *Mol Microbiol* **73**: 790-800.
- Overloper A, Kraus A, Gurski R, Wright PR, Georg J, Hess WR & Narberhaus F.** 2014. Two separate modules of the conserved regulatory RNA AbcR1 address multiple target mRNAs in and outside of the translation initiation region. *RNA Biol* **11**: 624-640.
- Overmars L, Kerkhoven R, Siezen RJ & Francke C.** 2013. MGcV: the microbial genomic context viewer for comparative genome analysis. *BMC Genomics* **14**: 209.
- Pandey SP, Minesinger BK, Kumar J & Walker GC.** 2011. A highly conserved protein of unknown function in *Sinorhizobium meliloti* affects sRNA regulation similar to Hfq. *Nucleic Acids Res* **39**: 4691-4708.

- Papenfort K, Bouvier M, Mika F, Sharma CM & Vogel J.** 2010. Evidence for an autonomous 5' target recognition domain in an Hfq-associated small RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 20435-20440.
- Papenfort K, Pfeiffer V, Mika F, Lucchini S, Hinton JC & Vogel J.** 2006. SigmaE-dependent small RNAs of *Salmonella* respond to membrane stress by accelerating global omp mRNA decay. *Mol Microbiol* **62**: 1674-1688.
- Papenfort K, Pfeiffer V, Lucchini S, Sonawane A, Hinton JC & Vogel J.** 2008. Systematic deletion of *Salmonella* small RNA genes identifies CyaR, a conserved CRP-dependent riboregulator of OmpX synthesis. *Mol Microbiol* **68**: 890-906.
- Papenfort K, Said N, Welsink T, Lucchini S, Hinton JC & Vogel J.** 2009. Specific and pleiotropic patterns of mRNA regulation by ArcZ, a conserved, Hfq-dependent small RNA. *Mol Microbiol* **74**: 139-158.
- Parker Siburt CJ, Mietzner TA & Crumbliss AL.** 2012. FbpA--a bacterial transferrin with more to offer. *Biochim Biophys Acta* **1820**: 379-392.
- Pedrosa FO, Benelli EM, Yates MG, Wassem R, Monteiro RA, Klassen G, Steffens MB, Souza EM, Chubatsu LS & Rigo LU.** 2001. Recent developments in the structural organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Herbaspirillum seropedicae*. *J Biotechnol* **91**: 189-195.
- Pellock BJ, Teplitski M, Boinay RP, Bauer WD & Walker GC.** 2002. A LuxR homolog controls production of symbiotically active extracellular polysaccharide II by *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **184**: 5067-5076.
- Perret X, Staehelin C & Broughton WJ.** 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 180-201.
- Pfaffl MW.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45.
- Potter M, Muller H & Steinbuchel A.** 2005. Influence of homologous phasins (PhaP) on PHA accumulation and regulation of their expression by the transcriptional repressor PhaR in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology* **151**: 825-833.
- Potter M, Madkour MH, Mayer F & Steinbuchel A.** 2002. Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology* **148**: 2413-2426.
- Povolo S & Casella S.** 2000. A critical role for *aniA* in energy-carbon flux and symbiotic nitrogen fixation in *Sinorhizobium meliloti*. *Arch Microbiol* **174**: 42-49.
- Prell J & Poole P.** 2006. Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends Microbiol* **14**: 161-168.

- Prell J, White JP, Bourdes A, Bunnewell S, Bongaerts RJ & Poole PS.** 2009. Legumes regulate *Rhizobium* bacteroid development and persistence by the supply of branched-chain amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 12477-12482.
- Prell J, Bourdes A, Kumar S, Ludwig E, Hosie A, Kinghorn S, White J & Poole P.** 2010. Role of symbiotic auxotrophy in the *Rhizobium*-legume symbioses. *PLoS One* **5**: e13933.
- Prevost K, Salvail H, Desnoyers G, Jacques JF, Phaneuf E & Masse E.** 2007. The small RNA RyhB activates the translation of shiA mRNA encoding a permease of shikimate, a compound involved in siderophore synthesis. *Mol Microbiol* **64**: 1260-1273.
- Prierer UB, Simon R & Puhler A.** 1985. Extension of the host range of *Escherichia coli* vectors by incorporation of RSF1010 replication and mobilization functions. *J Bacteriol* **163**: 324-330.
- Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig W, Peplies J & Glockner FO.** 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res* **35**: 7188-7196.
- Pulvermacher SC, Stauffer LT & Stauffer GV.** 2009. The small RNA GcvB regulates sstT mRNA expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **191**: 238-248.
- Pulvermacher SC, Stauffer LT & Stauffer GV.** 2009. Role of the sRNA GcvB in regulation of *cycA* in *Escherichia coli*. *Microbiology* **155**: 106-114.
- Pyla R, Kim TJ, Silva JL & Jung YS.** 2009. Overproduction of poly-beta-hydroxybutyrate in the *Azotobacter vinelandii* mutant that does not express small RNA ArrF. *Appl Microbiol Biotechnol* **84**: 717-724.
- Pyla R, Kim TJ, Silva JL & Jung YS.** 2010. Proteome analysis of *Azotobacter vinelandii* *arrF* mutant that overproduces poly-beta-hydroxybutyrate polymer. *Appl Microbiol Biotechnol* **88**: 1343-1354.
- Qu J, Lesse AJ, Brauer AL, Cao J, Gill SR & Murphy TF.** 2010. Proteomic expression profiling of *Haemophilus influenzae* grown in pooled human sputum from adults with chronic obstructive pulmonary disease reveal antioxidant and stress responses. *BMC Microbiol* **10**: 162.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J & Glockner FO.** 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* **41**: D590-596.
- Rasmussen AA, Eriksen M, Gilany K, Udesen C, Franch T, Petersen C & Valentin-Hansen P.** 2005. Regulation of *ompA* mRNA stability: the role of a small regulatory RNA in growth phase-dependent control. *Mol Microbiol* **58**: 1421-1429.
- Ratcliff WC & Denison RF.** 2010. Individual-level bet hedging in the bacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Curr Biol* **20**: 1740-1744.

- Ratcliff WC, Kadam SV & Denison RF.** 2008. Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) supports survival and reproduction in starving rhizobia. *FEMS Microbiol Ecol* **65**: 391-399.
- Reese MG.** 2001. Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Comput Chem* **26**: 51-56.
- Reese MG.** 2001. Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Comput Chem* **26**: 51-56.
- Reichenbach B, Gopel Y & Gorke B.** 2009. Dual control by perfectly overlapping sigma 54- and sigma 70- promoters adjusts small RNA GlnY expression to different environmental signals. *Mol Microbiol* **74**: 1054-1070.
- Reinkensmeier J, Schluter JP, Giegerich R & Becker A.** 2011. Conservation and occurrence of trans-encoded sRNAs in the rhizobiales. *Genes (Basel)* **2**: 925-956.
- Reyna D & Wall L.** 2014. Revision of two colorimetric methods to quantify glomalin-related compounds in soils subjected to different managements. *Biology and Fertility of Soils* **50**: 395-400.
- Rice PW & Dahlberg JE.** 1982. A gene between *polA* and *glnA* retards growth of *Escherichia coli* when present in multiple copies: physiological effects of the gene for spot 42 RNA. *J Bacteriol* **152**: 1196-1210.
- Rivas E, Klein RJ, Jones TA & Eddy SR.** 2001. Computational identification of noncoding RNAs in *E. coli* by comparative genomics. *Curr Biol* **11**: 1369-1373.
- Robertson GT & Roop RM, Jr.** 1999. The *Brucella abortus* host factor I (HF-I) protein contributes to stress resistance during stationary phase and is a major determinant of virulence in mice. *Mol Microbiol* **34**: 690-700.
- Robertson JG & Lyttleton P.** 1984. Division of peribacteroid membranes in root nodules of white clover. *J Cell Sci* **69**: 147-157.
- Roumiantseva ML, Andronov EE, Sharypova LA, Dammann-Kalinowski T, Keller M, Young JP & Simarov BV.** 2002. Diversity of *Sinorhizobium meliloti* from the Central Asian alfalfa gene center. *Appl Environ Microbiol* **68**: 4694-4697.
- Roux B, Rodde N, Jardinaud MF, Timmers T, Sauviac L, Cottret L, Carrere S, Sallet E, Courcelle E, Moreau S, Debelle F, Capela D, de Carvalho-Niebel F, Gouzy J, Bruand C & Gamas P.** 2014. An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing. *Plant J* **77**: 817-837.
- Ruberg S, Tian ZX, Krol E, Linke B, Meyer F, Wang Y, Puhler A, Weidner S & Becker A.** 2003. Construction and validation of a *Sinorhizobium meliloti* whole genome DNA microarray: genome-wide profiling of osmoadaptive gene expression. *J Biotechnol* **106**: 255-268.

- Sahagan BG & Dahlberg JE.** 1979. A small, unstable RNA molecule of *Escherichia coli*: spot 42 RNA. I. Nucleotide sequence analysis. *J Mol Biol* **131**: 573-592.
- Sallet E, Roux B, Sauviac L, Jardinaud MF, Carrere S, Faraut T, de Carvalho-Niebel F, Gouzy J, Gamas P, Capela D, Bruand C & Schiex T.** 2013. Next-generation annotation of prokaryotic genomes with EuGene-P: application to *Sinorhizobium meliloti* 2011. *DNA Res* **20**: 339-354.
- Sallstrom B & Andersson SG.** 2005. Genome reduction in the alpha-Proteobacteria. *Curr Opin Microbiol* **8**: 579-585.
- Sambrook J.** 1989. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sawada H, Kuykendall LD & Young JM.** 2003. Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J Gen Appl Microbiol* **49**: 155-179.
- Schafer A, Tauch A, Jager W, Kalinowski J, Thierbach G & Puhler A.** 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.
- Schluter JP, Reinkensmeier J, Barnett MJ, Lang C, Krol E, Giegerich R, Long SR & Becker A.** 2013. Global mapping of transcription start sites and promoter motifs in the symbiotic alpha-proteobacterium *Sinorhizobium meliloti* 1021. *BMC Genomics* **14**: 156.
- Schluter JP, Reinkensmeier J, Daschkey S, Evguenieva-Hackenberg E, Janssen S, Janicke S, Becker JD, Giegerich R & Becker A.** 2010. A genome-wide survey of sRNAs in the symbiotic nitrogen-fixing alpha-proteobacterium *Sinorhizobium meliloti*. *BMC Genomics* **11**: 245.
- Schneiker-Bekel S, Wibberg D, Bekel T, Blom J, Linke B, Neuweger H, Stiens M, Vorholter FJ, Weidner S, Goesmann A, Puhler A & Schluter A.** 2011. The complete genome sequence of the dominant *Sinorhizobium meliloti* field isolate SM11 extends the *S. meliloti* pan-genome. *J Biotechnol* **155**: 20-33.
- Shakeri S, Roghanian R & Emtiazi G.** 2011. Comparison of intracellular polyhydroxybutyrate granules formation between different bacterial cell subpopulations by flow cytometry. *Jundishapur J Microbiol* **4**: 0-0.
- Sharma CM, Darfeuille F, Plantinga TH & Vogel J.** 2007. A small RNA regulates multiple ABC transporter mRNAs by targeting C/A-rich elements inside and upstream of ribosome-binding sites. *Genes Dev* **21**: 2804-2817.
- Sharma CM, Papenfort K, Pernitzsch SR, Mollenkopf HJ, Hinton JC & Vogel J.** 2011. Pervasive post-transcriptional control of genes involved in amino acid metabolism by the Hfq-dependent GcvB small RNA. *Mol Microbiol* **81**: 1144-1165.

- Sieberer BJ, Timmers AC & Emons AM.** 2005. Nod factors alter the microtubule cytoskeleton in *Medicago truncatula* root hairs to allow root hair reorientation. *Mol Plant Microbe Interact* **18**: 1195-1204.
- Simon R, Priefer U & Pühler A.** 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Nature Biotechnology* **1**: 784-791.
- Sledjeski D & Gottesman S.** 1995. A small RNA acts as an antisilencer of the H-NS-silenced *rcaA* gene of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 2003-2007.
- Sledjeski DD, Gupta A & Gottesman S.** 1996. The small RNA, DsrA, is essential for the low temperature expression of RpoS during exponential growth in *Escherichia coli*. *EMBO J* **15**: 3993-4000.
- Smith C, Heyne S, Richter AS, Will S & Backofen R.** 2010. Freiburg RNA Tools: a web server integrating INTARNA, EXPARNA and LOCARNA. *Nucleic Acids Res* **38**: W373-377.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ & Klenk DC.** 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**: 76-85.
- Smith RV & Evans MC.** 1971. Nitrogenase activity in cell-free extracts of the blue-green alga, *Anabaena cylindrica*. *J Bacteriol* **105**: 913-917.
- Sobrero P & Valverde C.** 2011. Evidences of autoregulation of hfq expression in *Sinorhizobium meliloti* strain 2011. *Arch Microbiol* **193**: 629-639.
- Sobrero P & Valverde C.** 2012. The bacterial protein Hfq: much more than a mere RNA-binding factor. *Crit Rev Microbiol* **38**: 276-299.
- Sobrero P, Schluter JP, Lanner U, Schlosser A, Becker A & Valverde C.** 2012. Quantitative proteomic analysis of the Hfq-regulon in *Sinorhizobium meliloti* 2011. *PLoS One* **7**: e48494.
- Spiegelman WG, Reichardt LF, Yaniv M, Heinemann SF, Kaiser AD & Eisen H.** 1972. Bidirectional transcription and the regulation of phage lambda repressor synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**: 3156-3160.
- Steenhoudt O & Vanderleyden J.** 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 487-506.
- Storz G, Vogel J & Wassarman KM.** 2011. Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. *Mol Cell* **43**: 880-891.
- Stougaard P, Molin S & Nordstrom K.** 1981. RNAs involved in copy-number control and incompatibility of plasmid R1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 6008-6012.

- Stowers MD.** 1985. Carbon metabolism in *Rhizobium* species. *Annu Rev Microbiol* **39**: 89-108.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A & Kumar S.** 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**: 2725-2729.
- Terpolilli JJ, Hood GA & Poole PS.** 2012. What determines the efficiency of N₂-fixing *Rhizobium*-legume symbioses? *Adv Microb Physiol* **60**: 325-389.
- Tetart F & Bouche JP.** 1992. Regulation of the expression of the cell-cycle gene *ftsZ* by DicF antisense RNA. Division does not require a fixed number of FtsZ molecules. *Mol Microbiol* **6**: 615-620.
- Thompson KM, Rhodius VA & Gottesman S.** 2007. SigmaE regulates and is regulated by a small RNA in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **189**: 4243-4256.
- Tomizawa J, Itoh T, Selzer G & Som T.** 1981. Inhibition of ColE1 RNA primer formation by a plasmid-specified small RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 1421-1425.
- Torres-Quesada O, Millan V, Nisa-Martinez R, Bardou F, Crespi M, Toro N & Jimenez-Zurdo JI.** 2013. Independent activity of the homologous small regulatory RNAs AbcR1 and AbcR2 in the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *PLoS One* **8**: e68147.
- Torres-Quesada O, Oruezabal RI, Peregrina A, Jofre E, Lloret J, Rivilla R, Toro N & Jimenez-Zurdo JI.** 2010. The *Sinorhizobium meliloti* RNA chaperone Hfq influences central carbon metabolism and the symbiotic interaction with alfalfa. *BMC Microbiol* **10**: 71.
- Torres-Quesada O, Reinkensmeier J, Schluter JP, Robledo M, Peregrina A, Giegerich R, Toro N, Becker A & Jimenez-Zurdo JI.** 2014. Genome-wide profiling of Hfq-binding RNAs uncovers extensive post-transcriptional rewiring of major stress response and symbiotic regulons in *Sinorhizobium meliloti*. *RNA Biol* **11**: 563-579.
- Torres-Quesada O, Reinkensmeier J, Schluter JP, Robledo M, Peregrina A, Giegerich R, Toro N, Becker A & Jimenez-Zurdo JI.** 2014. Genome-wide profiling of Hfq-binding RNAs uncovers extensive post-transcriptional rewiring of major stress response and symbiotic regulons in *Sinorhizobium meliloti*. *RNA Biol* **11**.
- Trainer MA & Charles TC.** 2006. The role of PHB metabolism in the symbiosis of rhizobia with legumes. *Appl Microbiol Biotechnol* **71**: 377-386.
- Trainer MA, Capstick D, Zachertowska A, Lam KN, Clark SR & Charles TC.** 2010. Identification and characterization of the intracellular poly-3-hydroxybutyrate depolymerase enzyme PhaZ of *Sinorhizobium meliloti*. *BMC Microbiol* **10**: 92.
- Tramonti A, De Canio M & De Biase D.** 2008. GadX/GadW-dependent regulation of the *Escherichia coli* acid fitness island: transcriptional control at the *gadY-gadW* divergent promoters and identification of four novel 42 bp GadX/GadW-specific binding sites. *Mol Microbiol* **70**: 965-982.

- Ucker DS & Signer ER.** 1978. Catabolite-repression-like phenomenon in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **136**: 1197-1200.
- Udekwi KI, Darfeuille F, Vogel J, Reimegard J, Holmqvist E & Wagner EG.** 2005. Hfq-dependent regulation of OmpA synthesis is mediated by an antisense RNA. *Genes Dev* **19**: 2355-2366.
- Udvardi M & Poole PS.** 2013. Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annu Rev Plant Biol* **64**: 781-805.
- Ueta M, Yoshida H, Wada C, Baba T, Mori H & Wada A.** 2005. Ribosome binding proteins YhbH and YfiA have opposite functions during 100S formation in the stationary phase of *Escherichia coli*. *Genes Cells* **10**: 1103-1112.
- Ulve VM, Sevin EW, Cheron A & Barloy-Hubler F.** 2007. Identification of chromosomal alpha-proteobacterial small RNAs by comparative genome analysis and detection in *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. *BMC Genomics* **8**: 467.
- Urban JH & Vogel J.** 2008. Two seemingly homologous noncoding RNAs act hierarchically to activate *glmS* mRNA translation. *PLoS Biol* **6**: e64.
- Urbanowski ML, Stauffer LT & Stauffer GV.** 2000. The *gcvB* gene encodes a small untranslated RNA involved in expression of the dipeptide and oligopeptide transport systems in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **37**: 856-868.
- Valentin-Hansen P, Eriksen M & Udesen C.** 2004. The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions. *Mol Microbiol* **51**: 1525-1533.
- Valverde C, Livny J, Schluter JP, Reinkensmeier J, Becker A & Parisi G.** 2008. Prediction of *Sinorhizobium meliloti* sRNA genes and experimental detection in strain 2011. *BMC Genomics* **9**: 416.
- Vanderpool CK & Gottesman S.** 2004. Involvement of a novel transcriptional activator and small RNA in post-transcriptional regulation of the glucose phosphoenolpyruvate phosphotransferase system. *Mol Microbiol* **54**: 1076-1089.
- Vercruyse M, Fauvart M, Cloots L, Engelen K, Thijs IM, Marchal K & Michiels J.** 2010. Genome-wide detection of predicted non-coding RNAs in *Rhizobium etli* expressed during free-living and host-associated growth using a high-resolution tiling array. *BMC Genomics* **11**: 53.
- Vinardell JM, Fedorova E, Cebolla A, Kevei Z, Horvath G, Kelemen Z, Tarayre S, Roudier F, Mergaert P, Kondorosi A & Kondorosi E.** 2003. Endoreduplication mediated by the anaphase-promoting complex activator CCS52A is required for symbiotic cell differentiation in *Medicago truncatula* nodules. *Plant Cell* **15**: 2093-2105.
- Vincent JM.** 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. *Oxford: Blackwell Scientific Publications*.

- Vincent JM.** 1970. *A manual for the practical study of root-nodule bacteria*. Blackwell Scientific.
- Vogel J & Luisi BF.** 2011. Hfq and its constellation of RNA. *Nat Rev Microbiol* **9**: 578-589.
- Wadler CS & Vanderpool CK.** 2007. A dual function for a bacterial small RNA: SgrS performs base pairing-dependent regulation and encodes a functional polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 20454-20459.
- Wall LG.** 2000. The actinorhizal symbiosis. *J Plant Growth Regul* **19**: 167-182.
- Wang C, Sheng X, Equi RC, Trainer MA, Charles TC & Sobral BW.** 2007. Influence of the poly-3-hydroxybutyrate (PHB) granule-associated proteins (PhaP1 and PhaP2) on PHB accumulation and symbiotic nitrogen fixation in *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. *J Bacteriol* **189**: 9050-9056.
- Wassarman KM & Storz G.** 2000. 6S RNA regulates *E. coli* RNA polymerase activity. *Cell* **101**: 613-623.
- Wassarman KM, Repoila F, Rosenow C, Storz G & Gottesman S.** 2001. Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays. *Genes Dev* **15**: 1637-1651.
- Waters LS & Storz G.** 2009. Regulatory RNAs in bacteria. *Cell* **136**: 615-628.
- Wilderman PJ, Sowa NA, FitzGerald DJ, FitzGerald PC, Gottesman S, Ochsner UA & Vasil ML.** 2004. Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 9792-9797.
- Wilms I, Overloper A, Nowrousian M, Sharma CM & Narberhaus F.** 2012. Deep sequencing uncovers numerous small RNAs on all four replicons of the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*. *RNA Biol* **9**: 446-457.
- Wilms I, Moller P, Stock AM, Gurski R, Lai EM & Narberhaus F.** 2012. Hfq influences multiple transport systems and virulence in the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **194**: 5209-5217.
- Williams KP, Sobral BW & Dickerman AW.** 2007. A robust species tree for the alphaproteobacteria. *J Bacteriol* **189**: 4578-4586.
- Yilmaz P, Parfrey LW, Yarza P, Gerken J, Pruesse E, Quast C, Schweer T, Peplies J, Ludwig W & Glockner FO.** 2014. The SILVA and "All-species Living Tree Project (LTP)" taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Res* **42**: D643-648.
- York GM, Stubbe J & Sinskey AJ.** 2002. The *Ralstonia eutropha* PhaR protein couples synthesis of the PhaP phasin to the presence of polyhydroxybutyrate in cells and promotes polyhydroxybutyrate production. *J Bacteriol* **184**: 59-66.

- Young ND & DeBelle F & Oldroyd GE & Geurts R & Cannon SB & Udvardi MK & Benedito VA & Mayer KF & Gouzy J & Schoof H & Van de Peer Y & Proost S & Cook DR & Meyers BC & Spannagl M & Cheung F & De Mita S & Krishnakumar V & Gundlach H & Zhou S & Mudge J & Bharti AK & Murray JD & Naoumkina MA & Rosen B & Silverstein KA & Tang H & Rombauts S & Zhao PX & Zhou P & Barbe V & Bardou P & Bechner M & Bellec A & Berger A & Berges H & Bidwell S & Bisseling T & Choisne N & Couloux A & Denny R & Deshpande S & Dai X & Doyle JJ & Dudez AM & Farmer AD & Fouteau S & Franken C & Gibelin C & Gish J & Goldstein S & Gonzalez AJ & Green PJ & Hallab A & Hartog M & Hua A & Humphray SJ & Jeong DH & Jing Y & Jocker A & Kenton SM & Kim DJ & Klee K & Lai H & Lang C & Lin S & Macmil SL & Magdelenat G & Matthews L & McCorrison J & Monaghan EL & Mun JH & Najjar FZ & Nicholson C & Noiroit C & O'Bleness M & Paule CR & Poulain J & Prion F & Qin B & Qu C & Retzel EF & Riddle C & Sallet E & Samain S & Samson N & Sanders I & Saurat O & Scarpelli C & Schiex T & Segurens B & Severin AJ & Sherrier DJ & Shi R & Sims S & Singer SR & Sinharoy S & Sterck L & Viollet A & Wang BB & Wang K & Wang M & Wang X & Warfsmann J & Weissenbach J & White DD & White JD & Wiley GB & Wincker P & Xing Y & Yang L & Yao Z & Ying F & Zhai J & Zhou L & Zuber A & Denarie J & Dixon RA & May GD & Schwartz DC & Rogers J & Quetier F & Town CD & Roe BA. 2011. The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature* **480**: 520-524.**
- Yurgel SN & Kahn ML. 2008.** A mutant GlnD nitrogen sensor protein leads to a nitrogen-fixing but ineffective *Sinorhizobium meliloti* symbiosis with alfalfa. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 18958-18963.
- Zevenhuizen LP. 1981.** Cellular glycogen, beta-1,2,-glucan, poly beta-hydroxybutyric acid and extracellular polysaccharides in fast-growing species of *Rhizobium*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **47**: 481-497.
- Zhang A, Wassarman KM, Ortega J, Steven AC & Storz G. 2002.** The Sm-like Hfq protein increases OxyS RNA interaction with target mRNAs. *Mol Cell* **9**: 11-22.
- Zuker M. 2003.** Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* **31**: 3406-3415.