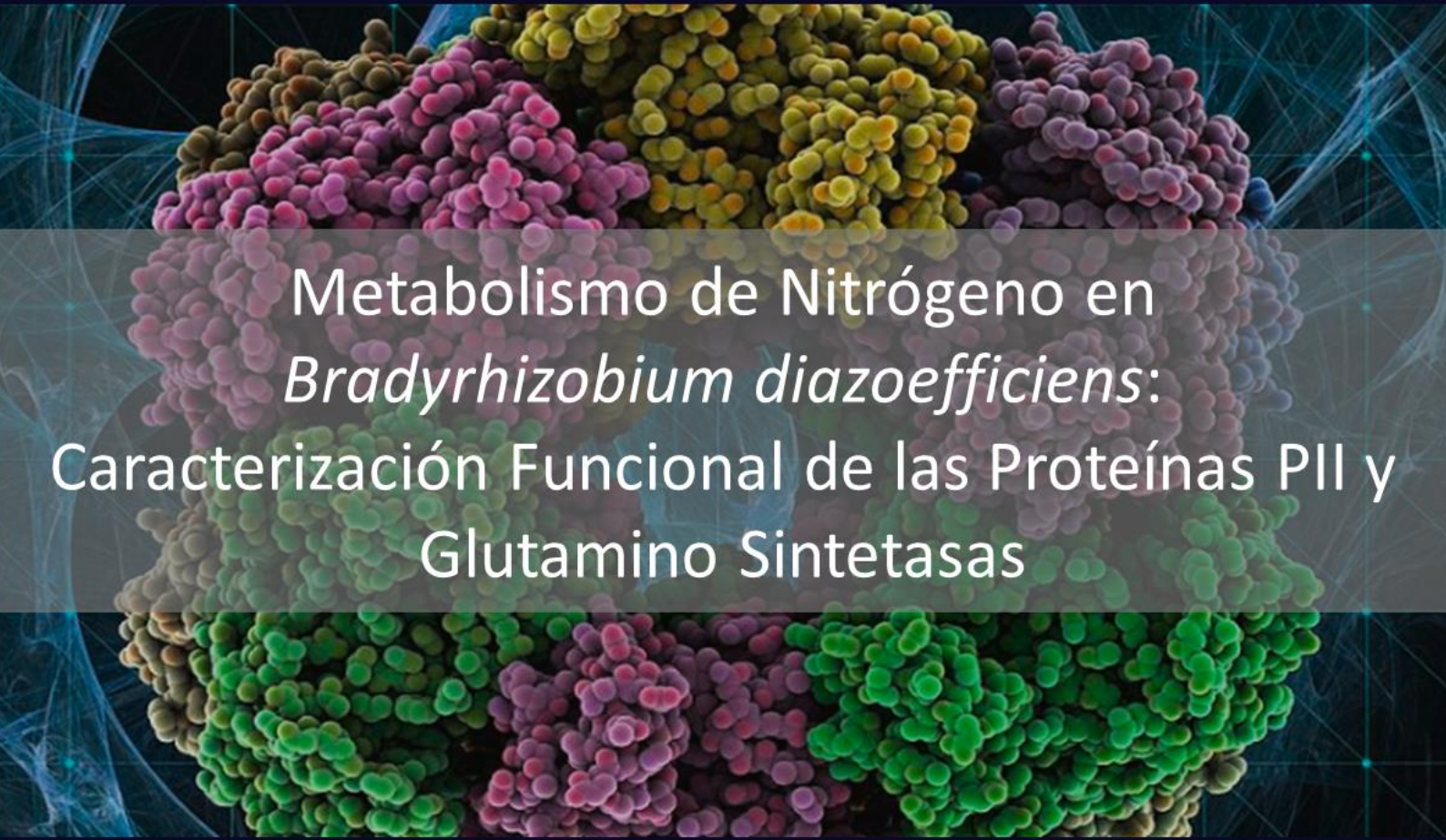




UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



Tesis Doctoral
2019



Metabolismo de Nitrógeno en
Bradyrhizobium diazoefficiens:
Caracterización Funcional de las Proteínas PII y
Glutamino Sintetasas

Lic. Florencia Lamelza

Directora: Dra. Silvina L. López García



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

Metabolismo de Nitrógeno en Bradyrhizobium diazoefficiens: Caracterización Funcional de las Proteínas PII y Glutamino Sintetasas

Tesista: Florencia Lamelza

Directora: Dra. Silvina L. López García

Año: 2019

*El presente Trabajo de Tesis para optar al
grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas
ha sido realizado en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular,
Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas,
Universidad Nacional de La Plata-CCT-La Plata-CONICET,
bajo la dirección de la Dra. Silvina Laura López García
La Plata, Abril de 2019*

Mi reconocimiento

A la Facultad de Ciencias Exactas y a la Universidad Nacional de la Plata, por por todos estos años de formación como alumna y graduada.

Al Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM), por brindarme el espacio físico propicio para desarrollar este trabajo de Tesis Doctoral.

Al Consejo Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICET), por el otorgamiento de la beca que posibilitó mi dedicación exclusiva a la investigación científica.

Abreviaturas

aa	Aminoácido
Abs	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADP	Adenosinadifosfato
Amp	Ampicilina
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
AT/AR	Adeniltransferasa/adenilremovasa
ATP	Adenosinatrifosfato
°C	Grado Celsius
Cm	Cloranfenicol
CPS	Polisacárido capsular
CTAB	Bromuro de hexadecil-trimetilamonio
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPS	Exopolisacárido
FBN	Fijación biológica de nitrógeno
g	Tiempo de duplicación
g	gramos
GDH	Glutamato deshidrogenasa
Gm	Gentamicina sulfato
GOGAT	Glutamato sintasa
GS	Glutamina sintetasa
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
kDa	Kilo daltons
Km	Kanamicina sulfato
l	litros

LB	Medio Luria Bertani
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometer</i> – Desorción/ionización láser asistida por matriz con espectrómetro de masa de tiempo de vuelo
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i> – Sitio múltiple de clonado
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
NSR	<i>Nitrogen Stress Response</i> – Respuesta al estrés por nitrógeno
Ntr	<i>Nitrogen regulated</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i> – Marco de lectura abierto
pb	Pares de bases
PBS	Buffer fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Peso molecular
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PSE	Polisacáridos extracelulares
PSY-ara	Medio Peptona Sales Extracto de Levadura modificado con arabinosa
PVDF	Difluoruro de olivinildieno
qq	Quintales
qRT-PCR	<i>Quantitative Real Time PCR</i> – PCR cuantitativa en tiempo real
Ref.	Referencias
RT-PCR	PCR sobre ADNc
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
Sp	Espectinomicina
Str	Estreptomicina
TBE	Tris-borato-EDTA
Tc	Tetraciclina
TCA	Ácido tricloroacético
TE	Tris-EDTA
Tyr51	Residuo tirosina 51
UFC	Unidad formadora de colonias
Utasa/UR	Uridiltransferasa/uridilremovedora
X-gal	5-bromo-4cloro-3-indoil- β -galactopiranósido

x g	Unidades “g” de centrifugación
YEM	Medio Manitol Extracto de Levadura
µg	microgramos
µl	microlitro
µ	Velocidad específica de crecimiento

Indice General

Capítulo I - Introducción

I.1 El nitrógeno (N): un elemento esencial para la vida	1
I.2 El suelo: un ecosistema fluctuante	2
I.3 Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN)	5
I.4 Los rizobios	6
I.5 Desarrollo de la simbiosis rizobio – leguminosa	8
I.6 La importancia de la simbiosis con las leguminosas	12
I.7 Metabolismo general del N en bacterias	14
<i>I.7.1 Ingreso del amonio al interior celular</i>	15
<i>I.7.2 Vías de asimilación de amonio en bacterias</i>	17
<i>I.7.3 Regulación de la asimilación de amonio</i>	19
I.8 Proteínas de señalización PII: integradoras de los flujos de C y N intracelular	22
<i>I.8.1 Estructura de las proteínas GlnB y GlnK</i>	23
<i>I.8.2 Funciones de las proteínas PII</i>	25
<i>I.8.3 Regulación de las proteínas PII mediante moléculas indicadoras del estado intracelular</i>	30
I.9 Metabolismo del N en los rizobios	33
<i>I.9.1 Mecanismos de regulación de las GS en B. diazoefficiens</i>	36
<i>I.9.2 Respuesta al estrés por N en rizobios en vida libre</i>	39
I.10 Hipótesis de Trabajo y Objetivos	41
<i>I.10.1 Objetivo General</i>	42
<i>I.10.2 Objetivos específicos</i>	43

Capítulo II - Materiales y Métodos

II.1 Cepas bacterianas, plásmidos y cebadores utilizados	44
<i>II.1.1 Cepas bacterianas y plásmidos</i>	44
<i>II.1.2 Cebadores utilizados</i>	46
II.2. Procedimientos microbiológicos	51
<i>II.2.1. Medios de cultivo</i>	51
<i>II.2.2 Condiciones de cultivo</i>	53
<i>II.2.2 a Cultivo de cepas de B. diazoefficiens</i>	53
<i>II.2.2 b Cultivos de E. coli</i>	54
<i>II.2.3 Soluciones para el cultivo hidropónico de plantas</i>	54
<i>II.2.4 Antibióticos utilizados</i>	54
<i>II.2.5 Cinéticas de crecimiento</i>	55
<i>II.2.6 Estimación de la biomasa y recuento en placa</i>	55
<i>II.2.7 Conservación de la cepas bacterianas</i>	55
<i>II.2.8 Preparación de células electrocompetentes</i>	56
<i>II.2.9 Transformación de células electrocompetentes de E. coli</i>	56
<i>II.2.10 Métodos de conjugación: Conjugación biparental</i>	57
II.3 Técnicas de biología molecular	58
<i>II.3.1 Preparación de ADN plasmídico en pequeña escala ("minipreparación")</i>	58
<i>II.3.2 Obtención de ADN molde para amplificaciones específicas sobre ADN genómico</i>	59
<i>II.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	60
<i>II.3.4 Electroforesis de ADN</i>	61
<i>II.3.4.a Separación e identificación de fragmentos de restricción o de amplificación por PCR mediante electroforesis en geles de agarosa</i>	61

<i>II.3.4.b Revelado de los geles y fotografía</i>	61
<i>II.3.4.c Estimación de los pesos moleculares de fragmentos por electroforesis en gel de agarosa</i>	61
<i>II.3.4.d Extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa</i>	62
<i>II.3.5 Extracción de ARN total</i>	63
<i>II.3.6 Transcripción Reversa</i>	64
<i>II.3.7 Reacción en cadena de la polimerasa sobre ADNc</i>	64
<i>II.3.8 Cuantificación relativa de transcritos mediante real time PCR (qRT-PCR)</i>	64
<i>II.3.9 Cuantificación de ADN y ARN</i>	65
<i>II.3.10 Tratamientos enzimáticos del ADN</i>	65
<i>II.3.11 Secuenciación de los fragmentos de ADN</i>	65
<i>II.3.12 Estrategia general para la obtención de cepas mutantes limpias</i>	65
II.4 Técnicas utilizadas para el análisis de proteínas	68
<i>II.4.1 Obtención de proteínas totales para inmunodetección</i>	68
<i>II.4.2 Análisis de proteínas mediante geles de poliacrilamida discontinuos en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)</i>	68
<i>II.4.3 Tinción de las proteínas</i>	69
<i>II.4.4 Cuantificación de proteínas</i>	69
<i>II.4.5 Inducción de expresión de la proteína glutamino sintetasa II (GSII)</i>	69
<i>II.4.6 Identificación de la proteína GSII por MALDI-TOF</i>	71
<i>II.4.7 Purificación de la proteína GSII en cultivo Batch</i>	71
<i>II.4.8 Obtención de anticuerpo anti GSII</i>	73
<i>II.4.9 Inmunodetección</i>	73
II.5 Ensayos bioquímicos	74
<i>II.5.1 Medida de actividad glutamino sintetasa (GS)</i>	74
<i>II.5.1.a Ensayo γ-glutamyltransferasa</i>	74

<i>II.5.1.b Ensayo Biosintético</i>	75
<i>II.5.2 Cuantificación de amonio en sobrenadantes de cultivos de B. diazoefficiens</i>	75
II.6 Ensayos de plantas	76
<i>II.6.1 Variedad de Plantas utilizadas</i>	76
<i>II.6.2 Desinfección superficial y germinación de semillas de soja</i>	76
<i>II.6.3 Ensayos de nodulación y determinación de peso seco de plantas</i>	77
<i>II.6.4 Determinación de ureídos – alantoína en microplaca</i>	78
II.7 Microscopía	79
<i>II.7.1 Microscopía óptica</i>	79
<i>II.7.2 Microscopía electrónica de transmisión (MET)</i>	79
II.8 Bases de datos y programas utilizados para los análisis bioinformáticos y análisis estadísticos	79
<i>II.8.1 Bases de datos y programas utilizados para los análisis bioinformáticos</i>	79
<i>II.8.2. Análisis estadísticos</i>	80
Capítulo III - Búsqueda y selección de las condiciones de cultivo para el estudio de la NSR en <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110	
Introducción	81
III.1 Análisis de medios de cultivo	82
III.2 Caracterización fenotípica de <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 cultivada en los medios Evans NG, Evans Glutamato y Evans NH ₄ ⁺	96
III.3 Resumen y discusión	101

Capítulo IV - Caracterización genómica de las glutamino sintetasas de *B. diazoefficiens* USDA 110

Introducción	104
IV.1 Análisis bioinformático de las posibles copias de la enzima GS	105
IV.2 Obtención de cepas mutantes en las enzimas glutamino sintetasas	112
<i>IV.2.1 Obtención del mutante delecional en el gen glnII (que codifica para la enzima GSII)</i>	113
<i>IV.2.2 Obtención de cepas mutantes en los genes que codifican para las enzimas GSI</i>	119
IV.3 Resumen y discusión	130

Capítulo V - Caracterización funcional de las enzimas glutamino sintetasas de *B. diazoefficiens* USDA 110

Introducción	133
V.1 Rol de las enzimas GS en el crecimiento bacteriano	133
V.2 Análisis de las glutamino sintetasas en medios limitados en N	136
<i>V.2.1 Evaluación de la actividad enzimática GS</i>	137
<i>V.2.2 Análisis de expresión de las distintas copias de GS</i>	143
V.3 Análisis de las glutamino sintetasas en medios con cantidades suficientes de N	146
<i>V.3.1. Evaluación de la actividad enzimática GS</i>	146
<i>V.3.2 Análisis de expresión de las distintas copias de GS</i>	148
V.4 Obtención de un antisuero frente a la proteína GSII	150
<i>V.4.1 Construcción del vector de expresión pET22b(+):glnII</i>	151
<i>V.4.2 Obtención de la proteína GSII</i>	154
<i>V.4.3 Ensayos de Western Blot utilizando el antisuero GSII</i>	156
V.5 Resumen y discusión	158

Capítulo VI – Análisis genómico y funcional de las proteínas de señalización PII de <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110	
Introducción	163
VI.1 Análisis bioinformáticos	164
<i>VI.1.1 Análisis de secuencias de las proteínas PII</i>	164
<i>VI.1.2 Análisis de secuencias de los transportadores de amonio (AmtB)</i>	167
VI.2 Estudio de transcritos de las proteínas PII y de los transportadores AmtB	172
VI.3 Construcción de cepas mutantes en los genes <i>glnB</i> , <i>glnK1</i> y <i>glnK2</i>	175
VI.4 Caracterización fenotípica de las cepas mutantes en PII	185
<i>VI.4.1 Rol de las proteínas PII en el crecimiento bacteriano</i>	185
<i>VI.4.2 Análisis de la expresión de los genes <i>glnB</i>, <i>glnK1</i> y <i>glnK2</i> en las cepas mutantes en las proteínas PII</i>	190
<i>VI.4.3 Expresión de los genes que codifican para las glutamino sintetasas GSI y GSII</i>	192
<i>VI.4.4 Medida de la actividad de glutamino sintetasa I (GSI) en los mutantes ΔglnK1, ΔglnK2, ΔglnB y ΔglnK1ΔglnK2</i>	195
<i>VI.4.5 Cuantificación de amonio residual en sobrenadantes y análisis de los transcritos amtB</i>	197
VI.5 Resumen y Discusión	203
Capítulo VII - Interacción con plantas de soja: rol de las proteínas PII de <i>B. diazoefficiens</i> en la simbiosis fijadora de N₂	
Introducción	206
VII.1 Rol de las proteínas PII en la nodulación y en la fijación biológica de N ₂	207
VII.2 Análisis morfológico y de la ultraestructura de nódulos de soja inducidos por <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 y las cepas mutantes en las proteínas PII	212
VII.3 Resumen y Discusión	216

Capítulo VIII – Discusión y Perspectivas

VIII.1 Discusión General 219

VIII.2 Perspectivas 232

Anexos

Anexo 1 234

Anexo 2 240

Referencias Bibliográficas 245

Indice de Tablas

Tabla I.1 Principales fenotipos observados al analizar cepas mutantes en las distintas proteínas PII en bacterias	28-30
Tabla I.2 Proteínas blanco de GlnB y GlnK y efectos del α -cetoglutarato en la asociación PII-proteína blanco	32
Tabla I.3 Características simbióticas y de crecimiento de cepas de rizobios mutantes en las enzimas glutamino sintetasa	35
Tabla II.1 Características de cepas bacterianas utilizados en este trabajo	44-45
Tabla II.2 Características de los plásmidos utilizados	45-46
Tabla II.3.1 Cebadores utilizados para la construcción y el chequeo de cepas mutantes	47-49
Tabla II.3.2 Cebadores utilizados para llevar a cabo qRT-PCR	50
Tabla III.1 Parámetros cinéticos de <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> USDA 110 cultivado en los medios Evans, Evans Bajo N y Evans Bajo C	84
Tabla III.2. Contenido de polisacáridos extracelulares en <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110	86
Tabla III.3 Variantes del medio de Evans analizadas	91
Tabla III.4 Velocidad de crecimiento μ (horas ⁻¹), tiempo de duplicación g (horas) y cosecha máxima (DO _{500nm}) de la cepa salvaje <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 cultivada en medio de Evans NG, Evans NH ₄ ⁺ y Evans Glutamato	98
Tabla VI.1 Velocidad de crecimiento μ (horas ⁻¹) y tiempo de duplicación g (horas) de la cepa salvaje <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 y las cepas mutantes Δ <i>glnB</i> , Δ <i>glnK1</i> , Δ <i>glnK2</i> y Δ <i>glnK1</i> Δ <i>glnK2</i> cultivadas en medio de Evans y Evans Bajo N	188
Tabla VI.2 Velocidad de crecimiento μ (horas ⁻¹) y tiempo de duplicación g (horas) de la cepa salvaje <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 y las cepas mutantes Δ <i>glnB</i> , Δ <i>glnK1</i> , Δ <i>glnK2</i> y Δ <i>glnK1</i> Δ <i>glnK2</i> cultivadas en medio de Evans Glutamato	190
Tabla VI.3 Expresión relativa de los genes que codifican para las proteínas PII (<i>glnB</i> , <i>glnK1</i> y <i>glnK2</i>) en las cepas Δ <i>glnB</i> , Δ <i>glnK1</i> , Δ <i>glnK2</i> , Δ <i>glnK1</i> Δ <i>glnK2</i> a 2 días de cultivo en medio Evans	192
Tabla VI.4 Expresión relativa de los genes que codifican para las proteínas GSI y GSII (<i>glnA1</i> y <i>glnII</i>) en las distintas cepas mutantes en las proteínas PII a 5 días de cultivo en medio Evans	194

Tabla VI.5 Cuantificación de NH ₄ ⁺ residual en sobrenadantes de cultivos de las cepas <i>ΔglnK1</i> , <i>ΔglnK2</i> , <i>ΔglnB</i> y <i>ΔglnK1ΔglnK2</i> en comparación con la cepa salvaje <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110	198
Tabla VI.6 Expresión relativa de los genes que codifican para los posibles transportadores de amonio (<i>amtB1</i> y <i>amtB2</i>) en las cepas <i>ΔglnK1</i> , <i>ΔglnK2</i> , <i>ΔglnB</i> y <i>ΔglnK1ΔglnK2</i> en comparación con la cepa salvaje <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 cultivadas 2 días en medio Evans	201
Tabla VII.1 Evaluación de la nodulación y la fijación biológica de N ₂ de las cepas mutantes en las proteínas PII y la cepa salvaje <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110	209

INDICE DE FIGURAS

Figura I.1 Esquema general del ciclo biogeoquímico del nitrógeno y los organismos y sistemas que intervienen en él	3
Figura I.2 Esquema del proceso de infección y formación del nódulo	9
Figura I.3 Fotografías de nódulos en raíces de leguminosas	11
Figura I.4 Estructura tridimensional del transportador de amonio AmtB de <i>Escherichia coli</i>	17
Figura I.5 Esquema de la asimilación de NH ₄ ⁺ en bacterias	18
Figura I.6 Esquema general de la regulación de la asimilación de NH ₄ ⁺ en bacterias	21
Figura I.7 Estructura de las proteínas PII	24
Figura I.8 Modelo de la regulación de la actividad AmtB por GlnK en <i>E. coli</i> .	27
Figura I.9 Esquema general de la cascada NSR en rizobios	40
Figura II.1 Marcadores de peso molecular	62
Figura II.2 Esquema general de la estrategia de clonado utilizada para obtener la construcción que permite delecionar un gen de interés sin modificar el marco de lectura	66
Figura III.1 Cinéticas de crecimiento de <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 a 28 °C con agitación a 180 rpm en los medios Evans, Evans Bajo C y Evans Bajo N	84
Figura III.2 Fotografías de los pellets bacterianos obtenidos de cultivos de <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 en los medios de Evans y Evans Bajo N	86
Figura III.3 Productos de amplificación obtenidos mediante RT-PCR utilizando los cebadores sigA Fw/sigA Rv y glnII_RT_Fw/glnII_RT_Rv	88
Figura III.4 Análisis de la expresión de transcritos del gen <i>glnII</i> por PCR en tiempo real (qRT-PCR) en la cepa <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 a partir de cultivos de 5 días en medio Evans tomando como referencia el medio Evans Bajo C	89
Figura III.5 Medida de la actividad enzimática GS de la cepa <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 cultivada durante 5 días en los medios Evans y Evans Bajo C	90
Figura III.6 Cinéticas de crecimiento de <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 a 28 °C con agitación a 180 rpm en medios Evans con diversas formulaciones utilizando manitol 5 g.l ⁻¹ para obtener las relaciones C/N 660,200 y 1,4	92
Figura III.7 Cinéticas de crecimiento de <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 a 28 °C con agitación a 180 rpm en medios Evans con diversas formulaciones utilizando 2 g.l ⁻¹ de manitol para obtener las relaciones C/N 100, 50 o 2	93

Figura III.8 Cinéticas de crecimiento preliminares de <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 a 28 °C con agitación a 180 rpm en los medios Evans NG, Evans Glutamato y Evans NH ₄ ⁺	95
Figura III.9 Cinéticas de crecimiento de <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 a 28 °C con agitación a 180 rpm en los medios Evans NG, Evans Glutamato y Evans NH ₄ ⁺	97
Figura III.10 Efecto de la adición de NH ₄ Cl a cultivos en fase estacionaria de <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 en los medios Evans NG, Evans Glutamato y Evans NH ₄ ⁺	99
Figura III.11 Expresión relativa del gen <i>glnII</i> en <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 cultivada durante 5 días en Evans NH ₄ ⁺ (A) o Evans Glutamato (B)	100
Figura III.12 Medida de la actividad glutamino sintetasa de la cepa <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 cultivada en distintas variantes del medio de Evans durante 5 días	101
Figura IV.1 Representación del entorno genético y la disposición de los genes que codifican para las glutamino sintetetas de <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110	106
Figura IV.2 Análisis de regiones características de las secuencias proteicas de las enzimas glutamino sintetetas de <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110	107
Figura IV.3 Análisis de dominios de las proteínas glutamino sintetetas de <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110	108
Figura IV.4 Alineamiento de las secuencias proteicas (mediante el servidor <i>online</i> ClustalO) de las distintas GS de <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110	109
Figura IV.5 Representación de los modelados proteicos predichos para las distintas copias/isoformas de las glutamino sintetetas de <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110	110
Figura IV.6 Análisis filogenético de las enzimas glutamino sintetetas de <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110	111
Figura IV.7 Esquema general de la estrategia de clonado del fragmento 5' del gen <i>glnII</i> en el plásmido pG18mob:://3'::Km	115
Figura IV.8 Mapa esquemático de las orientaciones que se pueden obtener mediante la ligación del pG18mob2:://3'::Km y el fragmento //5' y confirmación de la obtención del vector pG18mob2:://3'::Km:://5'	116-117
Figura IV.9 Obtención del mutante $\Delta glnII$ por doble recombinación homóloga, y posterior confirmación del mismo	118
Figura IV.10 Esquema de la estrategia de clonado para la construcción del vector pFL4949 empleado para realizar la delección de <i>glnA1</i> (blr4949) en <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110	120-121

Figura IV.11 Mapa esquemático del gen <i>glnA1</i> (blr4949) y confirmación mediante PCR de la obtención del mutante $\Delta glnA1$	122
Figura IV.12 Esquema de la estrategia de clonado para la construcción del vector pFL4835 empleado para realizar la delección de <i>glnA2</i> (blr4835) en <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 y en la cepa mutante $\Delta glnA1$	124-125
Figura IV.13 Mapa esquemático del gen <i>glnA2</i> (blr4835) y confirmación mediante PCR de la obtención del mutante $\Delta glnA2$ y del doble mutante $\Delta glnA1\Delta glnA2$.	127
Figura IV.14 Esquema de la estrategia de clonado utilizada para la construcción del vector pFL1069 empleado para realizar la delección de <i>glnA3</i> (bll1069) en <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110	128
Figura IV.15 Mapa esquemático del gen <i>glnA3</i> (bll1069) y confirmación mediante PCR de la obtención del mutante $\Delta glnA3$	129
Figura V.1 Cinéticas de crecimiento de las cepas mutantes $\Delta glnA1$, $\Delta glnA2$, $\Delta glnA1\Delta glnA2$, $\Delta glnA3$ y $\Delta glnII$ en comparación con la cepa parental <i>B. diazoefficiens</i> USDA110 en el medio Evans NG	134
Figura V.2 Cinéticas de crecimiento de las cepas mutantes $\Delta glnA1$, $\Delta glnA2$, $\Delta glnA1\Delta glnA2$, $\Delta glnA3$ y $\Delta glnII$ en comparación con la cepa parental <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 cultivadas en los medios Evans Glutamato (A y B), Evans NH_4^+ (C y D) y Evans Bajo N (E)	135
Figura V.3 Medida de la actividad enzimática GS mediante el método γ -glutamilttransferasa de las cepas $\Delta glnA1$, $\Delta glnA2$, $\Delta glnA1\Delta glnA2$, $\Delta glnA3$ y $\Delta glnII$ en comparación con la cepa salvaje <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 cultivadas en medio Evans NH_4^+ (A) y Evans Glutamato (B)	138
Figura V.4 Medida de la actividad enzimática GS mediante el método γ -glutamilttransferasa de las cepas $\Delta glnA1$, $\Delta glnA2$, $\Delta glnA1\Delta glnA2$ y $\Delta glnII$ en comparación con la cepa salvaje <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 cultivadas en medio Evans Bajo N	140
Figura V.5 Medida de la actividad enzimática GS mediante el método biosintético de las cepas $\Delta glnA1$, $\Delta glnA2$, $\Delta glnA1\Delta glnA2$, $\Delta glnA3$, y $\Delta glnII$ en comparación con la cepa salvaje <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 cultivadas en medio Evans NH_4^+ (A) y Evans Glutamato (B)	142
Figura V.6 Expresión relativa de los genes que codifican para las glutamino sintetetasas: <i>glnA1</i> , <i>glnA2</i> , <i>glnA3</i> , <i>glnA4</i> y <i>glnII</i> para las cepas mutantes $\Delta glnA1$ (A) y $\Delta glnII$ (B) en relación a la cepa <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 cultivadas en el medio Evans NH_4^+ durante 5 días	144
Figura V.7 Expresión relativa de los genes que codifican para las glutamino sintetetasas: <i>glnA1</i> , <i>glnA2</i> , <i>glnA3</i> , <i>glnA4</i> y <i>glnII</i> para las cepas mutantes $\Delta glnA1$ (A) y $\Delta glnII$ (B) en relación a la cepa <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 cultivadas en medio Evans Glutamato durante 5 días.	146

Figura V.8 Medida de la actividad glutamino sintetasa de las cepas $\Delta glnA1$, $\Delta glnA2$, $\Delta glnA1\Delta glnA2$ y $\Delta glnII$ en comparación con la cepa salvaje <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 cultivadas en medio Evans NG	147
Figura V.9 Expresión relativa de los genes que codifican para las glutamino sintetetas: <i>glnA1</i> , <i>glnA2</i> , <i>glnA3</i> , <i>glnA4</i> y <i>glnII</i> para las cepas mutantes $\Delta glnA1$ (A) y $\Delta glnII$ (B) en relación a la cepa <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 cultivadas en medio Evans NG durante 5 días	149
Figura V.10 Esquema del fragmento de <i>glnII</i> ligado al vector de expresión pET22b(+)	151
Figura V.11 Esquema de la estrategia general de clonado utilizada para la obtención del vector de expresión pET22b(+):: <i>glnII</i> que contiene el gen <i>glnII</i> (blr4169) completo y en marco para su sobreexpresión	153
Figura V.12 Análisis mediante SDS-PAGE de la inducción de la expresión de la proteína GSII	155
Figura V.13 Análisis mediante SDS-PAGE de la purificación de la proteína GSII	156
Figura V.14 Análisis por Western blot de las proteínas de <i>B. diazoefficiens</i> utilizando el anticuerpo anti-GSII	157
Figura V.15 Análisis por Western blot utilizando el anticuerpo anti-GSII	158
Figura VI.1 A) Organización genómica de los <i>clusters</i> que contienen los genes <i>glnB</i> , <i>glnK1-amtB1</i> y <i>glnK2-amtB2</i> en el genoma de <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110. B) Comparación de las secuencias de las tres proteínas PII de <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110	165
Figura VI.2 Comparación de la región genómica del ADN cromosomal de <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 y microorganismos que poseen duplicado el par <i>glnK-amtB</i>	168
Figura VI.3 Análisis de dominios de la secuencia proteica del transportador de amonio AmtB1 (ORF blr0613)	170
Figura VI.4 Análisis de dominios de la secuencia proteica del transportador de amonio AmtB2	171
Figura VI.5 Análisis de expresión de transcritos de las proteínas PII y los transportadores de amonio AmtB	173
Figura VI.6 Análisis de coexpresión de los genes <i>glnK-amtB</i>	175
Figura VI.7 Esquema de la estrategia de clonado utilizada para la construcción del vector pFL4948 empleado para realizar la delección de <i>glnB</i> (blr4948) en <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 y chequeo de la construcción obtenida	177
Figura VI.8 Mapa esquemático del gen <i>glnB</i> (blr4948) en la cepa salvaje y en la cepa mutante, y confirmación mediante PCR de la obtención del mutante $\Delta glnB$	178

Figura VI.9 Esquema general de la estrategia de clonado utilizada para la construcción del vector pFL0612 empleado para realizar la delección de <i>glnK1</i> (blr0612) en <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 y chequeo de la construcción obtenida	180
Figura VI.10 Estrategia de clonado para la construcción del vector pFL0606 empleado para realizar la delección de <i>glnK2</i> (blr0606) en <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 y chequeo de la construcción obtenida	181
Figura VI.11 Mapa esquemático del gen <i>glnK1</i> (blr 0612) en la cepa salvaje y en la mutante, y confirmación mediante PCR de la obtención del mutante $\Delta glnK1$	183
Figura VI.12 Mapa esquemático del gen <i>glnK2</i> (blr0606) y confirmación mediante PCR de la obtención del mutante $\Delta glnK2$ y del doble mutante $\Delta glnK1\Delta glnK2$.	184
Figura VI.13 Cinéticas de crecimiento de las cepas mutantes $\Delta glnB$, $\Delta glnK1$, $\Delta glnK2$, $\Delta glnK1\Delta glnK2$ en comparación con la cepa parental USDA 110 en los medios Evans (A y B) y Evans Bajo N (C y D)	187
Figura VI.14 Cinéticas de crecimiento de las cepas mutantes $\Delta glnB$, $\Delta glnK1$, $\Delta glnK2$, $\Delta glnK1\Delta glnK2$ en comparación con la cepa parental USDA 110 en el medio Evans Glutamato	189
Figura VI.15 Medida de la actividad específica de la enzima GSI por la reacción γ -glutamyltransferasa en las cepas $\Delta glnB$, $\Delta glnK1$, $\Delta glnK2$, $\Delta glnK1\Delta glnK2$ a 5 días de cultivo en medio Evans	196
Figura VI.16 Cuantificación de amonio residual en sobrenadantes de cultivos de la cepa salvaje y las cepas mutantes en medio Evans Bajo C	200
Figura VII.1 Esquema experimental para los ensayos de interacción con plantas de soja	208
Figura VII.2 Aspecto macroscópico de las plantas, raíces y nódulos a los 28 días post inoculación	211
Figura VII.3 Microscopía óptica de cortes transversales de nódulos de soja (<i>Glycine max</i>) ocupados por las cepas <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 (A y E), $\Delta glnB$ (B y F), $\Delta glnK1$ (C y G) y $\Delta glnK2$ (D y H)	213
Figura VII.4 Microscopía electrónica de nódulos de soja (<i>G. max</i>) ocupados por las cepas <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 (A), $\Delta glnK2$ (B), $\Delta glnK1$ (C y D), $\Delta glnB$ (E y F)	215
Figura A.1 Esquema representativo de la región génica de <i>glnD</i> (flecha naranja) (A) y predicción de dominios de la proteína GlnD (B)	241
Figura A.2 Esquema de la estrategia de clonado utilizada para la construcción del vector pFL0916	244

Capítulo I

Introducción



I.1 El nitrógeno (N): un elemento esencial para la vida

La vida en nuestro planeta data de aproximadamente unos 3500 millones de años, y sus comienzos fueron gracias a la fusión de pequeños átomos de C, H, O, N y otros compuestos que, en condiciones adecuadas, permitieron la formación de las primeras moléculas en aquella atmósfera primitiva. Desde ese entonces, la existencia de los sistemas biológicos depende, en mayor o menor medida, de los ciclos biogeoquímicos de estos elementos en la naturaleza.

Entre estos compuestos muy importantes para la vida de todos los seres vivos encontramos al nitrógeno (N), uno de los principales componentes de las moléculas vitales como ácidos nucleicos (ADN y ARN), proteínas, amino-azúcares y otros biopolímeros. Después del carbono y el oxígeno, es el elemento más abundante en la célula, representando, en promedio, entre el 12 y el 15% del peso seco de la misma. En la naturaleza, el N se encuentra principalmente como dinitrógeno (N_2), molécula inerte que constituye el 79% de la composición gaseosa de nuestra atmósfera, y que no es utilizable por la mayoría de los organismos vivos. La imposibilidad que poseen los organismos para metabolizar este elemento radica en que la incorporación del N_2 atmosférico es lenta y dificultosa, debido a la presencia de un triple enlace entre los dos átomos de N que hacen que la energía de activación requerida para su incorporación sea muy elevada. Debido a esto, la molécula de N_2 es tan estable que apenas se combina con otros elementos y, por tanto, los organismos capaces de incorporarlo primero necesitan reducirlo y luego fijarlo en forma de iones amonio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-) o nitrato (NO_3^-). Por otra parte, los depósitos geológicos que contienen N combinado fácilmente disponible por los seres vivos son escasos, siendo esto un factor limitante para la producción primaria en muchos ecosistemas (Canfield *et al.*, 2010). Los iones de N inorgánico, como el NH_4^+ , NO_2^- y NO_3^- , que son los iones más requeridos en los ecosistemas terrestres y marinos, se encuentran como sales solubles en agua; consecuentemente, se distribuyen en la ecósfera diluidos en soluciones acuosas, formando pequeños reservorios de reciclado activo. La materia orgánica viva y muerta también supone una reserva de N, aunque muy pequeña.

Así, los seres vivos han evolucionado y desarrollado diversas respuestas adaptativas a través del mejoramiento de rutas metabólicas y de sistemas de regulación genéticos,

que les permiten captar y asimilar los distintos nutrientes de manera de aprovechar las fuentes disponibles según el ecosistema que habitan.

I.2 El suelo: un ecosistema fluctuante

El suelo es el hábitat donde coexisten innumerables seres vivos de tamaño y funciones muy variables. Se estima que alrededor de un tercio de los seres vivos del planeta viven en él. Estos organismos condicionan la evolución de este ecosistema de acuerdo con la composición y la tasa de degradación de la materia orgánica que generan, lo cual, a su vez, puede modificar el pH y la composición iónica del suelo y como consecuencia, la propia biodiversidad. Debido a esto, los microorganismos son uno de los mayores responsables de que el suelo sea un ambiente en el cual la composición nutritiva varíe permanentemente en el tiempo y en el espacio. Durante su crecimiento y como consecuencia de sus diversos metabolismos, los microorganismos del suelo intervienen en los ciclos biogeoquímicos de los compuestos como carbono (C), azufre (S), nitrógeno (N), fósforo (P), hierro (Fe) y manganeso (Mn). Un grupo importante dentro de estos microorganismos son los procariontes que resultan irremplazables en el ciclado de estos nutrientes, donde transforman los compuestos por medio de reacciones de óxido-reducción.

En particular, el ciclo biogeoquímico del N consta de tres procesos básicos: la nitrificación, la desnitrificación y la fijación de N_2 atmosférico (**Figura I.1**). La nitrificación es el proceso aeróbico de oxidación de los iones NH_4^+ a NO_2^- , el cual posteriormente se oxida a NO_3^- . En el suelo se encuentran bacterias autótrofas nitrificantes, como las del género *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*, que obtienen energía por oxidación del amoníaco (NH_3) y de los nitritos respectivamente, y, por lo tanto, son las que llevan a cabo el paso de nitrificación. La capacidad del NO_3^- de moverse más fácilmente que el NH_4^+ en el suelo lo hace la principal fuente de N de las plantas.

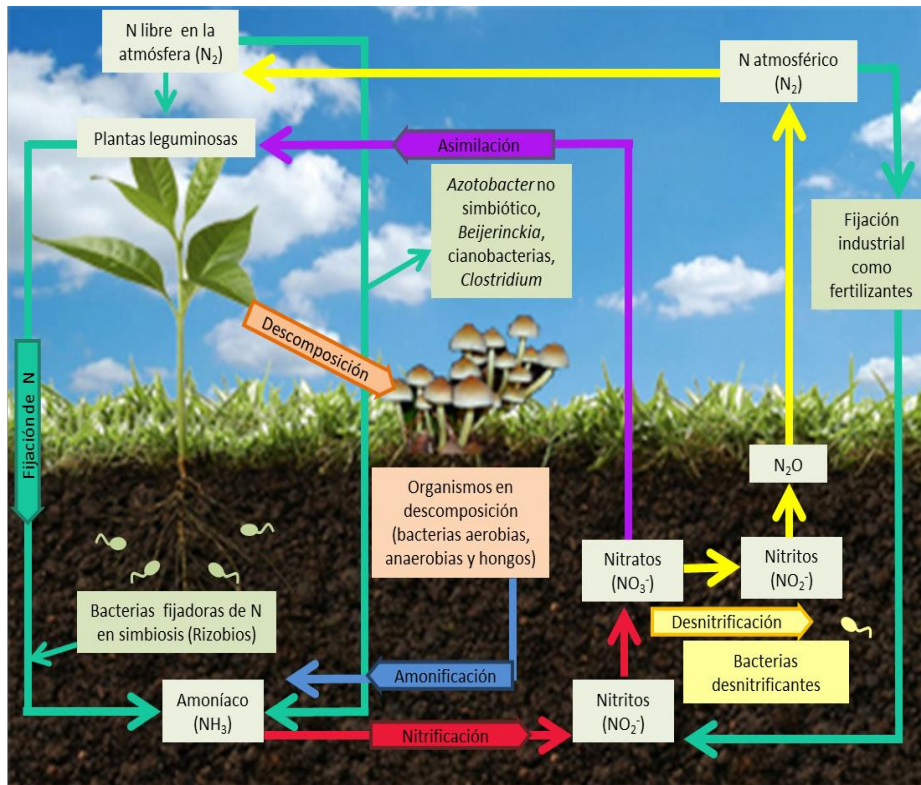


Figura I.1 Esquema general del ciclo biogeoquímico del nitrógeno y los organismos y sistemas que intervienen en él. Los principales procesos que ocurren en el ciclo biogeoquímico del N son la nitrificación, la desnitrificación y la fijación biológica de N_2 . En la nitrificación los iones NH_4^+ son oxidados a NO_2^- y luego a NO_3^- gracias a las bacterias del suelo. El nitrato producido puede ser utilizado por ciertos microorganismos como aceptor final de electrones. Estos microorganismos son los que llevan a cabo la desnitrificación. En ella, el NO_3^- se reduce nuevamente a NO_2^- y este se reduce hasta obtener N_2O y finalmente N_2 que es liberado a la atmósfera. El N_2 atmosférico, finalmente, es fijado biológicamente por microorganismos específicos capaces de romper enzimáticamente los enlaces del N molecular y liberarlo nuevamente al suelo en forma de NH_4^+ . Gráfico modificado del libro “Introducción a la Microbiología”- Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke, Christine L., 2007.

Por su parte, los iones NH_4^+ constituirían una fuente de N más eficiente porque requieren menos energía para ser incorporados, pero en el suelo estos iones están unidos a partículas de arcilla negativas, mientras que los iones NO_3^- se encuentran libres permitiendo que puedan llegar fácilmente a las raíces de las plantas. El N que se forma en la nitrificación está oxidado y, por lo tanto, no posee energía biológicamente utilizable. Sin embargo, existen microorganismos capaces de utilizarlo, en ausencia de O_2 , como aceptor final de electrones mediante un proceso denominado desnitrificación, en el que intervienen generalmente heterótrofos como *Pseudomonas denitrificans*. La

desnitrificación se produce en condiciones ambientales diferentes a aquellas en las que ocurre la nitrificación, ya que normalmente son necesarios suelos saturados de agua donde el O_2 es escaso. Los productos principales de la reacción son los gases N_2 y óxido de nitrógeno (N_2O), aunque también se puede acumular NO_2^- . Este proceso permite devolver el N a la atmósfera, dejando al suelo desprovisto de N.

Finalmente, existen tres formas de incorporación de N_2 a la biósfera: el proceso industrial de Haber-Bosch, en el cual se utilizan altas presiones y temperaturas para transformar el N_2 a NH_4^+ (proceso principalmente empleado para producir fertilizantes), la fijación natural que ocurre como consecuencia de las descargas eléctricas y la fijación biológica de nitrógeno (FBN). Gracias a este último proceso biológico, llevado a cabo exclusivamente por procariontas, el N_2 que se encuentra inerte en la atmósfera puede ser transformado en un compuesto fácilmente asimilable.

Los microorganismos que realizan la FBN son capaces de romper la unión de sus enlaces por medio de un complejo enzimático especializado y producir compuestos nitrogenados que pueden ser aprovechados por la mayoría de los seres vivos, en especial las plantas. A su vez, las plantas transforman el N fijado en aminoácidos y proteínas vegetales, que son aprovechadas por los herbívoros, quienes los van almacenando para finalmente pasarlos al último eslabón de la cadena alimenticia, es decir, a los carnívoros. De esta manera, la FBN incorpora N a los suelos sin riesgos ecológicos para el medio ambiente.

Por el contrario, la síntesis industrial de los fertilizantes nitrogenados es un proceso energéticamente desfavorable y que trae aparejado un alto costo ambiental, ya que la producción y utilización masiva de estos fertilizantes químicos se evidencian hoy en grandes riesgos para el suelo, el agua y el aire. Son bien conocidos los fenómenos de la eutrofización de aguas superficiales y subterráneas (Vance 2001; Fowler *et al.*, 2013), y la producción de intermediarios de N como el N_2O , que es un producto muy nocivo para la capa de ozono y contribuye al efecto invernadero, la lluvia ácida y al calentamiento global (Ravishankara *et al.*, 2009). Frente a esta problemática ambiental, la optimización de la FBN es de suma relevancia y resulta de gran interés que ha determinado que sea considerada objeto de intensa investigación en el ámbito científico.

I.3 Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN)

Las bacterias que habitan en el suelo han desarrollado sistemas específicos que les permiten sobrevivir y adaptarse a condiciones fluctuantes debido a los diferentes estreses ambientales que soportan. Particularmente, la microbiota bacteriana de los suelos agrícolas se encuentra bajo condiciones de inanición en el suelo desnudo y altas concentraciones de nutrientes en las zonas rizosféricas, aunque estos nutrientes deben ser captados en condiciones de muy bajo potencial de agua impuestas por la succión que ejerce la raíz. Así, dichas bacterias sufren importantes cambios morfológicos y fisiológicos para adaptarse a estas condiciones nutritivas cambiantes.

La capacidad de fijar (reducir) N_2 atmosférico es una de las adaptaciones que los procariontes han desarrollado para sobrevivir a ambientes limitados en este nutriente. Por muchos años, se creyó que solamente un número limitado de especies bacterianas eran las responsables de fijar N_2 (Postgate, 1982). Sin embargo, en los últimos 40 años se ha demostrado que la fijación de N_2 puede ser llevada a cabo por microorganismos altamente especializados denominados diazótrofos, entre los que encontramos cianobacterias, bacterias y arqueas, tanto en ambientes terrestres (Halbleib y Ludden, 2000) como acuáticos (Capone, 2001).

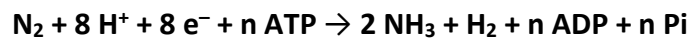
La FBN es de fundamental importancia en la biósfera ya que es la responsable de la introducción del N que luego será utilizado como nutriente por todos los organismos vivos. Además, este proceso tiene mucho valor dentro del contexto de la agricultura sustentable, ya que como mencionamos, puede evitar el uso abusivo de fertilizantes nitrogenados, disminuyendo la degradación del medio ambiente y ahorrando en el consumo de energía.

Dependiendo de la forma en que llevan a cabo la FBN, podemos distinguir a los diazótrofos en tres grupos. Un primer grupo, los fijadores de vida libre, son capaces, como lo indica su nombre, de fijar N_2 atmosférico en vida libre, sin necesidad de asociarse a un organismo vivo de otra especie, como las cianobacterias y bacterias de los géneros *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, y *Klebsiella*. Un segundo grupo involucra las rizocenosis diazotróficas, en el que las bacterias fijadoras se asocian a una planta hospedadora aunque sin modificar la estructura de la misma. El tercer grupo es el de las bacterias fijadoras en simbiosis, que tienen la particularidad de asociarse estrechamente

a las raíces de sus plantas hospedadoras formando nuevas estructuras muy especializadas, llamadas nódulos, en las que luego se diferencian a bacteroides para fijar el N₂ de la atmósfera (Spaink *et al.*, 1998; Hablieb y Ludden, 2000; Hirsch *et al.*, 2002; Peoples *et al.*, 2002; Gage, 2004). Entre este grupo de bacterias encontramos algunos géneros de actinomicetes (*Frankia*), de cianobacterias (*Anabaena* y *Nostoc*), y finalmente, algunas α y β -proteobacterias conocidas colectivamente como rizobios que son capaces de establecer simbiosis con plantas leguminosas (Wagner, 2011).

Independientemente de la forma en que fijen el N atmosférico, todos los microorganismos capaces de realizar la FBN lo hacen gracias al complejo multienzimático de la nitrogenasa, el cual es responsable de la conversión del N₂ en amoníaco (Raymond *et al.* 2004).

La reacción que cataliza la nitrogenasa es la siguiente:



Siendo $n \geq 16$. Pi significa fosfato inorgánico, e⁻ electrones y n el número de moles.

Para llevar a cabo esta reacción se requieren grandes cantidades de poder reductor, energía en forma de ATP y la reducción obligada de protones con un mínimo de 1 mol de H₂ producido por mol de N₂ reducido (Halbeib y Ludden, 2000).

La forma más común de la nitrogenasa está constituida por dos componentes, un homodímero de una hierroproteína que es capaz de unir ATP, y un heterotetrámero de una molibdeno-hierro (Mo-Fe) proteína (Cebolla y Palomares, 1994; Halbleib y Ludden, 2000). Esta enzima está codificada por los genes *nif*, y es altamente sensible al O₂, ya que éste compuesto desnaturaliza irreversiblemente a su cofactor Mo-Fe (Shaw y Brill, 1977). Es por esto que los organismos fijadores de N poseen mecanismos morfológicos y bioquímicos que les permiten tener bajas las concentraciones de O₂ a fin de mantener la enzima funcionando (Ureta y Nordlund, 2002; Lee *et al.*, 2004).

I.4 Los rizobios

Los rizobios son bacterias que habitan los suelos pertenecientes al orden Rhizobiales y que actualmente comprenden varias familias. En cuanto a su morfología, poseen forma

bacilar, son Gram negativas, aeróbicos y/o microaeróbicos y no esporuladas (Jordan, 1984). La palabra “rizobio” implica en sentido estricto bacterias del género *Rhizobium*, pero actualmente este término se aplica a todos los representantes bacterianos que pueden nodular y fijar N₂ en asociación con plantas leguminosas (Palmer *et al.*, 2000). Los rizobios se dividen en α y β proteobacterias (Lloret y Martínez-Romero, 2005). Según el *International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee for the Taxonomy of Rhizobium*, la clasificación actual basada en criterios moleculares agrupa a los rizobios en 14 géneros de α -proteobacterias: *Agrobacterium (Rhizobium)*, *Allorhizobium*, *Aminobacter*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium*, *Shinella*, *Ensifer (Sinorhizobium)* y 3 géneros de β -proteobacterias: *Burkholderia*, *Cupriavidus (Wautersia)*, *Herbaspirillum* (<http://edzna.ccg.unam.mx/rhizobial-taxonomy>; Weir, 2016; de Lajudie y Young, 2018). Esta clasificación taxonómica de los rizobios se basa en la filogenia obtenida a partir de genes de referencia de expresión constitutiva y similitudes de genomas completos (Lindström *et al.*, 2006).

Otra manera de clasificar a los rizobios se basa en su tasa de crecimiento (Stowers, 1985). En este sentido, existen dos grandes grupos: rizobios de crecimiento lento y rizobios de crecimiento rápido (Allen *et al.*, 1950; Elkan, 1981). Los rizobios denominados de crecimiento rápido poseen tiempos de generación de menos de seis horas. Dentro de este grupo encontramos los géneros *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*. Los rizobios de crecimiento lento tienen tiempos de generación superiores a seis horas e involucran a las bacterias del género *Bradyrhizobium* (Jordan, 1984). Estudios basados en las secuencias de ARN 16S indican que dentro de dicho género podemos encontrar una amplia variedad de α -proteobacterias que abarcan desde bacterias que establecen interacciones simbióticas con leguminosas hasta bacterias oligotróficas (Sawada *et al.*, 2003).

En la naturaleza, los rizobios pueden encontrarse de dos formas: libres en el suelo lo que denominamos en vida libre, o como bacteroides cuando se hallan en el interior de los nódulos de las raíces de las leguminosas. La diferenciación de rizobio a bacteroide va acompañada de una serie de importantes cambios en la expresión génica, que se traducen en cambios morfológicos y fisiológicos (Oke y Long, 1999; Natera *et al.*, 2000; Oldroyd *et al.*, 2011). En este sentido, los bacteroides tienen formas irregulares y son

inmóviles. Asimismo, sólo los rizobios que se encuentran diferenciados a bacteroides dentro de los nódulos son capaces de fijar N_2 . Allí, encuentran un ambiente con baja presión de O_2 , lo que les permite la expresión y actividad del complejo de la nitrogenasa que, como mencionamos previamente en este capítulo, reduce el N_2 atmosférico a NH_4^+ . La mayoría de los diazótrofos utiliza este producto para satisfacer sus propias necesidades de N. Sin embargo, en los rizobios estos productos en vez de ser utilizados por los bacteroides son transferidos a la planta en forma de aminoácidos o ureídos (O'Gara *et al.*, 1976). En compensación, los rizobios dentro del nódulo reciben protección y compuestos carbonados por parte de la planta necesarios para subsistir y fijar N_2 (Patriarca *et al.*, 2004; Prell y Poole, 2006; Terpolilli *et al.*, 2012).

Los rizobios en vida libre, por otra parte, se pueden encontrar en estado planctónico o en estado sésil formando parte de *biofilms* bacterianos. En estado planctónico son bacilos móviles que suelen presentar un flagelo polar o subpolar tipo peritrico y numerosos flagelos distribuidos uniformemente a lo largo de su superficie. Además, los rizobios son capaces de colonizar rápidamente la zona rizosférica y multiplicarse activamente en ella ya que allí encuentran una gran cantidad de sustancias nutritivas exudadas por las plantas. Algunos exudados específicos secretados por las plantas pueden iniciar una “comunicación” con los rizobios con el fin de establecer interacciones especializadas como es el caso de la simbiosis rizobio - leguminosa.

I.5 Desarrollo de la simbiosis rizobio – leguminosa

La interacción simbiótica entre rizobios y leguminosas es un proceso complejo que posee varias etapas (**Figura I.2**), y que comienza con el intercambio de señales entre la planta hospedante y el rizobio (Jiménez-Guerrero *et al.*, 2017). Para poder iniciar una simbiosis productiva, en primer lugar, los rizobios deben reconocer la presencia de las raíces de la planta hospedadora y generar una respuesta para que el reconocimiento sea mutuo, de lo contrario los sistemas de defensa de la planta se activarían para enfrentar la infección bacteriana. El reconocimiento por parte de las bacterias se desarrolla gracias a que las raíces de las plantas producen cambios importantes en la composición química de la rizósfera.

Las raíces liberan una gran cantidad de compuestos tales como aminoácidos, azúcares, proteínas, flavonoides, alcoholes, vitaminas y hormonas. El ambiente que se genera es rico en nutrientes y puede promover el crecimiento de las poblaciones rizobianas del suelo gracias a la quimiotaxis positiva que presentan las mismas hacia muchos de los compuestos liberados. Esta quimiotaxis puede producirse en forma inespecífica (Gaworzewska y Carlile, 1982) o en forma selectiva hacia ciertos flavonoides liberados por su hospedante (Caetano-Anollés *et al.*, 1988; Perret *et al.*, 2000; Cooper, 2007). Además, las raíces en su propio desarrollo pueden encontrar a los rizobios libres. El resultado de todos estos procesos es la colonización rizosférica de las raíces.

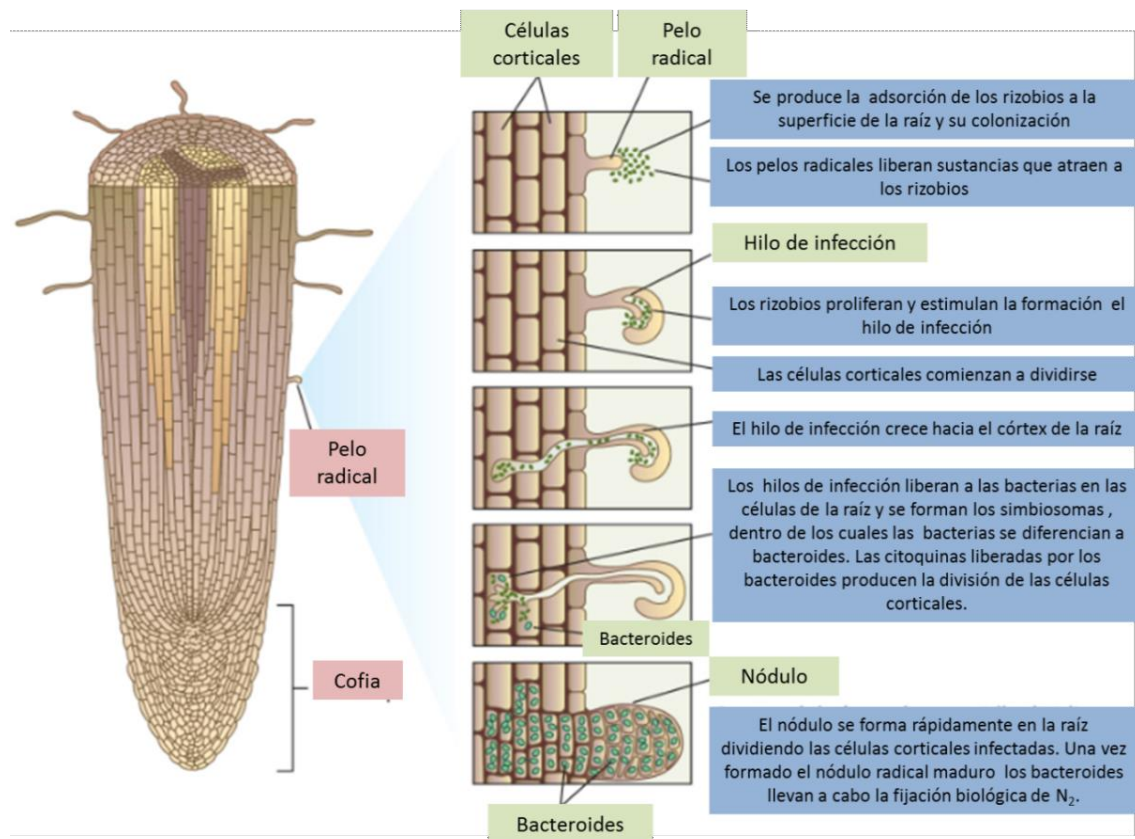


Figura I.2 Esquema del proceso de infección y formación del nódulo. En primer lugar, se lleva a cabo el reconocimiento de los simbiosomas, previo a su contacto, en el cual participan señales solubles tanto de la planta como de los rizobios. Luego, los rizobios comienzan el proceso de adsorción y colonización de las raíces. Los pelos radicales se van encurvando y los rizobios quedan atrapados en dicha curvatura. La invaginación del pelo forma el hilo de infección, por el cual los rizobios avanzan hasta llegar a las células del córtex que están formando el primordio de nódulo. Allí se forman los simbiosomas donde las bacterias se dividen y se diferencian a bacteroides, mientras los nódulos maduran. Finalmente, los bacteroides dentro de los simbiosomas fijan N_2 atmosférico. Imagen modificada de

http://evolution-textbook.org/content/free/figures/06_EVOW_Art/26_EVOW_CH06.jpg

Los rizobios detectan, durante su crecimiento en la rizósfera, los compuestos liberados por las raíces y en respuesta a ellos inducen la expresión de los genes de nodulación (*nod*) (Cosgrove *et al.*, 1997; Cassab, 1998; Peck *et al.*, 2006). Los genes *nod* codifican aproximadamente 25 proteínas requeridas para la síntesis y exportación de un lipoquilo-oligosacárido denominado factor Nod (Gage, 2004; Downie, 2010), el cual es clave en el desarrollo del nódulo (Mergaert *et al.*, 1997; Fujishige *et al.*, 2008; Ferguson *et al.*, 2010; Streng *et al.*, 2011). La estructura química básica de los factores de nodulación sufre modificaciones de sus residuos dependiendo del rizobio (Mergaert *et al.*, 1997), lo que determinará su especificidad simbiótica (Perret *et al.*, 2000).

Para iniciar el proceso de infección los rizobios no sólo deben colonizar la rizósfera sino también unirse a la raíz. La unión o adhesión a las raíces es el evento más temprano de contacto físico entre la planta y estas bacterias, y se inicia en forma inmediata al momento en que los rizobios entran en contacto con las raíces. Luego de la adhesión, ocurre una curiosa deformación de los pelos radicales, llamada enrulado del pelo radical (Patriarca *et al.*, 2004; Ferguson *et al.*, 2010). En este fenómeno los rizobios quedan atrapados en la curvatura interior del pelo radical, y posteriormente penetran al mismo formando un hilo de infección longitudinal en dirección a las células subcorticales de la raíz donde se está formando el nódulo (Gage, 2004). Este hilo de infección consiste en una estructura tubular, donde sólo una célula -o a lo sumo dos- penetra, y luego la bacteria es capaz de proliferar y continuar esta estructura hasta alcanzar las células corticales. Los rizobios también pueden infectar las raíces a través de alguna rotura en los pelos radicales (*crack entry*) e invadir las células corticales sin la necesidad de formar un hilo de infección (Oldroyd y Downie, 2008).

En paralelo con la colonización de la rizósfera y la formación del hilo de infección, se induce la organogénesis del nódulo. Este proceso, así como la formación de otros órganos de la planta (como las flores, las hojas o las raíces), se lleva a cabo a través de varios pasos regulados de manera temporal y espacial (Patriarca *et al.*, 2004). La liberación del factor Nod induce el desarrollo del primordio del nódulo. Una vez inducido, dentro del primordio continúan las divisiones mitóticas de las células corticales, que sufren un proceso de desdiferenciación lo que conduce a la formación de un meristema cuya función será generar el tejido en crecimiento del nódulo. Según el tipo de célula subcortical que comienza a dividirse será el tipo de nódulo formado. Esto

depende del genotipo de la leguminosa (Limpens *et al.*, 2005), y lleva a la formación de dos tipos de nódulos diferentes: los determinados y los indeterminados (Patriarca *et al.*, 2004; Popp y Ott, 2011) (**Figura I.3**). Los nódulos determinados son redondeados y presentan un meristema apical que no es permanente. Por el contrario, los indeterminados son alargados y las células del cortex interno generan un meristema apical persistente (Ferguson *et al.*, 2010).

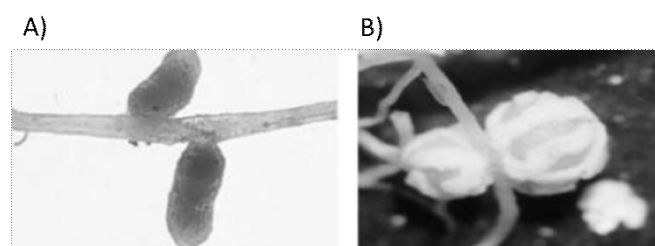


Figura I.3 Fotografías de nódulos en raíces de leguminosas. **A)** Nódulos indeterminados en raíces de *Leucaena leucocephala*; **B)** Nódulos determinados en raíces de poroto. Ambas plantas fueron inoculadas con *R. tropici*. Obsérvese la forma alargada de los nódulos indeterminados en comparación con la forma redondeada de los determinados. Lodeiro *et al.*, 2003.

El crecimiento de los nódulos determinados se basa en la expansión en lugar de la división celular, razón por la que presentan una morfología esférica en vez de cilíndrica (Hirsch, 1992). En el caso particular de nuestro sistema de estudio, *Bradyrhizobium diazoefficiens* – soja, los nódulos que se forman son determinados.

La última etapa de la infección es la invasión del nódulo por los rizobios y la formación del simbiosoma, dentro del cual los rizobios se diferencian a bacteroides. Una vez que los rizobios ingresan al citoplasma de la célula vegetal a través del hilo de infección alcanzan la corteza interior de la raíz, donde se observa que las bacterias son internalizadas por las células vegetales corticales. Esta internalización ocurre por medio de una endocitosis, en donde una o unas pocas bacterias quedan englobadas por la membrana vegetal oriunda del hilo de infección formando una vesícula que ingresa al citoplasma de la célula infectada. Una vez endocitadas, estas vesículas constituyen el denominado simbiosoma, y la membrana que las rodea se denomina membrana peribacterial (Bolaños *et al.*, 2004).

Durante la diferenciación a bacteroides, como ya mencionamos anteriormente, ocurren varios cambios en la bacteria. A nivel morfológico, el bacteroide es una célula más alargada, pierde el/los flagelos, se divide unas pocas veces (Kondorosi *et al.*, 2013), y comienza a expresar la enzima nitrogenasa, para dar comienzo a la reducción del N₂ atmosférico, y así transferir el N fijado a la planta.

Una característica relevante de esta interacción simbiótica entre rizobios y leguminosas es que la planta no forma un número ilimitado de nódulos, sino unos pocos. La regulación de la cantidad de nódulos totales formados se ejerce a nivel de los nódulos más tempranos, que van inhibiendo la formación de nódulos ulteriores (Caetano-Anollés y Gresshoff, 1991, Schauser *et al.*, 1999). El mecanismo que inhibe la formación de nuevos nódulos cuando la planta ya dispone de un cierto número de nódulos funcionales o de fuentes de N alternativas en el suelo, se basa en un sistema de retro-control en el cual participan señales controladas por la parte aérea que se activan como sistema de defensa (Krusell *et al.*, 2002).

Existen otros sistemas aún no del todo comprendidos que permiten a la planta regular la cantidad de nódulos que pueden formarse. En este sentido, las leguminosas pueden nutrirse tanto del N del suelo como del N atmosférico. Si estas plantas encuentran alguna fuente de N adecuada en el suelo (principalmente NO₃⁻) inhiben la nodulación y la infección rizobiana. Además, las leguminosas regulan la cantidad de nódulos totales que les permitan obtener una buena provisión de N, aun cuando la disponibilidad de N en el suelo sea baja y se requiera de la fijación biológica de N₂.

1.6 La importancia de la simbiosis con las leguminosas

Todas las leguminosas se caracterizan por presentar una alta acumulación de proteínas tanto en materia verde como en granos, lo cual las convierte en los cultivos con mayor demanda de N. En este sentido, la planta cubrirá estos requerimientos ya sea a partir del N del suelo producido por la mineralización de compuestos orgánicos o, en el caso de los suelos agrícolas, por los fertilizantes químicos. Esto conlleva a que los cultivos agrícolas se conviertan en grandes expoliadores de este nutriente, empobreciendo los suelos e incentivando al uso de fertilizantes nitrogenados que, como ya dijimos, causan grandes daños ambientales. Actualmente, y en pos de una agricultura sustentable, una

práctica común para evitar esta problemática es la inoculación de las semillas de leguminosas con suspensiones de rizobios activos para la nodulación (llamados biofertilizantes), que les brindan a las plantas compuestos nitrogenados obtenidos a partir de la fijación de N₂ atmosférico (Lodeiro, 2015).

Entre las leguminosas se destacan una serie de especies de gran interés agronómico, tales como los cultivos de soja, poroto, arveja, garbanzo, maní para la producción de grano, y las forrajeras alfalfa y trébol. Sin embargo, en Argentina la soja es el principal cultivo de leguminosas, ocupando 18 millones de hectáreas con un rinde nacional de 21,4 qq/H en la campaña 2017/2018 (<http://www.bolsadecereales.com/ver-cierre-de-campaña-105>). De esta manera, nuestro país es el tercer productor mundial de esta leguminosa, luego de Estados Unidos y Brasil, consolidándose como uno de los principales exportadores de este producto (<http://www.bolsadecereales.com/>; <https://inta.gob.ar/>). Sin embargo, el aumento de la producción en estos últimos años conlleva a que la cantidad de área de soja cultivable parece haber alcanzado un máximo (Lodeiro, 2015). Es así que para aumentar la producción de esta leguminosa es necesario aumentar la productividad por hectárea. De esta forma, la mejora de los inoculantes y su aplicación cobran preponderancia y son objeto de desarrollo agrobiotecnológico. En particular, la soja puede ser nodulada por un número reducido de especies de rizobios entre los que se encuentran *B. japonicum*, *B. diazoefficiens*, *B. elkanii* y *Ensifer fredii* (Delamuta *et al.*, 2013).

La inoculación de leguminosas con rizobios fijadores de N₂ se practica como un método de fertilización de bajo costo y bajo impacto ecológico, compatible con metodologías de agricultura sustentable. Sin embargo, los resultados de esta práctica suelen ser muy variables en términos de aumentos del rendimiento y la calidad de los cultivos. Se ha intentado mejorar genéticamente las cepas de rizobios utilizadas (Sadowski y Graham, 1998), las formulaciones y métodos de aplicación de los inoculantes (Smit, 1992; López-García *et al.*, 2009), así como también se ha intentado mejorar algunas de las especies de leguminosas para optimizar su asociación simbiótica con los rizobios (Herridge y Rose, 2000). Algunos de estos procedimientos, mejorando las formulaciones de inoculantes (López-García *et al.*, 2001 y Tesis Doctoral, 2004) y las metodologías de su aplicación (López-García *et al.*, 2002, Althabegoiti *et al.*, 2008; López-García *et al.*, 2009), han permitido mejoras en el aprovechamiento de la simbiosis. Sin embargo, también es

cierto que, a pesar de los esfuerzos, la respuesta a la inoculación en términos de rendimiento del cultivo dista de ser óptima. En este sentido, la presencia de poblaciones naturalizadas de rizobios competidores en diversos suelos donde se ha cultivado soja durante varios años constituye un formidable obstáculo para la efectividad con que los rizobios llevados por los inoculantes pueden ocupar un número significativo de nódulos de modo que se manifieste plenamente su capacidad fijadora de N_2 . Resultados precedentes en nuestro laboratorio sugirieron que sería posible aumentar la competitividad de los inoculantes si éstos se preparan con rizobios limitados en N. Los mismos mostraron una influencia positiva de las condiciones de inanición de N sobre las etapas tempranas de la interacción, la infectividad, la competitividad para nodular y la FBN entre nuestra bacteria de estudio *B. diazoefficiens* y las plantas de soja (López-García *et al.*, 2001; López-García, 2004).

Estos resultados motivaron nuestro interés en comprender cómo los sistemas específicos se activan y se regulan para adaptarse a la escasez de N en *B. diazoefficiens*, tanto en vida libre como en simbiosis, con el fin último de aprovechar racionalmente el efecto de dicha condición y, a futuro, intentar utilizar ese conocimiento adquirido en el desarrollo y formulación de mejores inoculantes para soja.

En lo que resta de este Capítulo desarrollaremos en más detalle las particularidades del metabolismo de N en las bacterias y en particular en los rizobios.

I.7 Metabolismo general del N en bacterias

Las bacterias son capaces de utilizar el N en cualquiera de sus formas: compuestos inorgánicos (NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^-), compuestos orgánicos como aminoácidos, así como también, el N_2 molecular. A pesar de la amplia variedad de compuestos nitrogenados que pueden metabolizar, el NH_4^+ es por excelencia la fuente nitrogenada preferida, ya que puede ser asimilado sin grandes requerimientos energéticos. La utilización de fuentes inorgánicas oxidadas en cambio, requiere como primer paso la reducción a NH_4^+ , seguido por la incorporación en metabolitos intracelulares, lo que conlleva un gran gasto de energía (Leigh *et al.*, 2007).

Las vías metabólicas de asimilación de N se pueden dividir en dos clases: las vías necesarias para captar y asimilar el N proveniente del medio extracelular, y las vías

biosintéticas de compuestos intracelulares. Cualquiera sea la vía en cuestión, el metabolismo de N en procariotas involucra la expresión coordinada de un gran número de enzimas y proteínas que integran complejas rutas metabólicas. El control de la expresión de dichas enzimas está determinado por la disponibilidad de N y C en el interior de la célula y se encuentran reguladas tanto a nivel transcripcional como a nivel postraduccional. Si bien los estudios más detallados hasta la fecha se han llevado a cabo con bacterias entéricas, existe gran cantidad de evidencias que demuestran que los sistemas de regulación de la asimilación de N descritos se extienden también a muchos otros géneros (Ninfa *et al.*, 2005; Leigh y Dodsworth, 2007).

Por otra parte, dado que el NH_4^+ es la fuente nitrogenada preferida y más utilizada por las bacterias, ya que aporta una mayor tasa de crecimiento que cualquier otra fuente de N, centraremos nuestra descripción en los mecanismos generales de la asimilación de este nutriente.

1.7.1 Ingreso del amonio al interior celular

El NH_4^+ se encuentra en equilibrio con el NH_3 , y se asume que el NH_3 es capaz de atravesar la mayoría (aunque no todas) de las membranas biológicas sin necesidad de una difusión mediada (Kikeri *et al.*, 1989; Andrade y Einsle, 2007).

Los microorganismos en general, no poseen sistemas que le permitan regular el ingreso o el egreso de NH_3 por difusión, pero sí poseen proteínas de membrana capaces de regular el ingreso de NH_4^+ . Esto ocurre ya que el NH_4^+ , debido a su carga, solamente puede cruzar las membranas biológicas por un mecanismo activo a través de una familia de transportadores altamente específicos que se denominan AmtB (por sus siglas en inglés *Ammonium transporter*).

Los transportadores AmtB (codificados por el gen *amtB*) son una familia de proteínas de membrana que se encuentran altamente conservados en varios organismos entre los que encontramos arqueas, bacterias, hongos y plantas (Thomas *et al.*, 2000a, b). Estos transportadores han sido descritos en varias especies bacterianas (Kleiner, 1985; Howitt *et al.*, 1986; Tatè *et al.*, 1998), sin embargo, el AmtB de *Escherichia coli* ha sido uno de los más estudiados (Thomas *et al.*, 2000a, b; Conroy *et al.*, 2007; Durand y Merrick, 2006; Boogerd *et al.*, 2011).

Este sistema de incorporación de NH_4^+ puede ser activado por varios factores: comúnmente puede activarse como consecuencia de las condiciones de limitación de N intracelular, como pueden ser la presencia de NO_3^- o glutamato como única fuente de N; o bien como un mecanismo para recuperar el NH_3 / NH_4^+ perdido; o para detectar la concentración de NH_4^+ extracelular (Udvardi *et al.*, 1992; Tatè *et al.*, 2001). Cuando las concentraciones de NH_4^+ en el exterior de la bacteria superan ampliamente los 10-20 mM, la síntesis de proteínas de captación de NH_4^+ se reprimen, presuntamente porque la difusión de NH_3 a través de la membrana se lleva a cabo lo suficientemente rápido para suplir las necesidades de N (Kleiner, 1981; Marini *et al.*, 1997).

La proteína AmtB de *E. coli* se ubica anclada a la membrana citoplásmica (Blakey *et al.*, 2002; Conroy *et al.*, 2004). Los primeros 22 residuos del AmtB de *E. coli* codifican un péptido señal (von Wiren y Merrick, 2004; Thornton *et al.*, 2006) que se escinde de la pre-proteína tras la inserción de la membrana para que la proteína madura contenga una topología con su extremo N-terminal en el exterior y su extremo C-terminal hacia el interior de la bacteria (von Wiren y Merrick, 2004; Zheng *et al.*, 2004; Khademi *et al.*, 2005).

Los AmtB que se han descrito hasta el momento son homotrímeros (**Figura I.4 – Panel A**), en los que cada subunidad está formada por 11 hélices transmembrana.

Los estudios realizados de la estructura de AmtB revelaron que el transporte se produce a través de un estrecho poro, principalmente hidrofóbico, ubicado en el centro de cada monómero que contiene dos histidinas altamente conservadas (H168 y H318) (Javelle *et al.*, 2004). A partir de datos de simulación, estructurales y energéticos junto con ensayos *in vivo* e *in vitro*, se ha encontrado un potencial sitio de unión al NH_4^+ de alta afinidad, lo que indica que el NH_4^+ es el sustrato reconocido por AmtB, y el NH_3 la especie transportada (**Figura I.4 – Panel B**) (Soupene *et al.*, 1998; Khademi *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2004; Javelle *et al.*, 2005; Liu y Hu, 2006).

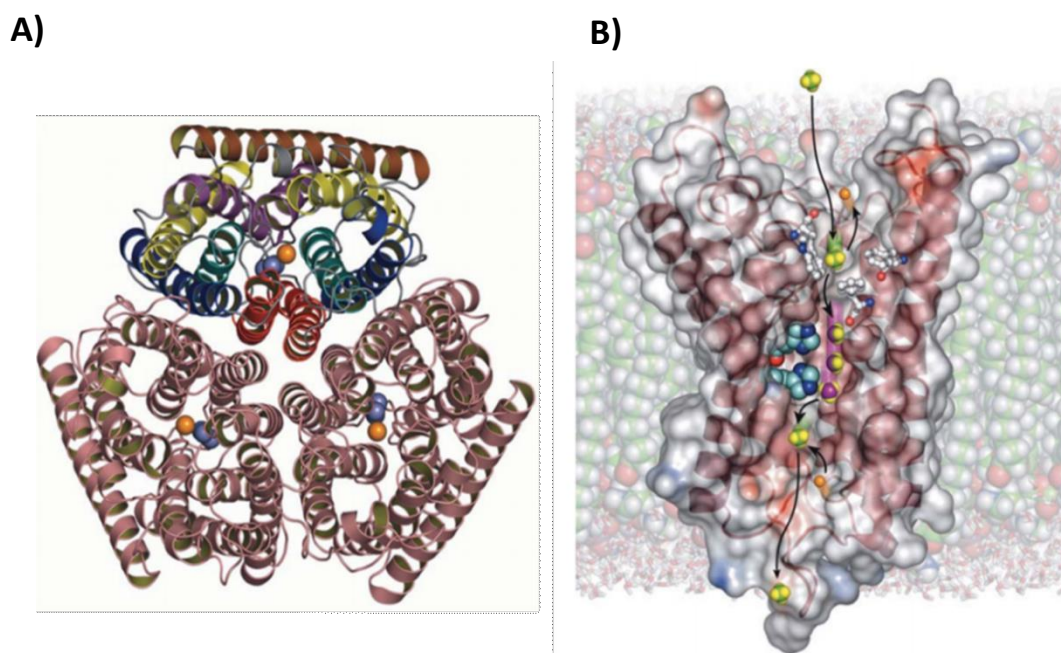


Figura I.4 Estructura tridimensional del transportador de amonio AmtB de *Escherichia coli*. **A)** En la figura se muestran las tres subunidades que conforman el transportador AmtB. En ella puede verse que cada subunidad se encuentra constituida por 11 hélices de transmembrana. La disposición que adoptan las 3 subunidades permiten la formación de un poro estrecho en el centro por donde ingresan las moléculas de NH_3 / NH_4^+ . Las esferas azules representan moléculas de NH_3 , mientras que las esferas naranjas representan los iones NH_4^+ . **B)** Mecanismo de conductancia del NH_3 . Las esferas verdes y violetas son átomos de N que se encuentran formando parte de moléculas de NH_4^+ o NH_3 , respectivamente. Las moléculas amarillas son los H^+ que intervienen en dichas moléculas, mientras que los protones libres se representan como esferas naranjas. El mecanismo de ingreso involucra un sitio extracelular que atrae las moléculas de NH_4^+ y un canal hidrofóbico que elimina el protón del NH_4^+ para convertirlo en NH_3 . En forma de NH_3 la molécula puede atravesar el canal. Una vez en el interior celular, el NH_3 es protonado nuevamente para convertirse en NH_4^+ y de esta manera ser utilizado en los diversos procesos metabólicos. Imágenes modificadas de Khademi y Stroud, 2005.

1.7.2 Vías de asimilación de amonio en bacterias

Una vez en el interior de la bacteria, el proceso mediante el cual se lleva a cabo la asimilación de NH_4^+ involucra un conjunto de enzimas que se encuentran ampliamente conservadas en la naturaleza. En particular, existen dos rutas metabólicas mediante las cuales se puede llevar a cabo el proceso de asimilación: aquella en la que interviene la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH; EC 1.4.1.3) o mediante el ciclo glutamina sintetasa (GS; EC 6.3.1.2) - glutamato sintasa (GOGAT; EC 1.4.1.3) (Zalkin *et al.*, 1998).

Como se puede ver en la **Figura I.5 - Panel A** la reacción catalizada por la GDH permite obtener una molécula de glutamato a partir de una molécula de NH_4^+ y una de α -cetoglutarato. Esta reacción no requiere ATP pero es redox dependiente, utilizando NADPH como cofactor. En algunos casos, esta enzima cataliza también la reacción inversa de desaminación oxidativa del glutamato para generar α -cetoglutarato y NH_4^+ . Por ello, el papel fisiológico de la GDH como enzima anabólica o catabólica está determinada por su especificidad de cofactor (NAD o NADH, NADP o NADPH).

Por otra parte, en el ciclo GS/GOGAT (**Figura I.5 - Panel B**) el NH_4^+ es incorporado en una molécula de glutamato en una reacción catalizada por la enzima GS para producir otro aminoácido con mayor contenido de N, la glutamina.

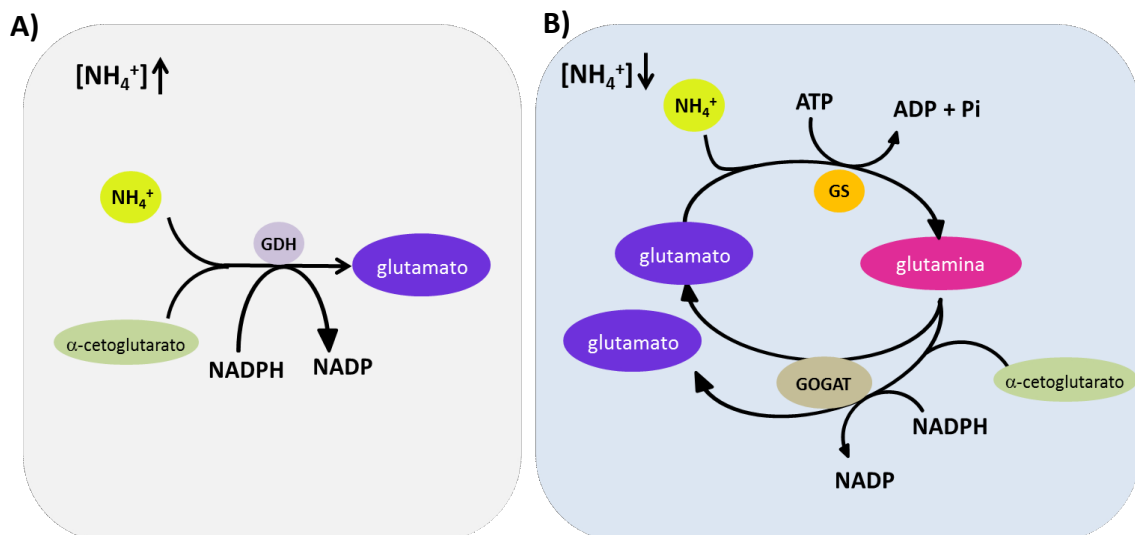


Figura I.5 Esquema de la asimilación de NH_4^+ en bacterias. La asimilación de dicho compuesto puede llevarse a cabo a partir de dos rutas metabólicas: **A)** aquella que involucra la acción catalítica la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) cuando la concentración de NH_4^+ en el medio extracelular es elevada, o **B)** mediante el ciclo glutamina sintetasa (GS) - glutamato sintasa (GOGAT) cuando el NH_4^+ se encuentra en bajas concentraciones. El producto final de cualquiera de estas vías metabólicas es el glutamato, compuesto a partir del cual se sintetizan los compuestos nitrogenados que la célula necesita.

A diferencia de la reacción catalizada por la GDH, la asimilación de NH_4^+ mediante la GS requiere de una molécula de ATP. La glutamina formada puede reaccionar con el α -cetoglutarato para dar como producto dos moléculas de glutamato en una reacción catalizada por la GOGAT, utilizando NADPH como cofactor (Reitzer, 2003; Lehninger *et*

al., 2005). Una de las moléculas de glutamato así producidas puede utilizarse en la biosíntesis de otros aminoácidos, pirimidinas y purinas, y la segunda molécula reingresa a este ciclo GS/GOGAT para incorporar una nueva molécula de NH_4^+ , y así mantener el ciclo.

La enzima GDH tiene una baja afinidad por el NH_4^+ , y en bacterias entéricas, como *E. coli* y *Salmonella*, esta enzima es la principal involucrada en la asimilación de NH_4^+ cuando este compuesto está en exceso, probablemente debido a que en dicha condición los niveles energéticos y de fuentes carbonadas son limitados. Por el contrario, el ciclo GS/GOGAT es la principal ruta de asimilación de NH_4^+ cuando el N es escaso ya que la GS posee una alta afinidad por dicho compuesto (Helling, 1994; Helling, 1998).

En bacterias como *Bacillus subtilis*, otras Gram positivas y en algunas proteobacterias como los rizobios, la GDH está ausente (Fisher y Sonenshein, 1991; Merrick y Edwards, 1995), por lo que la asimilación de NH_4^+ sólo se lleva a cabo mediante el ciclo GS/GOGAT.

1.7.3 Regulación de la asimilación de amonio

Dado que las enzimas GS/GOGAT son las principales proteínas encargadas de la asimilación de NH_4^+ en procariontes fundamentalmente en condiciones limitantes de dicho nutriente, es esperable que se encuentren finamente reguladas. En particular, la actividad de la enzima GS se encuentra inhibida por numerosos productos del metabolismo tales como alanina, glicina, serina, histidina, triptófano, adenosina monofosfato, citidina trifosfato, glucosamina-6-fosfato (Eisenberg *et al.*, 2000), que actúan como inhibidores competitivos, uniéndose al glutamato o al sitio activo de la proteína GS (Liaw *et al.*, 1993; Liaw *et al.*, 1994; Eisenberg *et al.*, 2000). Adicionalmente, esta enzima se encuentra regulada mediante modificación covalente. Esto se debe a que la proteína GS está formada por 12 subunidades que se ubican en forma de dos hexámeros contiguos, donde cada monómero puede ser regulado por adenilación reversible, siendo la enzima adenilada catalíticamente inactiva y por ende la enzima deadenilada, activa. Se ha reportado que el número de monómeros deadenilados indican el grado de activación de la enzima (Stadtman, 2001).

En su conjunto, la compleja regulación de la actividad GS en bacterias es llevada a cabo por una cascada de señalización denominada Sistema de Respuesta al Estrés por N (NSR

- por sus siglas en inglés Nitrogen Stress Response). Este sistema de regulación ha sido ampliamente estudiado en bacterias, principalmente en enterobacterias (Arcondéguy *et al.*, 2001; Rietzer, 2003; Dixon y Khan, 2004; Ninfa y Jiang, 2005; Forchhammer, 2007). En general, la NSR está compuesta por varias proteínas entre las que encontramos una uridiltransferasa/removasa (UTasa/UR) denominada GlnD, unas pequeñas proteínas triméricas llamadas PII (las cuales se subdividen en dos familias GlnK y GlnB), la proteína adenil-transferasa/removedora GlnE y el sistema de dos componentes integrado por la proteína histidina quinasa NtrB y su regulador de respuesta NtrC.

Se ha demostrado que la relación de las cantidades relativas de α -cetoglutarato y de glutamina en el interior de la célula son las que regulan específicamente la actividad de dichas proteínas (Ninfa *et al.*, 1995). Como ya hemos mencionado, el α -cetoglutarato y la glutamina son sustratos del ciclo GS/GOGAT e indican el balance metabólico entre el C y el N intracelular, por lo que la NSR resulta la principal cascada integradora del metabolismo de estos compuestos. Los principales sensores de la NSR son la UTasa/UR GlnD, la cual se encuentra regulada alostéricamente por la glutamina (Jiang *et al.*, 1999), y las proteínas de señalización PII que son uridiladas de manera reversible por GlnD cuando la concentración de glutamina intracelular es baja (Reitzer, 2003; Ninfa *et al.*, 2005). Además, las proteínas PII son reguladas alostéricamente por el α -cetoglutarato: la unión de α -cetoglutarato a las PII es un indicador de los niveles de compuestos carbonados disponibles (Forchhammer, 2007).

En particular, cuando la relación α -cetoglutarato / glutamina es alta, señal de limitación de N, la NSR se activa para aumentar la asimilación de NH_4^+ (**Figura I.6**). En este caso, GlnD detecta que la concentración de glutamina es baja y uridila el residuo Tyr51 (Y51) de las proteínas PII (Reitzer *et al.*, 2003; Ninfa *et al.*, 2005). De esta manera, las PII uridiladas (PII-UMP) desencadenan la activación del sistema de dos componentes NtrB/NtrC, por un mecanismo que implica la interacción entre PII y NtrB. Así, NtrB se autofosforila y transfiere el fosfato a NtrC. NtrC-P se asocia a secuencias específicas río arriba de promotores de varios genes que codifican funciones requeridas para la supervivencia en estas condiciones y que, en su conjunto, se denominan regulón Ntr (por su nombre en inglés: *Nitrogen regulated genes*) (Martin *et al.*, 1988; Burkovski, 2003; Dávalos *et al.*, 2004).

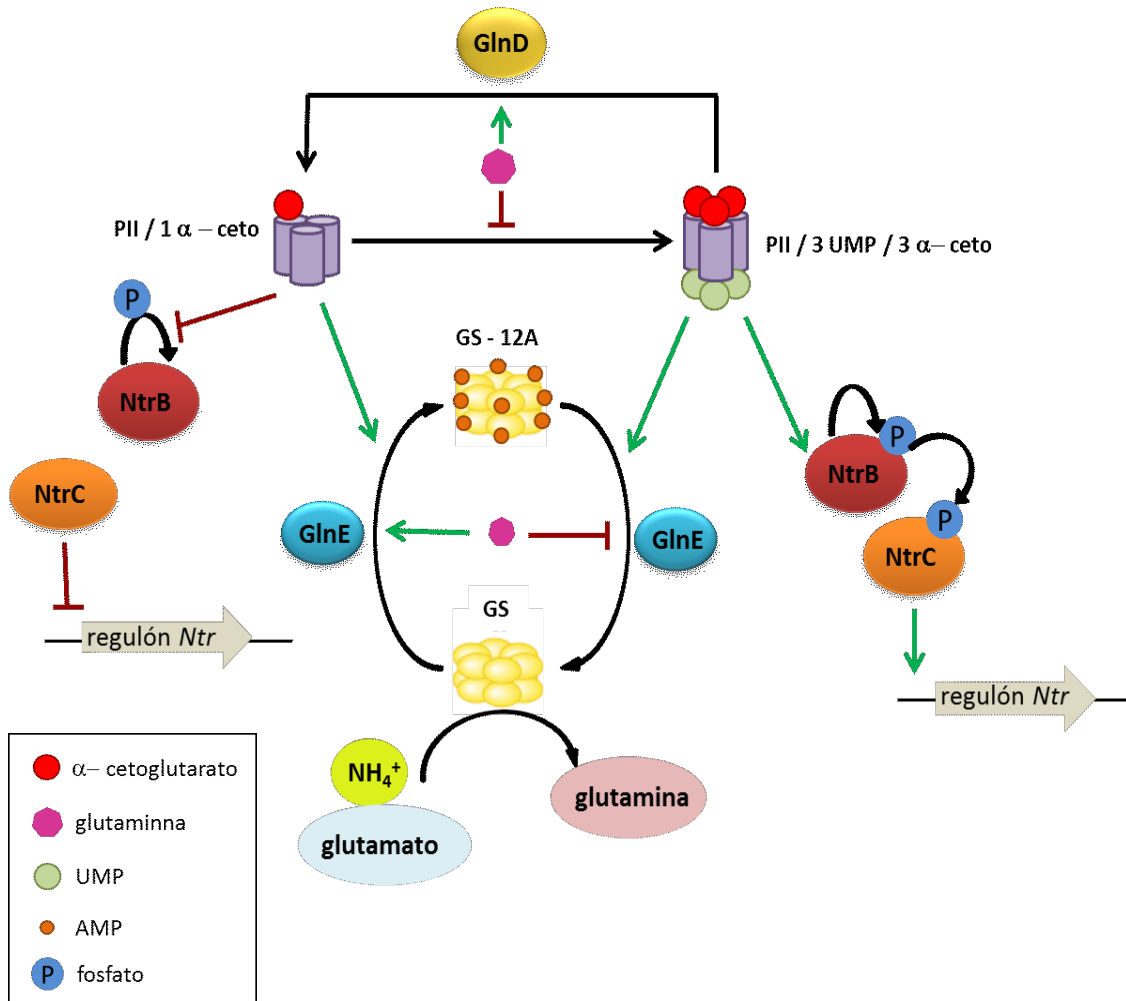


Figura I.6 Esquema general de la regulación de la asimilación de NH_4^+ en bacterias. Dentro de la célula la relación C/N se expresa como la relación α -cetoglutarato/glutamina. Cuando esta relación es alta, indicio de escasez de N, la proteína GlnD se activa y uridila a las proteínas PII. Las PII uridiladas (PII-UMP) interactúan con la enzima GlnE de manera tal que esta última adenila a la enzima GS activándola para catalizar la conversión de glutamato y NH_4^+ en glutamina. Paralelamente, cuando las proteínas PII son uridiladas se activa la proteína sensora NtrB, la cual se autofosforila y transfiere el grupo fosfato al regulador de respuesta NtrC. NtrC-P es el encargado de inducir la expresión de varios genes involucrados en el metabolismo del N (conocidos como el regulón *Ntr* por su nombre en inglés *Nitrogen regulated genes*) con el fin último de restablecer los niveles de glutamina intracelulares. Cuando la concentración de glutamina intracelular es elevada, lo que conlleva a una relación C/N baja, GlnD deuridila las proteínas PII. En estas condiciones, la interacción de estas proteínas con GlnE conduce a la adenilación de GS que se inactiva. Además, PII deuridilada es capaz de unirse a NtrB, inhibiendo su capacidad de autofosforilarse e impidiendo la transferencia del grupo fosfato al regulador de respuesta NtrC. De esta manera, se inhibe la expresión del regulón *Ntr*. Esta disminución de la actividad GS evita una excesiva remoción de α -cetoglutarato del Ciclo de Krebs. Las flechas verdes indican un efecto positivo mientras que las flechas en rojo indican una influencia negativa.

En paralelo, las PII uridiladas también son capaces de interactuar con la enzima adeniltransferasa/adenilremovasa GlnE de manera tal que esta última adquiere la conformación que le permite deadenilar a la enzima GS, activándola para catalizar la conversión de glutamato en glutamina. La enzima GlnE no ha sido muy estudiada en las bacterias en general, sin embargo, su mecanismo de interacción con las proteínas PII se ha descrito en detalle en *E. coli* (Jiang *et al.*, 2007). En esta bacteria, se ha reportado que GlnE posee un sitio de unión a glutamina y un sitio de unión para las proteínas PII. La unión de una molécula de glutamina y de PII deuridilada induce un cambio de conformación de GlnE que activa la función adeniltransferasa de esta enzima, la cual conduce a la inactivación de GS por adenilación de sus subunidades. Por el contrario, la ausencia de glutamina intracelular junto con la unión de PII uridilada y unida a moléculas de α -cetoglutarato, inducen a la conformación de GlnE que cataliza la deadenilación de GS, la cual adopta su forma activa.

Lo contrario ocurre cuando la relación α -cetoglutarato/glutamina es baja (**Figura I.6**). En este caso, en presencia de altos niveles intracelulares de glutamina, la activación de esta cascada de respuesta al estrés por N no es necesaria y GlnD estimula la deuridilación de las proteínas PII para mantener el sistema funcionando a un nivel basal, pero fundamentalmente apagado (Arcondéguy *et al.*, 2001).

En bacterias como *E. coli* se ha descrito que, en medios ricos en N, PII deuridilada es capaz de interactuar con NtrB (Atkinson y Ninfa, 1998). Durante esta interacción, NtrB adquiere una conformación que favorece su acción fosfatasa e inhibe su actividad quinasa (Ninfa y Magasanik, 1986; Keener y Kustu 1988; Kambervov *et al.*, 1994). De esta manera, la unión de PII a NtrB promueve la desfosforilación del regulador de respuesta NtrC, inhibiendo así la expresión de los genes involucrados en la asimilación de NH_4^+ y en el metabolismo del N (regulón Ntr).

I.8 Proteínas de señalización PII: integradoras de los flujos de C y N intracelular

Las proteínas PII son una familia de proteínas de señalización que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza incluyendo bacterias, arqueas, algas y plantas (Arcondéguy *et al.*, 2001; Sant'Anna *et al.*, 2009; Huergo *et al.*, 2013). Estas proteínas

pueden ser clasificadas dentro de 3 subfamilias denominadas GlnB, GlnK y Nifl, las cuales se encuentran codificadas por los genes *glnB*, *glnK* y *nifl* respectivamente (Arcondéguy *et al.*, 2001; Leigh y Dodsworth, 2007). Las proteínas de la subfamilia Nifl se encuentran en arqueas fijadoras de N y en algunas bacterias anaeróbicas, y su rol principal es controlar los procesos involucrados con la fijación de N₂ (Leigh y Dodsworth, 2007). Las proteínas Nifl son heterómeros y están compuestas por dos homólogos denominados Nifl1 y Nifl2, los cuales forman parte de dos subfamilias diferentes. Mediante análisis filogenéticos y estudios en la secuencia del T-loop de estas proteínas se ha demostrado que existe una gran diferencia entre ellas y las subfamilias GlnB y GlnK (Leigh y Dodsworth, 2007).

Por otra parte, GlnB y GlnK son proteínas mucho más cercanas entre sí, con un 60-70% de identidad, y con una amplia variedad de funciones que se centran en coordinar la regulación de procesos metabólicos. En particular, estas proteínas actúan como transmisoras de señales de los estados de C, N y energía intracelular (Commichau *et al.*, 2006). Dependiendo de estos estados, las proteínas pueden tomar diversas conformaciones, y según la conformación adoptada pueden interactuar con varias proteínas blanco, la mayoría de las cuales intervienen en la asimilación de N.

1.8.1 Estructura de las proteínas GlnB y GlnK

Mediante técnicas de cristalografía por rayos X, se ha determinado que las proteínas GlnB y GlnK se caracterizan por formar homotrímeros, donde cada subunidad es de 12-13 KDa con una estructura tridimensional altamente conservada (Arcondéguy *et al.*, 2001). Dentro de los trímeros, el cuerpo de cada subunidad es cilíndrico y contiene 3 bucles, denominados C-, B- y T-loop (**Figura I.7**). Los B- y C-loop son bucles más pequeños que sobresalen de las hendiduras de la subunidad, de modo que los bucles B y C de las subunidades adyacentes se enfrentan entre sí y forman parte de la unión de nucleótidos que permiten la formación de trímeros. Por su parte, el T-loop es un bucle prominente, cuya estructura es flexible en solución y es capaz de adoptar varias conformaciones que resultan vitales para las interacciones proteína-proteína (Xu *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2003; Sakai *et al.*, 2005; Yildiz *et al.*, 2007).

En particular, en el vértice del T-loop se encuentra el residuo Tyr51, el cual puede ser uridilado/deuridilado por la enzima GlnD (Reitzer, 2003; Ninfa y Jiang, 2005) para activar/desactivar la cascada NSR y así regular los niveles de C/N en el interior celular. El T-loop, como mencionamos anteriormente, es requerido para la interacción con diversas proteínas blanco. Incluso, se ha visto que en *E. coli*, la delección de los aminoácidos 47 al 53 resulta en la incapacidad de la proteína de activar la NSR (Jiang *et al.*, 1997).

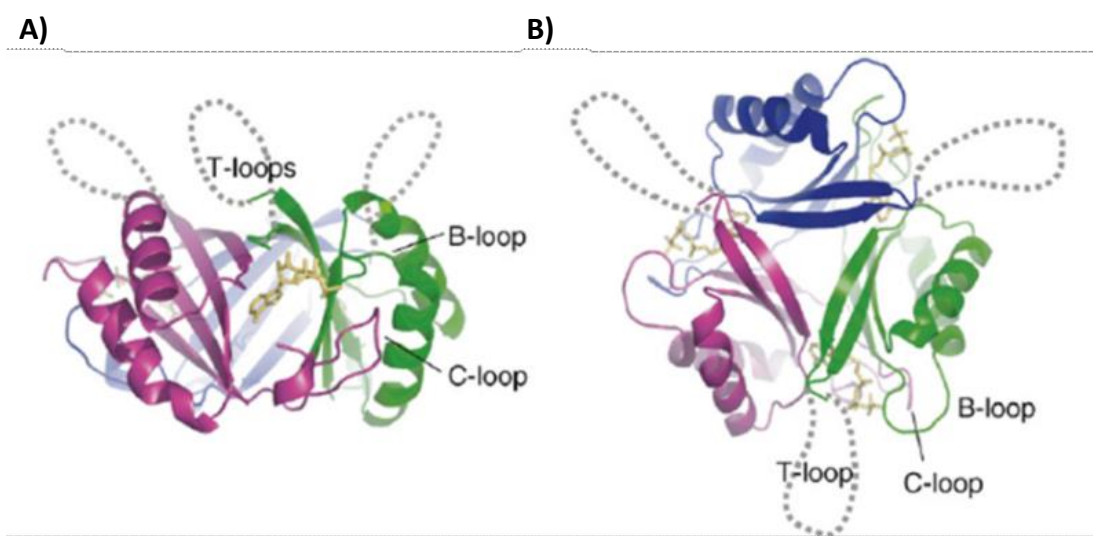


Figura I.7 Estructura de las proteínas PII. Diagrama de cinta de los trómeros de PII visto desde el lado **A)** o visto desde la parte superior en la cara de T-loop **B)**. Se muestra una proteína PII representativa de la estructura de la proteína GlnK de *E. coli* en complejo con ATP (Xu *et al.*, 1998). El ATP unido es amarillo. El T-loop flexible se indica mediante la línea de puntos gris y representa una estructura arbitraria en lugar de una conformación definida. Los dos bucles más pequeños (bucles B y C) sobresalen en las hendiduras de la subunidad, de modo que los bucles B y C de las subunidades adyacentes se enfrentan entre sí. Imagen modificada de Forchhammer, 2008.

Adicionalmente, también se ha observado en dicha bacteria que *in vivo* las proteínas PII son capaces de formar heterotrómeros adquiriendo propiedades diferentes de los homotrómeros. En particular, los homotrómeros formados únicamente por monómeros de GlnB son más eficientes que los homotrómeros de GlnK. Incluso, la presencia de un monómero de GlnK dentro de un heterotrómero disminuye la eficiencia de la función del mismo. Estos resultados sugieren que GlnK dentro de los heterotrómeros cumpliría el rol

de moderar la función de GlnB, permitiendo así una regulación fina de la actividad de estas proteínas (Forchhammer, 1999; van Heeswijk *et al.*, 2000).

1.8.2 Funciones de las proteínas PII

La mayoría de las bacterias y arqueas poseen dos copias de las proteínas PII: una copia de GlnB y una de GlnK; mientras que en las cianobacterias, algas y plantas hasta ahora solamente se ha descrito una única copia, semejante a la familia GlnB (Hsieh *et al.*, 1998; Arcondéguy *et al.*, 2001). Sin embargo, en algunos microorganismos como *Rhodospirillum rubrum*, *Haloferax mediterranei* o *Rhodopseudomonas palustris* es posible encontrar más de 2 homólogos: en general encontramos una copia de GlnB y dos copias de GlnK, usualmente denominadas GlnK1 y GlnK2 (también llamada GlnJ en otros microorganismos) (Zhang *et al.*, 2003; Connelly *et al.*, 2006; Pedro-Roig *et al.*, 2011). Lo llamativo de estos homólogos radica en su versatilidad funcional, siendo capaces de suplirse para llevar a cabo algunas funciones (Arcondéguy *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001; Gosztolai *et al.*, 2017) pero a su vez, teniendo roles y propiedades completamente diferentes en otras (Atkinson *et al.*, 1999; Arcondéguy *et al.*, 2001; Atkinson *et al.*, 2002; Blauwkamp *et al.*, 2002; Yurgel *et al.*, 2010). En este sentido, el rol que cumplen las proteínas PII ha sido muy bien caracterizado en microorganismos como *E. coli*, *Salmonella entérica*, *Klebsiella pneumoniae* o *Ensifer meliloti* (Porter *et al.*, 1995; Ninfa y Atkinson, 2000; Arcondéguy *et al.*, 2001; Yurgel *et al.*, 2008; Yurgel *et al.*, 2010; Yurgel *et al.*, 2011).

Como ya hemos mencionado a lo largo de este capítulo, una de las funciones principales de las proteínas PII es su participación dentro de la NSR, interactuando con la adeniltransferasa/adenilremovasa GlnE con el objetivo final de inactivar/activar a la enzima GS para mantener balanceados los niveles de C y N intracelular. A pesar de que ambas PII pueden llevar a cabo esta función, se ha observado que GlnK es al menos 40 veces menos eficiente que GlnB para activar la actividad adeniltransferasa de GlnE y así adenilar a GS (Atkinson *et al.*, 1999). Además, se ha demostrado que la deuridilación (inactivación) de GlnK de *E. coli* se lleva a cabo de manera mucho más lenta que la deuridilación de GlnB, lo que ha sido descrito como una ventaja para la bacteria. En caso que una bacteria encuentre repentinamente altas concentraciones de NH_4^+ , los

niveles de glutamina intracelular aumentarían y sería ventajoso para la bacteria ser capaz de deuridilar a GlnB a tiempo para detener la asimilación de NH_4^+ rápidamente (van Heeswijk *et al.*, 2000).

También se ha descrito que tanto GlnB como GlnK pueden interactuar con el sensor NtrB para regular la actividad del regulador de respuesta NtrC (van Heeswijk *et al.*, 1996; Atkinson *et al.*, 1998; Atkinson *et al.*, 1999). Esta unión, como describimos previamente, promueve la desfosforilación del regulador de respuesta NtrC, y así inhibe la expresión de los genes involucrados en la asimilación de NH_4^+ y en el metabolismo del N.

En el caso de *K. pneumoniae* y *R. rubrum*, bacterias fijadoras de N_2 en vida libre, se ha descrito que GlnB, pero no así GlnK1 o GlnK2, regula la acción de NifA, y de esta manera controla la expresión de los genes del operon *nif* que codifican el complejo enzimático de la nitrogenasa, responsable de convertir el N_2 atmosférico en NH_4^+ (He *et al.*, 1998; Jack *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000).

Finalmente, una de las funciones que más claramente diferencian a las proteínas de la familia GlnK de las de la familia GlnB es la interacción de GlnK, pero no así de GlnB, con las proteínas transportadoras de amonio AmtB (Javelle *et al.*, 2004; Forchhammer, 2008). En *E. coli* se ha demostrado que, *in vivo*, GlnK se une rápida y reversiblemente a AmtB en respuesta a un *shock* extracelular de NH_4^+ ($\geq 50 \mu\text{M}$). Esta interacción también se ha observado en otras bacterias como *Bacillus subtilis*, *Azospirillum brasilense* y *Corynebacterium glutamicum* (Coutts *et al.*, 2002; Detsch y Stulke, 2003; Strosser *et al.*, 2004; Huergo *et al.*, 2006). Además, estudios evolutivos sugieren que dicha función es ancestral (Javelle y Merrick, 2005), y se cree que la disposición génica conservada del gen *amtB*, ubicado en los genomas bacterianos río abajo de *glnK* y generalmente formando un operón con este último (Thomas *et al.*, 2000a), es debido a esta función.

Como se muestra en la **Figura I.8** se ha demostrado que la interacción entre GlnK y AmtB ocurre cuando, bajo condiciones de exceso de N intracelular, el T-loop de GlnK ingresa e interacciona con el poro hidrofóbico de AmtB para bloquear el ingreso de NH_4^+ a la célula. Por el contrario, cuando los niveles de N intracelular son limitados, GlnK se encuentra principalmente uridilada y, debido a que dicha modificación ocurre en el extremo del T-loop, no puede interactuar con los transportadores AmtB y por ende, el NH_4^+ puede ingresar al interior celular (van Heeswijk *et al.*, 2013).

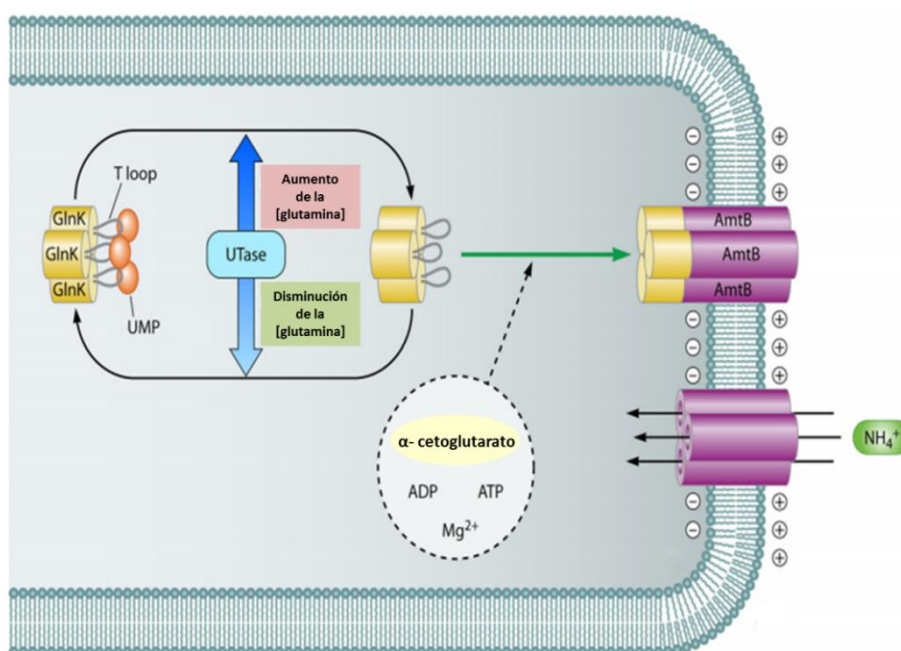


Figura I.8 Modelo de la regulación de la actividad AmtB por GlnK en *E. coli*. El transportador de amonio trimérico AmtB y la proteína reguladora trimérica GlnK se inducen en *E. coli* bajo condiciones limitadas de N. La parte inferior derecha de la figura muestra que cada uno de los tres canales de AmtB puede trasladar el NH_4^+ desde el exterior al interior. Cada uno de los monómeros de GlnK alberga un T-loop que sobresale de la parte superior de la estructura en forma de barril (a la izquierda de la flecha verde). Cada uno de los bucles encaja profundamente en el vestíbulo citoplásmico de cada uno de los canales del transportador AmtB trimérico (a la derecha de la flecha verde). La unión de los trímeros de GlnK y AmtB hace que el transporte de NH_4^+ se encuentre bloqueado. La parte superior izquierda de la figura muestra que bajo concentraciones de glutamina intracelular alta o baja, la enzima bifuncional UTasa cataliza la deuridilación o uridilación (es decir, la eliminación covalente o el acoplamiento de grupos UMP) de las puntas de los T-loop de los trímeros de GlnK. La unión de GlnK-UMP a AmtB ya no es posible, ya que los grupos voluminosos de UMP impiden la inserción de los T-loop en los portales citoplásmicos de los canales AmtB. La parte media inferior de la figura muestra que la formación de complejos entre AmtB y GlnK se ve afectada por los metabolitos α -cetoglutarato, ATP, y ADP y por el catión Mg^{2+} . Figura modificada de van Heeswijk *et al.*, 2013.

Como hemos mencionado anteriormente, las proteínas PII poseen una amplia variedad de funciones y proteínas blanco. Llamativamente, se ha observado que, dependiendo del microorganismo estudiado, GlnB y GlnK pueden sustituirse en ciertas funciones. Incluso, aquella función que es llevada a cabo por GlnB en un determinado microorganismo, puede ser llevada a cabo por GlnK en otro, y viceversa. En la **Tabla I.1** se muestra un breve resumen de los fenotipos observados al analizar cepas mutantes en las distintas PII en algunas de las bacterias estudiadas, que nos dan una idea de la función que cada PII podría estar llevando a cabo en los diversos microorganismos.

Tabla I.1 Principales fenotipos observados al analizar cepas mutantes en las distintas proteínas PII en bacterias

Bacteria	Cepa	Crecimiento	Actividad GS	Simbiosis - Fijación de N ₂	Otras características	Ref.
<i>Escherichia coli</i>	<i>ΔglnK</i>	<p>Crece igual a la cepa salvaje en presencia de NH₄⁺.</p> <p>Si se cultiva primero en limitación de N y después se agrega NH₄⁺ al medio de cultivo la mutante no sobrevive.</p>			<p>Pierden la viabilidad más rápido que la cepa salvaje.</p>	Blauwkamp y Ninfa, 2002
	Salvaje				<p>GlnK es menos efectiva que GlnB.</p> <p>La deuridilación de GlnK es 10 veces más lenta que la de GlnB.</p>	
<i>Ensifer meliloti 1021</i>	<i>ΔglnK</i>	Igual a la cepa salvaje.	<p>Igual a la cepa salvaje tanto en medios con exceso como con limitación de N.</p>	Igual a la cepa salvaje.	<p>No afecta la expresión de <i>glnII</i> (GSII).</p> <p>En medios con glutamato (limitados en N) la mayoría de GSI está adenilada (INACTIVA) a diferencia de la cepa salvaje donde se encuentra deadenilada.</p>	Yurgel <i>et al.</i> , 2008; Yurgel <i>et al.</i> , 2010; Yurgel <i>et al.</i> , 2011
	<i>ΔglnB</i>	Igual a la cepa salvaje.	<p>Gran aumento de la actividad en medios con exceso de N.</p> <p>Igual a la cepa salvaje en medios con escasez de N.</p>	Igual a la cepa salvaje.	<p>Altos niveles de expresión de <i>glnII</i> (GSII).</p> <p>En medios con glutamato la mayoría de GSI está adenilada (INACTIVA), a diferencia de la cepa salvaje donde se encuentra deadenilada.</p>	

Tabla I.1 Continuación

<p><i>Ensifer meliloti</i> 1021</p>	<p><i>ΔglnK</i> <i>ΔglnB</i></p>	<p>Crece más lento que la cepa salvaje.</p>	<p>Aumenta en medios con exceso de N y disminuye en medios limitados en relación a la cepa salvaje.</p>	<p>Igual a la cepa salvaje.</p>	<p>En medios con glutamato (limitados en N) la mayoría de GSI se encuentra adenilada.</p>	
<p><i>Ensifer meliloti</i> 2011</p>	<p><i>ΔglnB</i></p>	<p>Crece más lento que la cepa salvaje en medios ricos o sintéticos con NH₄⁺ como única fuente de N.</p>	<p>La adenilación de GSI ocurre más lento que en la cepa salvaje cuando le agregan NH₄⁺ a un cultivo crecido en glutamato.</p>	<p>Nif* (actividad nitrogenasa). Menor número de nódulos. Nódulos heterogéneos (algunos normales otros pseudonódulos). Menor peso seco. Menor fijación de N₂. Deformación en la punta de las raíces. Menos eficientes para infectar nódulos. Menor ocupación de nódulos (sólo por zonas)</p>	<p>La expresión de <i>glnII</i> (GSI) es estrictamente dependiente de GlnB. En condiciones de limitación de N, GlnB es requerido para inducir la expresión de <i>glnA</i> (GSI). GlnB se induce en condiciones de escasez de N y depende del regulador de respuesta NtrC.</p>	<p>Arcondéguy <i>et al.</i>, 1997</p>
<p><i>Rhizobium leguminosarum</i></p>	<p><i>ΔglnB</i></p>	<p>No crece cuando se utiliza NO₃⁻ como única fuente de N. En los demás medios (con NH₄⁺) crece más lento que la cepa salvaje.</p>	<p>Menor actividad tanto en escasez como en exceso de N.</p>	<p>Igual a la cepa salvaje.</p>	<p><i>glnII</i> y el operón <i>glnBA</i> se expresan constitutivamente. Se ve menos proteína GSI mientras que GSI se encuentra tanto en exceso como en limitación de N.</p>	<p>Amar <i>et al.</i>, 1994</p>

Tabla I.1 Continuación

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>ΔglnK</i>			Nif (no tiene actividad nitrogenasa).	GlnK pero no GlnB regula la actividad del activador transcripcional NifA y de su regulador NifL (reguladores de la expresión de los genes requeridos para la fijación de N ₂).	Arcondéguy <i>et al.</i> , 1999
<i>Azospirillum brasilense</i>	<i>ΔglnB</i>	Excreta NH ₄ ⁺ cuando crece en medio mínimo con NO ₃ ⁻ .		Nif (no tiene actividad nitrogenasa).	Afecta el swarming. Halos de menor diámetro que la cepa salvaje.	de Zamaroczy, <i>et al.</i> , 1993
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	<i>ΔglnB</i>			La expresión de los genes <i>nif</i> está completamente ausente.		Zhang <i>et al.</i> , 2001
	<i>ΔglnB</i> <i>ΔglnK</i>	Crece poco, tanto en medio mínimo como en medio rico en N.				

1.8.3 Regulación de las proteínas PII mediante moléculas indicadoras del estado intracelular

Las proteínas PII se consideran proteínas integradoras de señales. Varios trabajos han reportado que la señal clave del estado del N intracelular es la concentración de glutamina, mientras que la señal clave para el estado de los niveles de C es el α-cetoglutarato (Senior, 1975; Engleman y Francis, 1978; Jiang *et al.*, 1998).

Además de sensar la relación C/N, las proteínas PII son capaces de unirse directamente a moléculas efectoras tales como ATP, ADP y α-cetoglutarato (Atkinson *et al.*, 1994; Carr *et al.*, 1996; Arcondéguy *et al.*, 2000; Andrade *et al.*, 2005). En este sentido, dentro de los trímeros, en los huecos intersubunidades, encontramos 3 sitios de unión a ATP, uno en cada subunidad. Por su parte, los 3 sitios de unión al ATP muestran una cooperatividad negativa y pueden ser ocupados por moléculas de ADP de manera

competitiva (Carr *et al.*, 1996). Además, la afinidad por las moléculas de ATP aumenta en presencia de moléculas de α -cetoglutarato, mientras que en esta condición la afinidad por las moléculas de ADP disminuye (Jiang y Ninfa, 2007). Cuando el ATP se une a las PII (junto con moléculas de Mg), los T-loop asumen una conformación compacta en la cual se crea un sitio de unión al α -cetoglutarato en el vértice de cada T-loop, generando de esta manera 3 sitios de unión al α -cetoglutarato (Yildiz *et al.*, 2007).

En *E. coli* se ha demostrado que concentraciones micromolares de α -cetoglutarato y ATP son necesarias para que GlnB lleve a cabo correctamente sus funciones, es decir, para que se uridile/deuridile (Arnesano *et al.*, 2003; Sugiyama *et al.*, 2004), para interactuar con NtrB (Mizuno *et al.*, 2007) y para estimular la actividad de la enzima GlnE que lleva a la deadenilación de la enzima GS (Ferrario-Mery *et al.*, 2005). Sin embargo, también se ha visto que cuando los niveles de α -cetoglutarato son muy elevados (milimolares) GlnB de *E. coli* se inhibe. En este caso, las altas concentraciones de α -cetoglutarato aumentan el estado de fosforilación de NtrC, causado por la inhibición de la interacción de GlnB con NtrB, lo que permite que éste último fosforile a NtrC (Arnesano *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2006; Mizuno *et al.*, 2007). De igual manera, a concentraciones altas de α -cetoglutarato, también se ve inhibida la función de las PII de activar la adeniltransferasa/adetilremovasa GlnE (Ferrario-Mery *et al.*, 2005).

En el caso de GlnK se ha visto que su unión a ATP y α -cetoglutarato impide la formación de la conformación necesaria que debe adoptar el T-loop para ingresar a los canales de amonio AmtB. Además, el α -cetoglutarato pareciera actuar como repelente del AmtB en la superficie de GlnK (Durand y Merrick, 2006; Wolfe *et al.*, 2007). En este sentido, la unión de moléculas de α -cetoglutarato a las proteínas GlnK provocaría un impedimento estérico para que dichas proteínas interactúen físicamente con los transportadores de amonio.

En la **Tabla I.2** se pueden observar las distintas proteínas blanco sobre las que actúan las PII según los diversos microorganismos estudiados y el efecto que produce la alta concentración de α -cetoglutarato en la interacción PII-proteína blanco.

Tabla I.2 Proteínas blanco de GlnB y GlnK y efectos del α -cetoglutarato en la asociación PII-proteína blanco. Tabla modificada de Leigh y Dodsworth, 2007.

Organismo	Grupo filogenético	Tipo de PII	Blanco directo (efecto en el blanco)	Efecto de las altas concentraciones de α -cetoglutarato en la asociación PII-proteína blanco	Ref.
<i>Escherichia coli</i>	γ -Proteobacteria	GlnB	NtrB, ATase (adenilación de GS)	Inhibición (cooperatividad negativa)	Ninfa y Jiang, 2005
<i>Escherichia coli</i>	γ -Proteobacteria	GlnB-UMP	ATase (deadenilación de GS)	Ninguno	Ninfa y Jiang, 2005
<i>Escherichia coli</i> , <i>Azotobacter vinelandii</i>	γ -Proteobacteria	GlnK	AmtB (inhibición)	Inhibición	Coutts <i>et al.</i> , 2002; Javelle <i>et al.</i> , 2004 Javelle <i>et al.</i> , 2005; Durand <i>et al.</i> , 2006
<i>Azospirillum brasilense</i>	α -Proteobacteria	GlnB, GlnZ	AmtB, DRAG	No determinado	Huergo <i>et al.</i> , 2006
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	γ -Proteobacteria	GlnK y GlnK-UMP	NifL (inhibición del antagonismo de NifA)	No determinado	He <i>et al.</i> , 1998; Jack <i>et al.</i> , 1999
<i>Azotobacter vinelandii</i>	γ -Proteobacteria	GlnK	NifL (Estimulación del antagonismo de NifA)	Estimulación	Little <i>et al.</i> , 2000; Little <i>et al.</i> , 2002; Rudnick <i>et al.</i> , 2002
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	α -Proteobacteria	GlnB, GlnJ	DRAT	No determinado	Pawlowski <i>et al.</i> , 2003
<i>Rhodobacter capsulatus</i> , <i>Rhodospirillum rubrum</i>	α -Proteobacteria	GlnB-UMP	NifA (Estimulación)	No determinado	Pawlowski <i>et al.</i> , 2003; Zhang <i>et al.</i> , 2005; Zhu <i>et al.</i> , 2006
<i>Synechococcus</i> , <i>Synechocystis</i>	Cianobacteria unicelular	PII (GlnB)	N-acetylglutamate (NAG) quinasa (estimulación)	Inhibición	Heinrich <i>et al.</i> , 2004; Maheswaran <i>et al.</i> , 2004
<i>Synechococcus</i>	Cianobacteria unicelular	PII y PII-UMP	PipX (coactivador de NtcA, Inhibición)	Inhibición	Espinosa <i>et al.</i> , 2006
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Gram positiva con alto GC	GlnK	AmtB (Inhibición)	No determinado	Strosser <i>et al.</i> , 2004
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Gram positiva con alto GC	GlnK-UMP	AmtR (represor transcripcional, inhibición que produce desrepresión)	No determinado	Beckers <i>et al.</i> , 2005
<i>Bacillus subtilis</i>	Gram positivas con bajo GC	GlnK	AmtB, TnrA	Inhibición moderada(ATP ejerce una marcada inhibición)	Heinrich <i>et al.</i> , 2006
<i>Methanosarcina mazei</i>	Euryarchaeota	GlnK	GS (inhibición)	Inhibición	Ehlers <i>et al.</i> , 2005

Resumiendo, la unión de los diversos ligandos a las proteínas PII afecta la conformación de las mismas. De esta manera, se modulan las interacciones proteína-proteína y por ende la función que estas llevan a cabo. Gracias a esto, como ya hemos mencionado, las proteínas PII son las principales proteínas que interconectan los estados intracelulares de C, N y energía.

I.9 Metabolismo del N en los rizobios

Como parte de la microflora de los suelos agrícolas, a menudo los rizobios se encuentran limitados en uno o más nutrientes, y ésta es una condición señalada por algunas evidencias como posible favorecedora de su asociación simbiótica con las leguminosas. En este contexto, como ya hemos mencionado anteriormente, la simbiosis fijadora de N_2 sólo tiene lugar en ambientes pobres en N combinado (como NO_3^- y NH_4^+). Por lo tanto, es esperable que estos microorganismos estén adaptados a captar y asimilar el N presente en bajas concentraciones en su entorno.

Los rizobios en vida libre, pueden utilizar como fuentes nitrogenadas aminoácidos, NO_3^- , NO_2^- y principalmente NH_4^+ (Merrick y Edwards, 1995; Marzluf, 1997). El NH_4^+ junto con el glutamato y la glutamina son dadores clave de N para las reacciones biosintéticas de prácticamente todos los microorganismos.

A diferencia de otros microorganismos, los rizobios en vida libre asimilan NH_4^+ únicamente a partir del ciclo GS/GOGAT, debido a que carecen de la enzima GDH (Ludwig, 1978; Howitt y Gresshoff, 1985; Mendoza *et al.*, 1995; Patriarca *et al.*, 2002).

En *B. diazoefficiens*, la enzima GOGAT está formada por 2 subunidades no idénticas: una subunidad grande codificada por el gen *gltB* (ORF blr7743) y otra pequeña codificada por el gen *gltD* (ORF blr7744). Aún no se conoce con exactitud la regulación de GOGAT en *B. diazoefficiens* en vida libre. Sin embargo, en algunas bacterias como *Rhizobium phaseoli* o *E. coli* se ha reportado que la actividad de dicha enzima está regulada por las concentraciones de glutamato y es inhibida por la presencia de ácidos orgánicos (Miller *et al.*, 1972; Bravo y Mora, 1987). Además, algunos estudios sugieren que la actividad de esta enzima es esencial para el desarrollo de bacteroides y para la fijación biológica de N_2 (Castillo *et al.*, 2000; Mulley *et al.*, 2011).

En relación a la enzima GS, los rizobios poseen más de una isoforma de esta proteína, a diferencia de las enterobacterias que sólo tienen una. En particular, en *B. diazoefficiens* se han descrito dos isoformas de esta enzima: glutamino sintetasa I (GSI) y glutamino sintetasa II (GSII). En relación a GSI, esta proteína se encuentra codificada por el gen *glnA* (ORF blr4949), es una enzima termoestable, se expresa de manera constitutiva (Carlson *et al.*, 1987) y posee 12 subunidades idénticas de 59 kDa. Esta enzima es muy similar a otras GS procariotas, y como ya describimos en esta introducción, está regulada por el estado de adenilación de cada subunidad, siendo inactiva la enzima totalmente adenilada (Darrow y Knotts, 1977; Darrow *et al.*, 1980). Por su parte, GSII se encuentra codificada por el gen *glnII* (ORF blr4169) y su estructura es similar a las GS eucariotas (Carlson *et al.*, 1986), incluso se cree que esta isoforma fue adquirida de las plantas por transferencia genética entre procariota y eucariota (Carlson *et al.*, 1986). GSII consta de 8 subunidades de aproximadamente 36 kDa y se ha descrito como una proteína sensible a temperaturas mayores de 50 °C. A diferencia de GSI, en *B. diazoefficiens* no se ha descrito una regulación postraducciona, sino que GSII se encuentra regulada a nivel de expresión según la disponibilidad de N y la concentración de O₂ como describiremos más adelante (Darrow y Knotts, 1977; Rao *et al.*, 1978; Darrow *et al.*, 1980; Carlson *et al.*, 1987; Carlson *et al.*, 1989).

En otras especies de rizobios como *R. leguminosarum* o *E. meliloti*, existe una tercer isoforma denominada GSIII, que se encuentra codificada por el gen *glnT*. Se ha demostrado que GSIII posee una baja afinidad por el NH₄⁺ y por el glutamato, lo que conduce a pensar que probablemente la síntesis de glutamina (función principal de una glutamino sintetasa), en este caso, sea una función secundaria de esta isoforma (Shatters *et al.*, 1993). Incluso, en *E. meliloti* la isoforma GSIII solamente se ve expresada en mutantes $\Delta glnA\Delta glnII$, que carecen de las isoformas GSI y GSII (Espín *et al.*, 1990; Chiurazzi *et al.*, 1992; Espín *et al.*, 1992; Shatters *et al.*, 1993).

Cabe mencionar que en otros organismos se ha descrito otra isoforma de GS, que también se la ha denominado GSIII, pero que tiene características diferentes a la GSIII mencionada anteriormente. Esta isoforma se identificó inicialmente en *Bacteroides fragilis* (Hill *et al.*, 1989), y genes homólogos han sido identificados en *Butyrivibrio fibrisolvens* (Goodman y Woods, 1993) y la cepa *Synechocystis* PCC 6803 (Reyes y Florencio, 1994). Esta enzima es un hexámero con una subunidad de masa molecular de

75 kDa, pero no se ha caracterizado ampliamente. La secuencia de aminoácidos de GSIII es diferente de la de GSI o GSII, aunque se han observado varias regiones conservadas alrededor del sitio activo.

Es interesante señalar que, a pesar que se ha descrito la existencia de más de una isoforma de GS en bacterias, el rol que cumplen cada una de ellas aún no se ha podido dilucidar. En la **Tabla I.3** se muestran algunos de los fenotipos observados para diversas cepas mutantes en las GS de rizobios donde se ha intentado establecer su función.

Tabla I.3 Características simbióticas y de crecimiento de cepas de rizobios mutantes en las enzimas glutamino sintetasa. Modificada de Espín *et al.*, 1994

Cepa	Fenotipo	Crecimiento en		Propiedades simbióticas		Referencias
		NH ₄ ⁺	glutamato + NH ₄ ⁺	Nodulación	Fijación	
<i>R. etli</i>	Salvaje	+	+	+	+	Moreno <i>et al.</i> , 1991
	<i>glnA</i>	+	+	+	+/-	Moreno <i>et al.</i> , 1991
	<i>glnII</i>	+/-	+/-	+	+	Espín <i>et al.</i> , 1994
	<i>glnT</i>	+	+	+	+	Espín <i>et al.</i> , 1994
<i>E. meliloti</i>	Salvaje	+	+	+	+	de Bruijn <i>et al.</i> , 1989
	<i>glnA</i>	+	+	+	+	de Bruijn <i>et al.</i> , 1989
	<i>glnII</i>	+	+	+	+	Keister <i>et al.</i> , 1987; de Bruijn <i>et al.</i> , 1989
	<i>glnT</i>	+	+	+	+	Keister <i>et al.</i> , 1987; de Bruijn <i>et al.</i> , 1989
<i>B. diazoefficiens</i>	Salvaje	+	+	+	+	Carlson <i>et al.</i> , 1987
	<i>glnA</i>	+	+	++	++	Carlson <i>et al.</i> , 1987
	<i>glnII</i>	+	+	++	++	Carlson <i>et al.</i> , 1987
	<i>glnAglnII</i>	-	-	-	-	Carlson <i>et al.</i> , 1987

Curiosamente en *E. meliloti*, que además de GSI y GSII posee la isoforma GSIII, el doble mutante en *glnA-glnII* induce e invade nódulos normales durante la simbiosis, mientras que la misma mutación en *B. diazoefficiens* afecta severamente la nodulación (Carlson *et al.*, 1987). Estos resultados, al parecer contradictorios, podrían explicarse si una misma isoforma de GS posee funciones diferentes según la cepa estudiada.

Mediante estudios transcriptómicos y proteómicos se encontró que tanto GSI como GSII se encuentran presentes en bacteroides aislados de *B. diazoefficiens* (Delmotte *et al.*, 2010). Incluso, Brown y Dilworth (1975) demostraron la presencia de actividad GS en bacteroides de varias especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. Sin embargo, los valores de actividad de dichas enzimas resultaron muy bajos en los bacteroides mientras que en el citosol de las células vegetales se detectaron actividades elevadas tanto de GS como de GOGAT (Brown y Dilworth, 1975; Kurz *et al.*, 1975; Cullimore y Bennett, 1991; Temple *et al.*, 1998). Probablemente esto ocurre debido a que, como mencionamos anteriormente, la mayor parte del NH_4^+ obtenido a partir de la fijación del N atmosférico es transferido a la célula vegetal en donde es convertido a aminoácidos y luego transportados por el xilema de la planta. Incluso, se ha sugerido que estos aminoácidos podrían reingresar al bacteroide para ser utilizados por el mismo (Prell y Poole, 2006).

1.9.1 Mecanismos de regulación de las GS en B. diazoefficiens

Dada la relevancia de la enzima GS en la asimilación de NH_4^+ , el estudio de las isoformas de esta enzima y la manera en que son reguladas resulta de gran interés.

Como ya mencionamos, en *B. diazoefficiens* la transcripción del gen *glnA* es constitutiva cualquiera sea la condición del medio en el que se encuentre la bacteria (Carlson *et al.*, 1985). En particular, Martin y col. (1989) observaron que *glnA* se transcribe a partir de promotores en tándem que producen un transcripto más largo que incluye *glnBglnA* (*glnB* se encuentra ubicado de manera adyacente y río arriba de *glnA*, y codifica la proteína PII: GlnB) y otro más corto donde sólo se encuentra *glnA*. Además, pudieron determinar que río arriba de *glnB* existen dos promotores que se regulan de manera diferencial según el estado de N intracelular. Uno de los promotores es expresado en condiciones de deficiencia de N, y la inducción de su expresión es dependiente de NtrC (Martin *et al.*, 1989); mientras que el otro promotor, se expresa en condiciones de

suficiencia de N, y es reprimido por NtrC (Martin *et al.*, 1989). La presencia de promotores en tándem se observa comúnmente cuando un gen de expresión constitutiva, en este caso *glnA*, requiere ser regulado específicamente bajo alguna condición en particular. Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito las condiciones que activan o reprimen el promotor independiente de dicho gen. Es interesante señalar, que la disposición génica de *glnA* en operón con *glnB*, difiere de la descrita para *E. coli*, donde *glnA* forma un operón con los genes *ntrBC*. Sin embargo, la regulación de la transcripción parece ser muy similar, actuando dos promotores según la disponibilidad de N y además con la intervención de NtrC.

Por otro lado, a diferencia de *glnA*, *glnII* en *B. diazoefficiens* se encuentra regulado a nivel de expresión, a partir de un único promotor (Carlson *et al.*, 1987), según la disponibilidad de la fuente de N (Darrow, 1980; Carlson *et al.*, 1987; Martin *et al.*, 1988). Bajo condiciones aeróbicas, cuando el N intracelular se encuentra limitado, la expresión de *glnII* es inducida a través del regulador de respuesta NtrC cuando éste se encuentra fosforilado (Carlson *et al.*, 1987).

La isoforma GSI, debido a su similitud con las demás GS procariontas, posee un sistema de regulación post-transcripcional que involucra un proceso de adenilación reversible que ya hemos descrito anteriormente (Darrow y Knotts, 1977), en el cual interviene la proteína adeniltransferasa/adetilremovasa denominada GlnE. La adenilación/deadenilación de la enzima GSI depende de la relación C/N intracelular (Darrow y Knotts, 1977; Ludwig, 1980; Carlson *et al.*, 1987). Cuando el N intracelular es escaso, GlnE deadenila las diversas subunidades de GSI, la cual adquiere su conformación activa. Lo inverso ocurre cuando el N intracelular se encuentra en exceso, GSI es adenilada por GlnE, por lo que su actividad disminuye (Bishop *et al.*, 1976; Ludwig, 1978).

Por otra parte, GSII pareciera estar regulada sólo a nivel transcripcional (Tatè *et al.*, 2001). Sin embargo, en *R. leguminosarum* se ha demostrado la existencia de un mecanismo de control a nivel post-transcripcional mediado por la proteína GstI, que en condiciones de exceso de N inhibe la transcripción de *glnII* (Spinosa *et al.*, 2000; Tatè *et al.*, 2001). A partir de la secuenciación del genoma de *B. diazoefficiens* (Kaneko *et al.*, 2002) fue posible detectar la presencia de un gen homólogo al que codifica para GstI en *R. leguminosarum*, denominado *gstI* (ORF bll4168), que se encuentra ubicado de manera

adyacente y río arriba al gen *glnII* (ORF blr4169). Incluso, estudios de expresión realizados por Franck y colaboradores (2015), detectaron que el patrón de expresión del *gstI* coincide con la función descrita en *R. leguminosarum*. Es decir, bajo condiciones de escasez de N, el gen *gstI* en *B. diazoefficiens* se encontraría inhibido, mientras que en condiciones de exceso de N estaría sobreexpresado. Sin embargo, hasta la fecha no se han reportado estudios de *GstI* en *B. diazoefficiens*, y por lo tanto, aún permanece sin elucidarse si es funcional o no en nuestra bacteria de estudio.

Como ya hemos mencionado en este capítulo, la actividad de GSI y GSII se encuentra regulada según la disponibilidad de N intracelular. Cuando la cantidad de N dentro de la célula es suficiente, es decir que la relación de α -cetoglutarato/glutamina es baja, GSI está parcialmente activa, dependiendo del número de subunidades adeniladas, y hay baja expresión de *glnII*. Si se analizan los niveles de transcritos de *glnII* normalizado según el nivel de *glnA* (que es constitutivo) se observa una reducción del transcripto de GSII por la adición de NH_4^+ al medio (Adams *et al.*, 1988). Sin embargo, cuando la demanda celular de compuestos nitrogenados aumenta y el nivel de glutamina es bajo con relación al de α -cetoglutarato, GSI se deadenila y se induce la expresión de GSII para incrementar la captación de NH_4^+ (Patriarca *et al.*, 2002). En *R. leguminosarum* se ha observado que la concentración intracelular de GSI aumenta de dos a cuatro veces cuando la bacteria se cultiva con una fuente pobre de N respecto a una fuente abundante en este nutriente (Rossi *et al.*, 1989). En este sentido, nuestro grupo de trabajo ha podido determinar que *B. diazoefficiens* creciendo con una severa limitación de N produce un aumento similar en el estado de activación de GSI y su correlación con el estado de deadenilación (López-García *et al.*, 2001). Por otra parte, en esta misma situación se observó aumentos del nivel de expresión de GSII (López-García *et al.*, 2001). Además de la regulación de estas enzimas por la relación de los sustratos α -cetoglutarato y glutamina, en *B. diazoefficiens* la transcripción de los genes que intervienen en la fijación de N_2 (genes *nif*) y del gen que codifica para GSII (*glnII*), se encuentra regulada por la limitación de O_2 . Estudios realizados muestran que la transcripción del gen *glnII* se induce cuando las condiciones de crecimiento del rizobio son limitadas en O_2 (Adams *et al.*, 1988), y en esas mismas condiciones, también se vio que había transcripción de los genes *nif*. Por lo tanto, la expresión del gen *glnII* pareciera estar activada de manera coordinada con los genes *nif* en respuesta a la falta de O_2 . Sin

embargo, Rao y colaboradores (1978) reportaron que la actividad de GSII decrece durante microaerobiosis en algunos rizobios, indicando que posiblemente esta enzima se encuentre regulada por un mecanismo post-transcripcional hasta ahora no descrito.

1.9.2 Respuesta al estrés por N en rizobios en vida libre

Como hemos visto, la asimilación de NH_4^+ en los rizobios es un proceso finamente regulado. Para que este sistema actúe de manera eficiente es necesaria la participación de una gran cantidad de proteínas y moléculas efectoras que permitan satisfacer las necesidades de la bacteria. Este conjunto de proteínas forma parte de la cascada de señalización de respuesta al estrés por N (NSR).

Como mencionamos anteriormente, cuando la relación α -cetoglutarato / glutamina intracelular es alta, la NSR se activa para aumentar la asimilación de NH_4^+ (**Figura I.9 – Panel A**). La puesta en marcha de la NSR involucra mecanismos de traducción de señales que detectan la condición de limitación de N y responden produciendo cambios conformacionales de las proteínas y cambios en la expresión génica. En esta respuesta, el sensor principal de la NSR GlnD, inicia la cascada de activación uridilando el residuo Tyr51 de las proteínas PII (Reitzer *et al.*, 2003; Ninfa *et al.*, 2005). A su vez, las PII uridiladas activan el sistema de dos componentes NtrB-NtrC, donde NtrB se autofosforila y transfiere el fosfato a NtrC que se asocia a secuencias específicas río arriba de promotores de varios genes que codifican funciones requeridas para la supervivencia en estas condiciones (Bravo y Mora, 1988; Martin *et al.*, 1988; Burkovski, 2003; Dávalos *et al.*, 2004), entre los que encontramos a *glnII* (Bravo, y Mora, 1987; Martin *et al.*, 1988; Martin *et al.*, 1989).

Por el contrario, en presencia de altos niveles intracelulares de glutamina, y por consiguiente la relación C/N es baja, GlnD estimula la deuridilación de las proteínas PII para mantener el sistema funcionando a un nivel basal (Arcondéguy *et al.*, 2001). PII deuridilada promueve la adenilación de GSI, volviéndola inactiva, disminuyendo de este modo la actividad GS total y manteniendo los pools de intermediarios del ciclo de Krebs, en particular, de α -cetoglutarato (**Figura I.9 – Panel B**). Además, si en rizobios ocurre como en *E. coli* donde NtrB se une a GlnB, NtrB no sería capaz de autofosforilarse y por ende, NtrC estará inactivo.

Una particularidad que desarrollaremos más adelante en el **Capítulo VI** de esta Tesis, es que *B. diazoefficiens* es el único rizobio que posee tres copias de la proteína PII, una GlnB y 2 GlnK. Este hallazgo hace muy interesante el estudio de la regulación del metabolismo de N en esta bacteria.

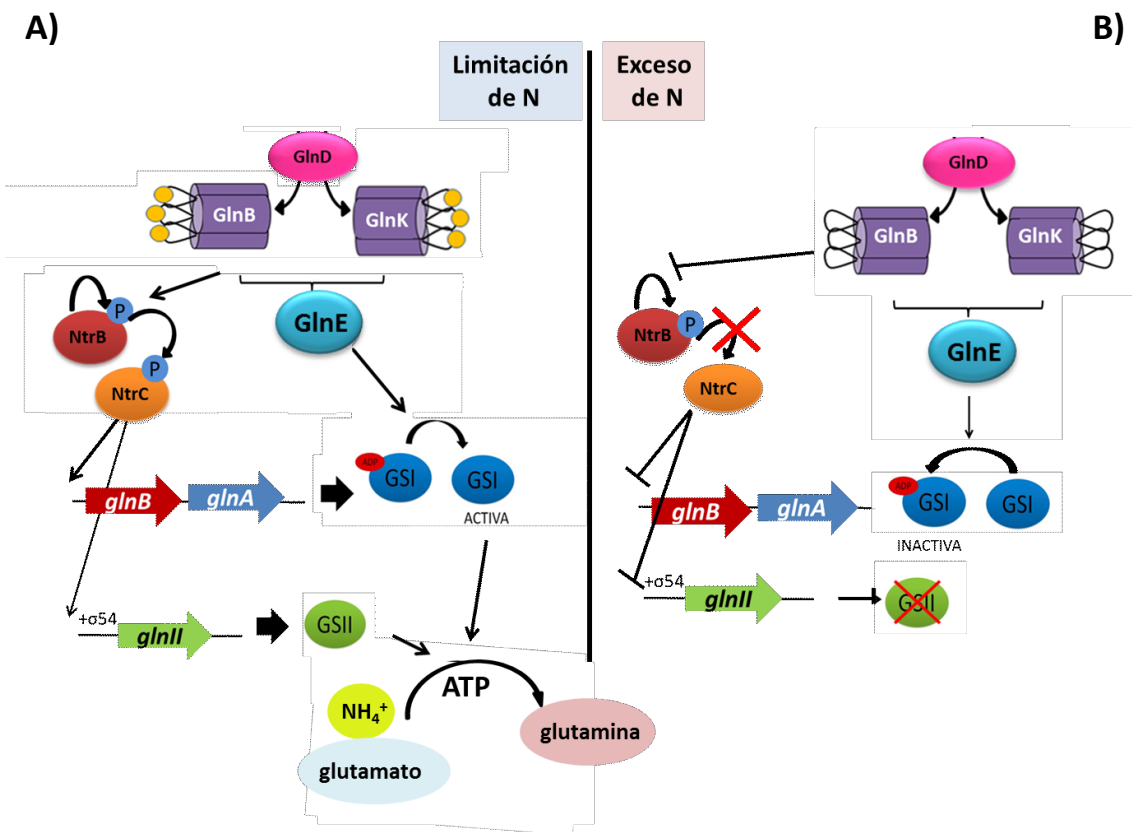


Figura I.9 Esquema general de la cascada NSR en rizobios. En el panel **A)** se esquematiza la respuesta que se desencadena frente a escasez de N intracelular. El sensor principal de la cascada, la proteína GlnD, uridila a las proteínas PII (GlnB y GlnK). Las PII uridiladas (PII-UMP) son capaces de interactuar con la enzima adeniltransferasa/ adenilremovasa (GlnE) de manera tal que esta última adquiere la conformación que le permite deadenilar a la GSI, activándola para catalizar la conversión de glutamato en glutamina. Paralelamente, PII-UMP activan la proteína sensora NtrB, la cual se autofosforila y transfiere el grupo fosfato al regulador de respuesta NtrC. NtrC-P es el encargado de inducir la expresión de varios genes involucrados en el metabolismo del N, entre los que encontramos el gen *glnII* que codifica para la proteína GSII, la cual también cataliza la conversión de glutamato en glutamina. La acción conjunta de GSI y GSII permite captar bajas cantidades de NH_4^+ del medio y restablecer los niveles de glutamina intracelular. El caso contrario se muestra en el panel **B)**, donde altos niveles de N intracelular inducen la deuridilación de las PII mediada por GlnD, y en este estado PII inducen la acción adeniltransferasa de GlnE que mantiene a la GSI principalmente inactiva. Además, PII sin uridilar no permite que se active el sistema de dos componentes NtrBC y no se induce la expresión de *glnII*.

I.10 Hipótesis de Trabajo y Objetivos

La escasez de nutrientes es probablemente la condición de crecimiento más parecida al hábitat natural de los rizobios en el suelo. Por lo tanto, estos microorganismos deben estar habituados a sobrevivir en entornos con condiciones fluctuantes de “hambre y abundancia” y a los diferentes estreses ambientales que soportan. Durante estas modificaciones, las bacterias regulan sus actividades metabólicas para dar lugar a un fenotipo de adaptación al entorno desfavorable. En este sentido, se sabe que las condiciones óptimas de infección de las raíces de soja y formación de los nódulos que permiten la FBN se observan cuando la relación C/N es alta en la rizósfera.

Nuestro grupo de investigación ha observado que los rizobios cultivados bajo escasez de la fuente de N son más persistentes, infectivos y competitivos. Estos resultados nos llevaron a pensar que esta condición de cultivo podría utilizarse con ventaja en la elaboración de inoculantes más efectivos para soja. El estado de limitación de N probablemente se asemeje más a las condiciones en las que se encuentran los rizobios en el suelo, a diferencia de las bacterias del inoculante que se elaboran cultivando los rizobios en medios ricos. Con todas estas premisas, podría plantearse la alternativa de preparar inoculantes en medios de alta relación C/N, para lo cual es necesario conocer cómo ésta relación C/N modifica el metabolismo general de los rizobios para luego encarar un diseño racional de inoculantes con alta eficiencia simbiótica. Por lo tanto, nuestra hipótesis de trabajo consiste en que es posible mantener estas buenas propiedades simbióticas, alcanzadas en la situación de escasez de N, estudiando cómo los reguladores más importantes involucrados en el metabolismo de N en *B. diazoefficiens* se expresan y controlan otros genes para adaptarse a esta situación particular, tanto en vida libre como en simbiosis. Para ello, es necesario conocer cómo funcionan los mecanismos de regulación del N en este rizobio (NSR) y su influencia en la FBN.

Es interesante señalar que al momento en que se inició este trabajo de Tesis Doctoral contábamos con muy poca información sobre las principales proteínas involucradas en la cascada de respuesta al estrés por N y en la asimilación de NH_4^+ en *B. diazoefficiens*. Las últimas publicaciones se remontaban a los años 1987/1988 y se basaban en el estudio de la expresión de los genes *glnA* y *glnII*, que codifican las glutamino sintetasas,

cuyas secuencias se habían encontrado por homología con otros microorganismos previamente descritos como *E. coli* (Carlson *et al.*, 1987; Martin *et al.*, 1988).

En cuanto a las proteínas de señalización PII, Martin y col. (1989) pudieron describir la presencia del gen *glnB* y la regulación de la expresión del mismo a partir de dos promotores en tándem. Sin embargo, la caracterización funcional de GlnB continuaba siendo una incógnita ya que la delección de dicho gen no fue posible con las técnicas de la época. Incluso, nada se conocía de la presencia del gen *glnK* en *B. diazoefficiens* hasta la secuenciación de su genoma (Kaneko *et al.*, 2002).

Dada la relevancia de aumentar el rendimiento del cultivo de soja en forma sustentable, en este trabajo de Tesis Doctoral se plantea profundizar el conocimiento sobre cómo los sistemas regulatorios se activan para adaptarse a la escasez de N en *B. diazoefficiens* tanto en vida libre como en simbiosis, así como también proponemos profundizar en la regulación global del metabolismo de N en estas bacterias ya que parece ser un factor clave para una simbiosis exitosa.

Objetivos de este trabajo de Tesis Doctoral

1.10.1 Objetivo General

En este trabajo de Tesis nos planteamos como objetivo principal caracterizar la cascada regulatoria del metabolismo de N en *B. diazoefficiens*, tanto en vida libre como en simbiosis con plantas de soja, y comprender y estudiar en qué condiciones metabólicas se activa la respuesta al estrés por N en este rizobio. Asimismo, es nuestro objetivo a futuro establecer, con los conocimientos ganados, condiciones de cultivo favorables para el desarrollo de formulaciones de inoculantes para soja con mayor eficiencia simbiótica.

1.10.2 Objetivos específicos

- 1- Evaluar la fisiología del crecimiento de *B. diazoefficiens* en medios definidos desarrollados para generar condiciones de exceso o limitación de N.
- 2- Obtener, mediante mutagénesis dirigida, cepas mutantes en las proteínas de señalización PII: GlnB, GlnK1 y GlnK2, involucradas en la regulación del metabolismo del N en *B. diazoefficiens*, y estudiar el entorno génico de cada una de ellas, así como también las características de sus secuencias proteicas mediante análisis *in silico*.
- 3- Analizar la posible función de las diversas copias de la enzima glutamino sintetasa GS, realizando un análisis comparativo de sus secuencias a partir de herramientas bioinformáticas, así como también obteniendo cepas mutantes en los genes *glnA1*, *glnA2*, *glnA3* y *glnII*.
- 4- Caracterizar fenotípicamente los distintos mutantes obtenidos en *B. diazoefficiens* con el fin de evaluar el posible rol de cada una de las proteínas mutadas en la regulación del metabolismo de N en este rizobio en vida libre.
- 5- Evaluar los mutantes obtenidos en relación a su interacción simbiótica con las plantas de soja.

Capítulo II

**Materiales
y Métodos**



II.1 Cepas bacterianas, plásmidos y cebadores utilizados

II.1.1 Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en este trabajo se detallan en las **Tablas II.1 y II.2** respectivamente, junto con sus características principales:

Tabla II.1 Características de cepas bacterianas utilizados en este trabajo

Cepa bacteriana	Descripción/Características relevantes	Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>recA</i> , Δ <i>lacU169</i> , Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15	Bathesda Res. Lab.
TOP10	<i>hsdR</i> , <i>mcrA</i> , <i>lacZ</i> Δ M15, <i>endA</i> ₁ , <i>recA</i> ₁	Invitrogen
S17-1	Tra ⁺ , <i>recA pro thi hsdR</i> chr::RP4-2	Simon <i>et al.</i> , 1983
BL21 DE3	<i>fhuA2 [lon] ompT gal [dcm] ΔhsdS</i>	Jeong <i>et al.</i> , 2009
BL21 DE3 (pET22b(+):: <i>glnII</i>)	Cepa derivada de <i>E. coli</i> BL21 DE3 que contiene el vector pET22b(+) con el gen <i>glnII</i> (blr4169) para la sobreexpresión del mismo. Amp ^r	Este trabajo
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>		
USDA 110	Cepa salvaje. Cm ^r	Departamento de Agricultura de EEUU (USDA)
Δ <i>glnA1</i>	Mutante delecional del gen <i>glnA1</i> (blr4949) sobre <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110. Cm ^r	Este trabajo
Δ <i>glnA2</i>	Mutante por inserción de cassette Str/Sp del gen <i>glnA2</i> (blr4835) sobre <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110. Cm ^r , Str/Sp ^r	Este trabajo
Δ <i>glnA3</i>	Mutante delecional del gen <i>glnA3</i> (bli1069) sobre <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110. Cm ^r	Este trabajo
Δ <i>glnA1</i> Δ <i>glnA2</i>	Mutante doble en los genes <i>glnA1</i> y <i>glnA2</i> por inserción de cassette Str/Sp en cepa Δ <i>glnA1</i> . Cm ^r , Str/Sp ^r	Este trabajo
Δ <i>glnII</i>	Mutante delecional del gen <i>glnII</i> (blr4169) con inserción de cassette Km sobre <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110. Cm ^r , Km ^r	Este trabajo

Tabla II.1 Continuación

<i>ΔglnK1</i>	Mutante delecional del gen <i>glnK1</i> (blr0612) sobre <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110. Cm ^r	Este trabajo
<i>ΔglnK2</i>	Mutante delecional del gen <i>glnK2</i> (blr0606) sobre <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110. Cm ^r	Este trabajo
<i>ΔglnK1ΔglnK2</i>	Mutante delecional del gen <i>glnK2</i> sobre <i>ΔglnK1</i> .Cm ^r	Este trabajo
<i>ΔglnB</i>	Mutante delecional del gen <i>glnB</i> (blr4948) sobre <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110. Cm ^r	Este trabajo

Tabla II.2 Características de los plásmidos utilizados

pBlueScriptSK(+)	Vector comercial de clonado. Amp ^r	Stratagene
pET22b(+)	Vector comercial de expresión. Amp ^r	Novagen
pG18mob2	Vector suicida en rizobios, mob ⁺ , contiene el gen <i>lacZ</i> , Gm ^r	Kirchner <i>et al.</i> , 2003
pG18mobLK	Vector derivado del pG18mob2 con dos sitios de corte para la enzima <i>KpnI</i> en su sitio múltiple de clonado, mob ⁺ , lacZ ⁺ , Gm ^r	Pistorio M., IBBM, UNLP CONICET
pHPΩ45	Vector donador del omegón Str/Sp: Amp ^r , Str ^r , Sp ^r	Prentki y Kirsch, 1984
pK18mobSacB	Vector suicida en rizobios Km ^r , mob ⁺ , SacB ⁺	Schafer <i>et al.</i> , 1994
pBlue:: <i>glnA1</i>	Vector derivado del pBlueScriptSK(+) que contiene el gen <i>glnA1</i> (blr4949) completo. Amp ^r	Este trabajo
pET22b(+>:: <i>glnII</i>	Vector derivado del pET22b(+) que contiene el gen <i>glnII</i> (blr4169) completo para su sobreexpresión. Amp ^r	Este trabajo
pG18mob:: <i>glnA2</i>	Vector derivado del pG18mob2 que contiene dos fragmentos flanqueantes al gen <i>glnA2</i> (blr4835). Gm ^r	Este trabajo
pG18mob:: <i>II3'</i> ::Km	Vector derivado del pG18mob2 que contiene un fragmento homólogo a la región río abajo (3') del gen <i>glnII</i> (blr4169) y un cassette que confiere resistencia a Km. Gm ^r , Km ^r	Lamelza, 2013
pG18mobLK:: <i>II5'</i>	Vector derivado del pG18mobLK que contiene un fragmento homólogo a la región río arriba (5') del gen <i>glnII</i> (blr4169). Gm ^r	Este trabajo
pK18mobSacB:: <i>glnA1</i>	Vector derivado del pK18mobSacB conteniendo fragmento truncado del gen <i>glnA1</i> (blr4949). Km ^r .	Este trabajo

Tabla II.2 Continuación

pFL0612	Vector derivado del pK18mobSacB conteniendo fragmento truncado del gen <i>glnK1</i> (blr0612). Km ^r	Este trabajo
pFL0606	Vector derivado del pK18mobSacB conteniendo un fragmento truncado del gen <i>glnK2</i> (blr0606). Km ^r	Este trabajo
PFL4948	Vector derivado del pK18mobSacB conteniendo un fragmento truncado del gen <i>glnB</i> (blr4948). Km ^r	Este trabajo
pFL4949	Vector derivado del pK18mobSacB conteniendo un fragmento truncado del gen <i>glnA1</i> (blr4949). Km ^r	Este trabajo
pFL4835	Vector derivado del pG18mob conteniendo fragmentos flanqueantes al gen <i>glnA2</i> (blr4835) separados por el omegón Str/Sp. Gm ^r , Str ^r , Sp ^r	Este trabajo
pFL1069	Vector derivado del pK18mobSacB conteniendo un fragmento truncado del gen <i>glnA3</i> (bll1069). Km ^r	Este trabajo
pFL4169	Vector derivado del pG18mob que contiene fragmentos flanqueantes al gen <i>glnII</i> (blr4169) interrumpidos por un cassette Km. Gm ^r , Km ^r	Este trabajo
pFL0916	Vector derivado del pK18mobSacB conteniendo fragmento truncado del gen <i>glnD</i> (bll0916). Km ^r	Este trabajo

II.1.2 Cebadores utilizados

Las secuencias nucleotídicas que se muestran en la **Tabla II.3.1** pertenecen a los cebadores utilizados para la amplificación de los fragmentos involucrados en los distintos pasos de las estrategias de mutagénesis y para la confirmación de las cepas mutantes. Aquellas secuencias resaltadas en negrita corresponden a las secuencias sintéticas diseñadas para realizar la estrategia de clonado descrita por Sukdeo y Charles (2003).

Por su parte, aquellos cebadores utilizados para llevar a cabo los ensayos de qRT-PCR se detallan en la **Tabla II.3.2**.

Tabla II.3.1 Cebadores utilizados para la construcción y el chequeo de cepas mutantes

Cebadores para construcción de cepas mutantes		
Denominación	Secuencia 5' a 3'	Ref.
glnII 5'FW	AAAAGAATTCCAGAATCAGGCGTTTTCCGC	Lamelza, 2013
glnII 5'RV	AAAAGGTACCGCTTCAGCACGCAATCAGAG	Lamelza, 2013
glnII 3'FW	AAAAGTGCAGCCGAGCTGAAAGGCTCCGGC	Lamelza, 2013
glnII 3'RV	AAAAAAGCTTGCGCGGTAGTTCGGATCGGGATCGG G	Lamelza, 2013
glnA1 Fw	GAAATAAGGCTGCTTCGGCG	Este trabajo
glnA1 Rv	CCTCAATCCCAGAAGGCAC	Este trabajo
glnA2 5'Fw	GAATTCTCAATGTCTGCCGTTCTCGG	Este trabajo
glnA2 5'Rv	GCCGTCGACGGATCCGAGGCAACGGCAGTCAGCTTT GATGT	Este trabajo
glnA2 3'Fw	TGCCTCGGATCCGTCGACGGCGAATCTCTACGACCT CCCGC	Este trabajo
glnA2 3'Rv	AAGCTTAGGGTCCCGATGATCTAGCA	Este trabajo
glnA3 5'Fw	CGACAAGGCAATCGTGCAAT	Este trabajo
glnA3 5'Rv	GCCGTCGACGGATCCGAGGCAGTCACTGCTATTGCT CCCCG	Este trabajo
glnA3 3'Fw	TGCCTCGGATCCGTCGACGGCCGAGATGTTCTGACA CCCCT	Este trabajo
glnA3 3'Rv	CCTGCTGGTTCGAATTGGTTG	Este trabajo
glnK1 5'Fw	CTGCAGAAGGGGTCTGAATGGGGATTG	Este trabajo
glnK1 5'Rv	GCCGTCGACGGATCCGAGGCACGGATTATGAAAGC GGGGG	Este trabajo
glnK1 3'Fw	TGCCTCGGATCCGTCGACGGCTCGTCATCAACCTCG ACCAT	Este trabajo
glnK1 3'Rv	GCATGCCGCAGACGGTGTAGAAGACC	Este trabajo
glnK2 5'Fw	CTGCAGCGGTCCACACCAGCGTATC	Este trabajo
glnK2 5'Rv	GCCGTCGACGGATCCGAGGCAATGGTCAGGCCTATT CCCCG	Este trabajo

Tabla II.3.1 Continuación

glnK2 3'Fw	TGCCTCGGATCCGTGACGGCCGAATTTCTATGCTG GGGG	Este trabajo
glnK2 3'Rv	AAGCTTCAGATAAGCGGAGAACCGCA	Este trabajo
glnB 5'Fw	GCATGCCTTCCATGCCACTTCCCTGT	Este trabajo
glnB 5'Rv	GCCGTCGACGGATCCGAGGCACTTGAACGGCTTGAT GATGGCT	Este trabajo
glnB 3'Fw	TGCCTCGGATCCGTGACGGCGCTATCTGAGCCGGG TGCTA	Este trabajo
glnB 3'Rv	AAGCTTATCAGGCACATGTCGGACTC	Este trabajo
glnD 5'Fw	CTGCAGCGTCGTGTCACCTTGGTCAT	Este trabajo
glnD 5'Rv	GCCGTCGACGGATCCGAGGCACTTCAGCAGGATCGC CTGT	Este trabajo
glnD 3'Fw	TGCCTCGGATCCGTGACGGCCCTGACAGCGACGAC TTCAT	Este trabajo
glnD 3'Rv	AAGCTTTGTAGATCACCGAGCGATGC	Este trabajo
Cebadores de chequeo de las cepas mutantes		
Denominación	Secuencia 5'a 3'	Ref.
Cheq_glnII_Fw	CGAAAATTGCCGGACGTTGA	Este trabajo
Cheq_glnII_Rv	GGTGGATCGAATAGAGGCCA	Este trabajo
Check_glnA1_Fw	GCTATCTGAGCCGGGTGCTA	Este trabajo
Check_glnA1_Rv	AGAATGGCTTCGTGTCGTCC	Este trabajo
Check_glnA2_Fw	CAGACTATCGGCGCTTGACA	Este trabajo
Check_glnA2_Rv	GTCGTCAAGATGAGCTGGGT	Este trabajo
Check_glnA3_Fw	AAGAACAGCGCAACGACTA	Este trabajo
Check_glnA3_Rv	CGTCGTAGCAGTGATTGCG	Este trabajo
Check_glnK1_Fw	GAGGTGGAACGAACCTTGGA	Este trabajo
Check_glnK1_Rv	CGAGGCTGTAGCCGTACAC	Este trabajo

Tabla II.3.1 Continuación

Check_glnK2_Fw	TGCCAAAATCGACCGACAGT	Este trabajo
Check_glnK2_Rv	GCCAGCGGAATGTAGACGAA	Este trabajo
Check_glnB_Fw	CTGCATTTGCGCGTTGGTC	Este trabajo
Check_glnB_Rv	CCGAGATTGCCGCCTTCATA	Este trabajo
Check_glnD_Fw	GGATTGTAGGTCGCCAGTC	Este trabajo
Check_glnD_Rv	ACCGTGGACATGGTCAGATG	Este trabajo
Km Fw	CATCGGGCTTCCCATAACA	Quelas, 2009
Km Rv	AATCCGGTGAGAATGGCAA	Quelas, 2009
Str/Sp	ATCAAAAAGGTCATCCACCG	Quelas, 2009
M13 Fw (-40)	GTTTTCCCAGTCACGAC	Producto comercial
M13 Rv (-40)	CAGGAAACAGCTATGAC	Producto comercial
Cebadores para la sobreexpresión de genes		
Denominación	Secuencia 5' a 3'	Ref.
C_glnK1_FW	AAACTCGAGCTGTGCCCGCGTAGTGAAAC	Este trabajo
C_glnK1_Rv	AAATCTAGAGCCATAGGGACGCTTGAACG	Este trabajo
Exp_glnII_Fw	AAACATATGACCAAGTATAAGCTCGAGTAC	Este trabajo
Exp_glnII_Rv	AAAGTCGACGGCGACCGCCTTCTTC	Este trabajo

Tabla II.3.2 Cebadores utilizados para llevar a cabo qRT-PCR

Denominación	Secuencia	Ref.
glnII_RT_Fw	GACGGATATACGCCGACTCC	Este trabajo
glnII_RT_Rv	GCTTCAGCACGCAATCAGAG	Este trabajo
glnA1_RT_Fw	TGCTCATCTGGAAACCGACC	Este trabajo
glnA1_RT_Rv	ACATCGTCCCTTCGGCAAAT	Este trabajo
glnA2_RT_Fw	AACCTGGCTCGACTACAAGC	Este trabajo
glnA2_RT_Rv	GGTCCCGATGATCTAGCAGC	Este trabajo
glnA3_RT_Fw	TCCCTATCTCTACATGGCCT	Este trabajo
glnA3_RT_Rv	GTAGTAGTCGACGAACTCCG	Este trabajo
glnA4_RT_Fw	CCAGTGATGTCTTTGGAGAA	Este trabajo
glnA4_RT_Rv	CAAAGTATCTCCGACGTTCA	Este trabajo
glnK1_RT_Fw	TCACGGTGACGGAAGTCAAG	Este trabajo
glnK1_RT_Rv	ATCTTGGGCAGGAAGCTCAC	Este trabajo
glnK2_RT_Fw	CCTTCAAGCTCGATGAGGTCC	Este trabajo
glnK2_RT_Rv	CCATAACCCTTTACCTCGGTCAC	Este trabajo
glnB_RT_Fw	AGGGACACGCCGAGCTTTAC	Este trabajo
glnB_RT_Rv	TCGCCTCTTCGATGTTGGAGAC	Este trabajo
amtB1_RT_Fw	GACAGTCCTCGTGCTGTTGA	Este trabajo
amtB1_RT_Rv	GCATGTTCTTGGAACGGACG	Este trabajo
amtB2_RT_Fw	TACCAGATGACGTTTGCG	Este trabajo
amtB2_RT_Rv	GACCGAGAACAGCAGATAAG	Este trabajo
sigA Fw	CTGATCCAGGAAGGCAACATC	Jin, Nikolau. 2012
sigA Rv	TGGCGTAGGTCGAGAACTTGT	Jin, Nikolau. 2012

II.2 Procedimientos microbiológicos

II.2.1 Medios de cultivo

-LB

Los cultivos de las cepas de *E. coli* se realizaron en el medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook, 1989) cuya composición es la siguiente: triptona 10 g.l⁻¹, extracto de levadura 5 g.l⁻¹, NaCl 5 g.l⁻¹, glucosa 1 g.l⁻¹. Para obtener el medio sólido se agregaron 15 g.l⁻¹ de agar.

Para obtener el medio sólido se agregaron 15 g.l⁻¹ de agar. La esterilización se realizó durante 20 minutos a 121 °C con vapor de agua en autoclave.

Cuando fue necesario se agregó X-gal (5-bromo-4cloro-3-indoil-β-galactopiranosido) a una concentración de 40 µg.ml⁻¹.

-YEM

Los cultivos sólidos de *B. diazoefficiens* se llevaron a cabo en medio extracto de levadura-manitol (YEM) (Vincent, 1970), cuya composición se detalla a continuación: extracto de levadura 0,4 g.l⁻¹, manitol 10 g.l⁻¹, NaCl 0,1 g.l⁻¹, MgSO₄.7H₂O 0,2 g.l⁻¹, K₂HPO₄ 0,5 g.l⁻¹. El medio YEM agarizado se preparó adicionando agar 15 g.l⁻¹ y rojo congo 0,25 % p/v. La esterilización se realizó durante 20 minutos a 121 °C con vapor de agua en autoclave.

-PSY - ara

Para realizar los ensayos de conjugación entre *B. diazoefficiens* USDA 110 y *E. coli* S17-1 se utilizó el medio PSY-ara (modificado de Regensburguer y Hennecke, 1983) cuya composición es la siguiente: L- arabinosa 1 g.l⁻¹, peptona 1 g.l⁻¹, extracto de levadura 1 g.l⁻¹, KH₂PO₄ 0,3 g.l⁻¹, Na₂HPO₄ 0,3 g.l⁻¹, sales (MgSO₄.7H₂O 10 mg.l⁻¹, CaCl₂ 5 mg.l⁻¹, FeCl₃CuSO₄.5H₂O 1,66 mg.l⁻¹), micronutrientes (H₃BO₃ 10 mg.l⁻¹, ZnSO₄.2H₂O 1,46 mg.l⁻¹, CuSO₄.5H₂O 0,5 mg.l⁻¹, MnCl₂.4H₂O 0,24 mg.l⁻¹, Na₂MoO₄.2H₂O 0,1 mg.l⁻¹) y vitaminas (Biotina 1 mg.l⁻¹, Pantotenato de sodio 1 mg.l⁻¹, Clorhidrato de tiamina 1 mg.l⁻¹).

Se preparó primero el medio base con las cantidades indicadas anteriormente de los siguientes compuestos: Na₂HPO₄, KH₂PO₄, L-arabinosa y extracto de levadura. El mismo se llevó a pH 7 y se esterilizó durante 20 minutos a 121 °C con vapor de agua en

autoclave. En forma independiente se prepararon soluciones stock de (1.000 X) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y se esterilizaron durante 20 minutos a 121 °C con vapor de agua en autoclave. Las soluciones stock de micronutrientes (1.000 X), el $\text{FeCl}_3\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (100 X) y la mezcla de vitaminas (1.000 X) se esterilizaron por filtración con filtros Millipore de 0,22 μm . Una vez preparado y esterilizado el medio base se le adicionaron, a partir de las soluciones stock estériles, los siguientes compuestos: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, micronutrientes y vitaminas.

-Evans y medios derivados

Los cultivos de *B. diazoefficiens* en medios líquidos se llevaron a cabo utilizando el medio de Evans (Evans, 1970) que está formulado para tener una relación C/N balanceada (C/N=14).

La composición base del medio de Evans es la siguiente: manitol 10 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, NH_4Cl 1,07 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,56 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, KCl 0,745 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, Na_2SO_4 0,275 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,25 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, ácido cítrico 0,42 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ y micronutrientes. Los micronutrientes utilizados poseen una composición de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,588 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, ZnO 0,412 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5,4 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,172 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,452 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, H_3BO_3 0,054 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,004 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, HCl 8 ml. Los micronutrientes fueron esterilizados por filtración (Millipore de 0,22 μm). Una vez adicionado al medio se llevó a pH 6,9 con un pHmetro debidamente calibrado y la esterilización del mismo se realizó durante 20 minutos a 121 °C con vapor de agua en autoclave.

La mezcla de vitaminas (biotina 20 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, tiamina-HCl 20 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, riboflavina 20 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, ácido p-aminobenzoico 20 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, piridoxina 20 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$) fue esterilizada por filtración con membrana (filtros Millipore de 0,22 μm) y luego agregadas al resto del medio estéril, una vez enfriado.

Para evaluar diferentes condiciones de cultivo se prepararon variantes de este medio modificando las cantidades de las fuentes de C y N. Es importante destacar que a lo largo de este trabajo nos referiremos a la relación C/N como los g totales de C aportados por la fuente de C en relación a los g de N aportados por la fuente nitrogenada para un litro de cultivo. Las variantes del medio Evans utilizados se detallan a continuación:

Evans Bajo C: manitol 1 g.l⁻¹ y NH₄Cl 1,07 g.l⁻¹ con una relación C/N=1,4.

Evans Bajo N: manitol 12 g.l⁻¹ y NH₄Cl 0,0054 g.l⁻¹ con una relación C/N=3.333.

Evans NG: manitol 5 g.l⁻¹, glutamato de sodio 0,4 g.l⁻¹ y NH₄Cl con una relación C/N=6,8.

Evans Glutamato: manitol 5 g.l⁻¹ y glutamato de sodio 0,4 g.l⁻¹ con una relación C/N=70.

Evans NH₄⁺: manitol 5 g.l⁻¹, NH₄Cl 0,107 g.l⁻¹ con una relación C/N=70.

Durante la selección de los medios anteriormente nombrados también se probaron las siguientes variantes:

Evans1,4: manitol 5 g.l⁻¹ y NH₄Cl 5,38 g.l⁻¹ (C/N=1,4)

Evans2: manitol 2 g.l⁻¹ y NH₄Cl 1,53 g.l⁻¹ (C/N=2)

Evans50: manitol 2 g.l⁻¹ y NH₄Cl 0,061 g.l⁻¹ (C/N=50)

Evans100: manitol 2 g.l⁻¹ y NH₄Cl 0,03 g.l⁻¹ (C/N=100)

Evans200: manitol 5 g.l⁻¹ y NH₄Cl 0,038 g.l⁻¹ (C/N=200)

Evans660: manitol 5 g.l⁻¹ y NH₄Cl 0,011 g.l⁻¹ (C/N=660)

II.2.2 Condiciones de cultivo

II.2.2 a Cultivo de cepas de B. diazoefficiens

Los cultivos sólidos se iniciaron a partir de las reservas mantenidas a 4 °C o bien a partir de cultivos guardados en glicerol a -20 °C. Los mismos se crecieron en el medio YEM sólido a 28 °C hasta observar crecimiento. En ese momento se tomó masa bacteriana con ansa en anillo y se inocularon en el medio YEM, PSY-ara o Evans según el experimento a ensayar. Los cultivos se crecieron con agitación rotatoria a 180 rpm hasta que estuvieran en fase estacionaria. Luego, los cultivos se diluyeron 1:100 en el medio fresco y su crecimiento se continuó durante 2-3 días, con el fin de que todas las células alcancen la fase de crecimiento exponencial. A partir de este cultivo iniciador se inocularon los medios a ser estudiados de manera de obtener una DO₅₀₀ inicial de 0,02-0,03 y se continuó su cultivo en las condiciones descriptas previamente hasta la fase de crecimiento deseada.

II.2.2 b Cultivos de E. coli

En los casos que fue necesario cultivar cepas de *E. coli*, las mismas fueron crecidas a 37 °C en el medio LB. Los cultivos sólidos se obtuvieron a partir de repiques en LB sólido de las reservas mantenidas a 4 °C o bien a partir de cultivos guardados en glicerol a -20 °C. Los inóculos utilizados para los distintos ensayos se hicieron crecer en medio LB líquido a 37 °C suplementados con el antibiótico correspondiente cuando fue necesario.

II.2.3 Soluciones para el cultivo hidropónico de plantas

Para los ensayos con plantas se utilizó la solución de Fåhraeus modificada libre de nitrógeno (Lodeiro *et al.*, 2000), la misma contiene: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,11 g.l⁻¹; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,12 g.l⁻¹; K_2HPO_4 0,20 g.l⁻¹; KH_2PO_4 0,17 g.l⁻¹; NaCl 0,06 g.l⁻¹; citrato férrico 0,005 g.l⁻¹ y los siguientes micronutrientes: KCl 3,73 mg.l⁻¹; H_3BO_3 1,55 mg.l⁻¹; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,85 mg.l⁻¹; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,13 mg.l⁻¹; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,58 mg.l⁻¹; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 18 mg.l⁻¹; pH 7. Las soluciones de fosfatos, cloruro de sodio, citrato férrico y micronutrientes se esterilizaron en autoclave por 20 minutos a 121 °C. Una vez enfriada se le agregaron las sales de calcio y magnesio previamente esterilizadas en autoclave.

II.2.4 Antibióticos utilizados

Los antibióticos se prepararon en agua bidestilada (exceptuando la espectinomicina y cloranfenicol) a una concentración 1.000 X y se esterilizaron por filtración por membrana (filtros Millipore de 0,22 µm). La espectinomicina se preparó en metanol y la solución de cloranfenicol se disolvió en etanol. Las concentraciones finales en los medios de cultivo fueron:

-Para *E. coli*: kanamicina sulfato (Km) 25 µg ml⁻¹, ampicilina (Amp) 200 µg.ml⁻¹, estreptomycin (Str) 100 µg.ml⁻¹, espectinomicina (Sp) 100 µg.ml⁻¹, tetraciclina (Tc) 10 µg.ml⁻¹ y gentamicina (Gm) 10 µg.ml⁻¹.

-Para *B. diazoefficiens*: cloranfenicol (Cm) 20 µg.ml⁻¹, Km 150 µg.ml⁻¹, Str 400 µg.ml⁻¹, Sp 200 µg.ml⁻¹ y Gm 100 µg.ml⁻¹.

II.2.5 Cinéticas de crecimiento

Para los estudios de cinéticas de crecimiento de las cepas de *B. diazoefficiens* se utilizaron Erlenmeyers de 250 ml de capacidad con 75 ml de medio de cultivo. Los cultivos iniciadores utilizados se prepararon como se describe en el inciso **II.2.2 a**. A partir del inóculo inicial, se hizo una dilución 1:100 en el mismo medio y se lo dejó crecer hasta alcanzar su fase exponencial (2-3 días). Una alícuota de dicho cultivo se centrifugó a 16.000 x g durante 5 minutos y se lavó. Para ello se retiró el sobrenadante y el pellet bacteriano se resuspendió en el mismo volumen de medio fresco. El medio fresco utilizado varió según el medio en el cual se inocularía dicha alícuota. A partir de este cultivo iniciador se inocularon los medios a ser estudiados (Evans y medios derivados de Evans) de manera de obtener una DO₅₀₀ inicial de 0,02-0,03 y se continuó su cultivo a 28 °C y 180 rpm durante un tiempo que duró entre 11 y 14 días.

Cuando fue necesario realizar pruebas preliminares de cinéticas de crecimiento se utilizaron frascos de penicilina de 120 ml con una capacidad de 35 ml. Las condiciones iniciales y de cultivo fueron las mismas que las descriptas anteriormente en este inciso con la diferencia de que el tiempo de evaluación se redujo a 7 días.

II.2.6 Estimación de la biomasa y recuento en placa

La biomasa total se estimó por lecturas de Absorbancia (Abs) a la longitud de onda indicada, 500 nm para *B. diazoefficiens* y a 600 nm para *E. coli*. El número de células viables se estimó por recuento en placa de las unidades formadoras de colonias por ml (UFC.ml⁻¹) crecidas sobre el medio YEM. Los recuentos se realizaron por el método de la gota (Hoben *et al.*, 1982), en el cual se colocan gotas de 5 µl, en las que se puede contar entre 3 y 30 UFC. Se colocaron de 10 a 15 gotas por dilución y se realizaron 2 o 3 diluciones por placa. Los recuentos se realizaron por triplicado. Las placas se incubaron a 28 °C y las colonias fueron visibles a partir de los 5 días.

II.2.7 Conservación de cepas bacterianas

Para su conservación a largo plazo las cepas fueron cultivadas en el medio correspondiente (LB para *E. coli* y YEM para *B. diazoefficiens*) hasta fase logarítmica

tardía. La preservación se realizó por congelamiento de alícuotas de dichos cultivos suplementados con glicerol estéril hasta alcanzarse concentraciones del 50 % v/v o del 25 % v/v para almacenarlas a -20 °C o -80°C, respectivamente.

II.2.8 Preparación de células electrocompetentes

Para obtener bacterias electrocompetentes se siguió la técnica de Tung y Chow (1995) con leves modificaciones. Se inocularon 300 ml de medio LB sin NaCl con 1 ml de un cultivo de la cepa *E. coli* DH5 α crecida hasta fase estacionaria. Este cultivo fue incubado a 37 °C y agitado a 180 rpm hasta que se alcanzó una densidad óptica a 600 nm de aproximadamente 0,6 unidades. En ese momento se procedió al enfriamiento del cultivo en agua-hielo durante 30 minutos. Luego, las células se centrifugaron durante 15 minutos a 4.000 x g y a 4 °C. Posteriormente se lavó cuidadosamente los pellets con 50 ml de glicerol 10 % frío. Este procedimiento se realizó dos veces y finalmente las bacterias se resuspendieron suavemente en glicerol al 10 % frío y se fraccionaron en alícuotas de 100 μ l, que se conservaron a -80 °C.

Para obtener bacterias electrocompetentes de las cepas *E. coli* Top10, S17-1 o BL21 DE3 se procedió de la misma manera.

II.2.9 Transformación de células electrocompetentes de E. coli

Los vectores plasmídicos contruídos en este trabajo se introdujeron en células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α , Top10 o BL21 DE3 mediante la técnica de electrotransformación. Para este procedimiento se utilizó un equipo Gene Pulser (Bio-Rad) y cubetas comerciales de 0,2 cm de ancho (GenePulserCuvette Bio-Rad), bajo las condiciones recomendadas por el fabricante (25 μ F, 200 Ω , 2,5 kV). Inmediatamente después de la electrotransformación, se adicionó a las células 800 μ l de medio LB fresco, y la mezcla se incubó 1 hora a 37 °C para permitir la expresión de la información genética contenida en el plásmido introducido. Pasado este tiempo, se sembraron las bacterias en medio LB sólido selectivo con el antibiótico para el cual el vector que introdujimos tiene un gen de resistencia. En los casos en que fue posible, también se adicionó al medio 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactósido (X-gal) con el fin de facilitar la selección

de transformantes por α -complementación. Las placas se incubaron el tiempo necesario en estufa a 37 °C.

II.2.10 Métodos de conjugación: Conjugación biparental

La conjugación biparental se llevó a cabo entre la bacteria donora *E. coli* S17-1 que posee el plásmido correspondiente y la bacteria receptora *B. diazoefficiens* USDA 110, siguiendo la técnica de Simon (Simon *et al.*, 1989) con algunas modificaciones según se indica a continuación. En primer lugar, se preparó un cultivo líquido de *B. diazoefficiens* USDA 110 en el medio PSY-ara y se dejó en crecimiento durante 2 días a 28 °C y en agitación a 180 rpm. El día anterior a realizar la conjugación se preparó un cultivo de la cepa donora de *E. coli* S17-1, portadora del plásmido de interés, en medio LB líquido con los antibióticos correspondientes y se la creció a 37 °C en agitación a 180 rpm durante una noche hasta saturación. Al día siguiente se realizó una dilución de la cepa de *E. coli* en medio LB fresco sin antibiótico, y se la creció en las condiciones anteriormente mencionadas hasta alcanzar su fase exponencial de crecimiento.

Cuando los cultivos de las dos cepas se encontraron en fase logarítmica, se mezclaron 800 μ l del cultivo de la cepa receptora con 600 μ l de la cepa donora. Se mezcló suavemente y se centrifugó a 660 x g durante ocho minutos. Luego, el pellet se resuspendió en 100 μ l de sobrenadante y se sembró en gota en el medio sólido PSY-ara sin antibiótico. A su vez, se realizaron controles de cada cepa por separado para descartar la hipótesis de que el crecimiento de colonias se debiera a mutaciones espontáneas. Para ello, se centrifugaron 800 μ l de cada cultivo de manera independiente a 660 x g durante 8 minutos, se resuspendió el pellet en 100 μ l de sobrenadante y se procedió de igual manera que con las conjugaciones.

Todas las placas se dejaron de 2-3 días a 28 °C en oscuridad para incrementar la masa celular. Una vez pasado ese tiempo se recolectó con un ansa la masa bacteriana y se resuspendió la misma en 800 μ l medio PSY-ara. De este resuspendido se sembraron 100 μ l directos, 100 μ l centrifugados y 100 μ l de una dilución 1/10, en medio YEM suplementado con el antibiótico correspondiente cuya resistencia está codificada en el plásmido entonces se selecciona las bacterias que poseen el plásmido) y Cloranfenicol (para prevenir contaminaciones ya que *B. diazoefficiens* USDA 110 es resistente a este

antibiótico). Se dejaron crecer las placas con las bacterias transconjugantes y con los controles durante 15 días a 28 °C.

II.3 Técnicas de biología molecular

II.3.1 Preparación de ADN plasmídico en pequeña escala ("minipreparación")

Los plásmidos de *E. coli* fueron preparados por la técnica de lisis alcalina descrita por Maniatis *et al.* (1982), con algunas modificaciones. En principio, la cepa de *E. coli* con el plásmido a purificar se cultivó en medio sólido LB con el antibiótico correspondiente. Luego, se recogió masa bacteriana en una punta de pipeta y se resuspendió en 200 µl de **solución I** (50 mM glucosa, 25 mM Tris-Cl pH 8 y 10 mM EDTA pH 8), utilizando mezclado con vortex. Se agregaron 200 µl de **solución II** (0,2 N NaOH y 1 % p/v SDS preparada al momento de ser utilizada) y se mezcló suavemente por inversión. A continuación, se adicionaron 200 µl de **solución III** (60 ml acetato de potasio 5 M; 11,5 ml ácido acético glacial y 28,5 ml de H₂O), agitando vigorosamente. La mezcla se centrifugó durante 8 minutos a 16.000 x g. Se tomó cuidadosamente el sobrenadante, evitando el precipitado y las partículas en suspensión, y se lo colocó en un tubo eppendorf nuevo. Se siguió con el procedimiento de Sílica-CleanUp para la obtención del plásmido (Boyle *et al.* 1995): se agregaron 10 µl de suspensión de sílica (o el volumen correspondiente considerando que se unen aproximadamente 200 ng de ADN por µl de suspensión) y se mezcló bien por agitación en vortex. Se sedimentó la sílica por centrifugación durante 10 segundos a 16.000 x g. Se realizaron tres lavados con 500 µl de solución de lavado para sílica (NaCl 50 mM, Tris 10 mM pH 7,5; EDTA 2,5 mM y etanol 50 %), resuspendiendo mediante vortex, centrifugando en microcentrífuga y eliminando el sobrenadante en cada lavado. Después del último lavado se centrifugó nuevamente para eliminar cualquier residuo de la solución de lavado y se dejó secar la sílica al aire para que evaporar el etanol residual. Una vez seca se adicionó un volumen adecuado de agua bidestilada estéril (25 a 50 µl, según la concentración final deseada) y se calentó a 60 °C durante 5 minutos. Se centrifugó durante 2 minutos a 16.000 x g en microcentrífuga y finalmente se tomó el sobrenadante conteniendo el ADN plasmídico, que se colocó en un nuevo tubo para su conservación a -20 °C.

La suspensión de sílica se preparó resuspendiendo 2 g de sílica en 15 ml de agua bidestilada estéril y lavando mediante centrifugados sucesivos durante 2 minutos a 2.000 x g. Finalmente se estima el volumen de sílica por pesada y resuspende en dos volúmenes de agua bidestilada estéril.

En los casos en los que fue necesaria una mayor pureza del ADN plasmídico se utilizó kit comercial Bioneer Accupeg "Plasmid Mini Extraction" siguiendo las instrucciones del fabricante.

III.3.2 Obtención de ADN molde para amplificaciones específicas sobre ADN genómico

Los ADN moldes para las amplificaciones por PCR fueron obtenidos utilizando alguna de las siguientes metodologías:

a1. Obtención de ADN por lisis bacteriana: las células provenientes de cultivos sólidos fueron resuspendidas en 100 µl de agua bidestilada estéril. La suspensión fue hervida por 15 minutos y centrifugada a 16.000 x g por 10 minutos, y 1 µl de los sobrenadantes fueron usados como ADN molde.

a2. Obtención de ADN mediante resinas: A partir de una estría bien aislada del cultivo bacteriano, se recogió masa bacteriana en una punta de pipeta y se la resuspendió en 500 µl de NaCl 1 M. Se vorteoó y se incubó durante 15 minutos a 4 °C. Se centrifugó durante 5 minutos a 16.000 x g y se lavó el pellet obtenido con 500 µl de agua bidestilada estéril. Nuevamente se vorteoó y centrifugó durante 5 minutos a 16.000 x g. Luego se siguió con el protocolo empleando una resina de calidad para biología molecular que tiene la capacidad de unir ADN (Walsh *et al.*, 1991). Para ello se agregaron 300 µl de resina Chelex-100 (Bio-Rad) de concentración 6 % p/v en agitación y se mezcló mediante movimientos vigorosos con los dedos. Se incubó durante 20 minutos a 56 °C, se vorteoó y luego volvió a incubarse pero durante 8 minutos a 99 °C. Finalmente se vorteoó y se conservó a 4 °C, temperatura a la que se ha verificado que estos moldes pueden almacenarse con éxito durante largos períodos de tiempo.

II.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un ciclador térmico iCycler (BioRad) o en un ciclador Biometra Tone (Analytik jena, Alemania). La composición de las mezclas de reacción fue: 3 mM MgCl₂, 200 μM dNTP'S, 2 U de Taq polimerasa, buffer de reacción 10X y 10 μM de cada uno de los cebadores, completando con agua un volumen final de mezcla de reacción, para todos los casos de 10 μl. También se adicionó dimetilsulfóxido (DMSO) en concentración final 10 %. Los cebadores empleados se encuentran listados en la **Tabla II.3.1** y fueron sintetizados por encargo en Operon Comp. (EEUU) o Invitrogen - Thermo Fisher Scientific (EEUU).

El ciclado se hizo siguiendo el esquema básico de una desnaturalización inicial: 35 ciclos de desnaturalización, hibridación y elongación; y por último, una elongación final. En todos los casos, la desnaturalización se realizó a 94 °C y la elongación a 72 °C (temperatura óptima de elongación de la Taq polimerasa). Dependiendo del juego de cebadores utilizado, se fijó la temperatura de hibridación y los tiempos se determinaron en función del tamaño del fragmento que se quiso amplificar en cada caso, tal como se describe en las secciones correspondientes.

Cuando fue necesario obtener fragmentos con extremos romos se utilizó la enzima PFU polimerasa. La composición de las mezclas en estos casos fue: buffer de reacción 10X (2 μl) (conteniendo 20 mM de Mg⁺²), dNTPs con una concentración de 2 mM (2 μl), DMSO en concentración final de 10 % (1 μl), 1U de la ADN polimerasa PFU (0,5 μl), 10 μM de cada uno de los cebadores (2,5 μl), 2 μl de ADN molde y agua hasta completar los 20 μl finales de reacción.

Al finalizar las reacciones de PCR, 10 μl de cada uno de los productos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa conteniendo 0,5-1,0 μg/ml de bromuro de etidio. El perfil de bandas obtenido fue fotografiado bajo iluminación ultravioleta.

II.3.4 Electroforesis de ADN

II.3.4.a Separación e identificación de fragmentos de restricción o de amplificación por PCR mediante electroforesis en geles de agarosa

La separación de fragmentos de ADN se llevó a cabo mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa empleando TBE (Tris 89 mM, EDTA 2,5 mM, H₃BO₃ 89 mM, pH 8,2) como buffer de corrida. Según el tamaño del fragmento que se esperaba observar se utilizó una concentración de agarosa adecuada disuelta en buffer Tris-bórico-EDTA (TBE, Tris 89 mM, EDTANa₂ 2,5 mM, H₃BO₃ 89 mM, pH 8,2). Para visualizar fragmentos de entre 100pb y 1000pb se utilizó una concentración de agarosa de 1,5 % y para fragmentos de entre 1000pb y 2000pb una concentración de 1 %. En aquellos casos donde fue necesario evaluar productos de mayor peso molecular como por ejemplo ADN plasmídico se utilizó agarosa al 0,8 %. Las muestras se mezclaron para su siembra con una solución de carga que contiene sacarosa 40 % p/v y azul de bromofenol 0,25 % p/v en concentración 6X.

II.3.4.b Revelado de los geles y fotografía

El agregado de 0,5 µg/ml de bromuro de etidio a los geles de agarosa permite la visualización de los fragmentos de ADN por transiluminación con luz ultravioleta de $\lambda = 260$ nm.

El registro de los resultados se realizó mediante fotografía de los geles con una cámara digital Kodak modelo DC 120 (software-EDAS-Kodak) bajo iluminación ultravioleta.

II.3.4.c Estimación de los pesos moleculares de fragmentos por electroforesis en gel de agarosa

El tamaño de los fragmentos de restricción fue determinado utilizando como patrón de peso molecular el marcador Lambda DNA/*Hind*III y el marcador 100 bp DNA Ladder. El primer se obtiene a partir de ADN del fago λ que es digerido con *Hind*III hasta generar bandas entre 0.125 kb y 23 kb, aptas para ser utilizadas como marcadores de peso molecular en geles de agarosa. Este marcador se compone de 8 fragmentos de ADN

individuales purificados (en pares de bases): 23130*, 9416, 6557, 4361*, 2322, 2027, 564 y 125 (**Figura II.1-A**).

El marcador Ladder 100 plus, en cambio, se obtiene a partir de plásmidos de ADN digeridos completamente con enzimas de restricción hasta generar bandas entre 100 bp y 1 kb. Se compone de 10 fragmentos individuales purificados por cromatografía (en pares de bases): 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 y 100. El fragmento de 500 bp presenta una intensidad superior y se comporta como banda de referencia (**Figura II.1- B**).

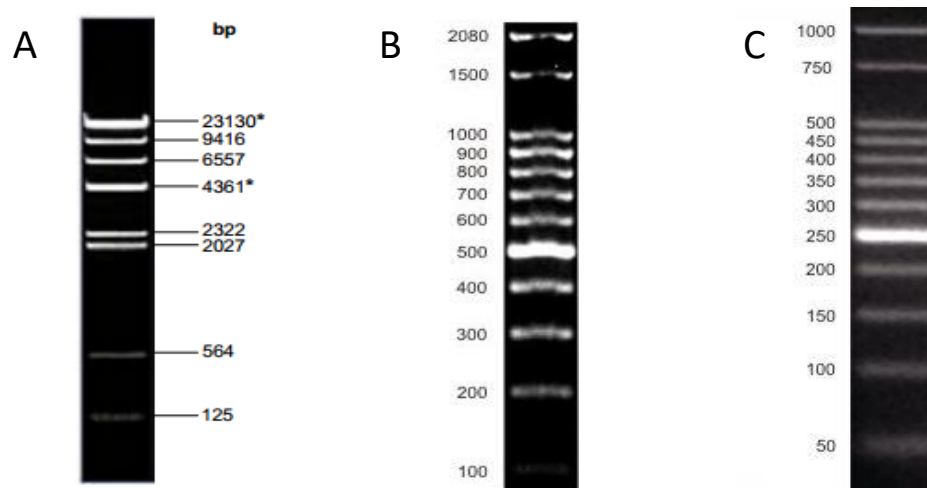


Figura II.1 Marcadores de peso molecular **A)** Lambda *Hind*III corrido en un gel de agarosa al 1 %, **B)** Ladder 100 pb plus corrido en un gel de 1,7 %, **C)** Ladder 50 pb plus en un gel de agarosa 2 %.

El marcador Ladder 50pb plus por otra parte muestra fragmentos de entre 50 pb y 1000 pb. En particular, se pueden observar 12 fragmentos de ADN doble cadena de 50 pb a 500 pb con incrementos discretos de 50 pb, y dos bandas adicionales de 750 pb y 1000 pb (**Figura II.1- C**).

II.3.4.d Extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa

En algunas ocasiones se obtuvieron los fragmentos de interés a partir de los geles de agarosa. Los fragmentos extraídos preferentemente no deben ser expuestos a luz ultravioleta para evitar cualquier tipo de daño en el ADN que queremos utilizar. Luego

de cortar la banda del gel con el fragmento que se deseaba se lo colocó en un eppendorf de 1,5 ml. La purificación se realizó con el kit comercial Bioneer Accuprep “Gel Purification kit”

II.3.5 Extracción de ARN total

La extracción de ARN total de *B. diazoefficiens* USDA 110 se realizó a partir de cultivos en fase exponencial temprana (2 días de cultivo) o tardía (5 días de cultivo) los que fueron centrifugados a 14.000 x g durante 30 minutos a 4 °C. Posteriormente, los precipitados se resuspendieron en buffer TE pH 8 en presencia de lisozima (SIGMA) y las muestras se incubaron a 37 °C durante 30 minutos para ayudar a la lisis bacteriana. Luego se agregó 1 ml de Trizol (Invitrogen) y se mezcló por inversión y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregó 0,2 ml de cloroformo y luego de agitar vigorosamente se incubó 2 minutos a temperatura ambiente. Para separar las fases se centrifugó a 14.000 x g durante 20 minutos. Se recuperó la fase acuosa, se le agregó 0,5 ml de isopropanol frío y se dejó 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se centrifugó a 14.000 x g durante 20 minutos y el pellet obtenido se lavó con etanol 75 % y se dejó secar 20 minutos a temperatura ambiente.

El ARN se resuspendió en 20 µl de agua DEPC (dietilpirocarbonato) y se cuantificó por medida de su absorbancia a 260 nm. Luego, se trató cada muestra con ADNasa I (Invitrogen) según lo indica el fabricante para eliminar cualquier contaminación de ADN que existiese.

Se verificó la ausencia de ADN realizando una PCR previa a la retrotranscripción con cebadores específicos *glnII_RT_Fw/glnII_RT_Rv* que hibridan en el gen *glnII* (blr4169) (**Tabla II.3.2**). En aquellos casos donde el ARN a evaluar provenía de la cepa mutante *ΔglnII* (que tiene delecionado el gen *glnII*) se utilizó un par alternativo de cebadores, *glnA1_RT_Fw/glnA1_RT_Rv*, que hibridan en una región interna del *glnA1* (blr4949) (**Tabla II.3.2**).

La muestra conteniendo ARN se conservó a -80 °C.

II.3.6 Transcripción Reversa

El ADN complementario (ADNc) se obtuvo a partir del ARN total utilizando la enzima M-MLV (Invitrogen) y cebadores al azar (Invitrogen), según el protocolo comercial, y se conservó a -20 °C hasta el momento de ser utilizado como molde de PCR.

II.3.7 Reacción en cadena de la polimerasa sobre ADNc

Para llevar a cabo los análisis de presencia o ausencia de transcritos y para los análisis de co-expresión se utilizó la técnica de PCR siguiendo los pasos descritos en el inciso **II.3.3**. En este caso, se utilizó como ADN molde el ADN complementario obtenido mediante Transcripción Reversa y la enzima Taq polimerasa.

II.3.8 Cuantificación relativa de transcritos mediante real time PCR (qRT-PCR)

La expresión relativa de genes seleccionados se determinó mediante real time PCR cuantitativa utilizando un equipo qTOWER 2.0 (Analytik jena, Alemania). Los cebadores utilizados se detallan en la **Tabla II.3.2**. Los mismos fueron diseñados para amplificar fragmentos de entre 80 a 200 pb en regiones no homólogas de los genes seleccionados. Para la mezcla de reacción se utilizó el reactivo iQ-SYBR green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante. Los amplicones se analizaron con el software qPCRsoft system (versión 3.1 software). Los datos obtenidos se procesaron utilizando el método $\Delta\Delta C_t$ para calcular la expresión de los genes de interés en la cepa mutante relativo a la expresión de dichos genes en la cepa salvaje considerando como control interno al gen *sigA* (bll7349) cuya transcripción ha sido propuesta como constitutiva (Hauser *et al.*, 2006). En aquellos casos donde se analizó la expresión diferencial de genes en la cepa salvaje *B. diazoefficiens* USDA 110 según el medio de cultivo en el que había sido crecida también se utilizó el método $\Delta\Delta C_t$ y la expresión de *sigA* como control interno.

Para el análisis de los resultados se consideraron como sobreexpresados aquellos genes que presentan un *fold change* mayor a 2, mientras que consideramos reprimidos

aquellos cuyo *fold change* sea menor a -2. El *fold change* se define como el rq ($rq=2^{\Delta\Delta Ct}$) cuando el rq es mayor a 1 y es $-1/rq$ cuando el rq es menor a 1.

II.3.9 Cuantificación de ADN y ARN

Cuando fue necesario el ADN o ARN obtenido se cuantificó mediante el uso de un espectrofotómetro Spectrophotometer ND-100 (Nanodrop Technologies Inc.)

II.3.10 Tratamientos enzimáticos del ADN

Las digestiones con enzimas de restricción (*EcoRI*, *KpnI*, *HindIII*, *BamHI*, *SmaI*, *SphI*, *PstI*) y las ligaciones de ADN (con T4 ligasa) se realizaron en las condiciones óptimas para cada enzima, siguiendo las indicaciones de temperatura y buffer propuestas por el fabricante, y las recomendaciones descriptas en Sambrook *et al.* (1989). Las reacciones se llevaron a cabo habitualmente con 0,5-5,0 μ g de ADN, 0,1 volumen del buffer 10 X y 0,5-1 unidad de la enzima a utilizar en un volumen final de 10-25 μ l. Las mezclas de reacción fueron incubadas a la temperatura óptima de las enzimas utilizadas por un período de tiempo mayor que 4 horas en el caso de las enzimas de restricción y 12 a 16 horas en el caso de T4 ligasa (la ligación se incubó a 4 °C en heladera durante una noche). Luego de los tratamientos con enzimas de restricción se procedió a la inactivación de las mismas incubando la mezcla de reacción a la temperatura y tiempo correspondientes para cada una de dichas enzimas según las indicaciones del fabricante.

II.3.11 Secuenciación de los fragmentos de ADN

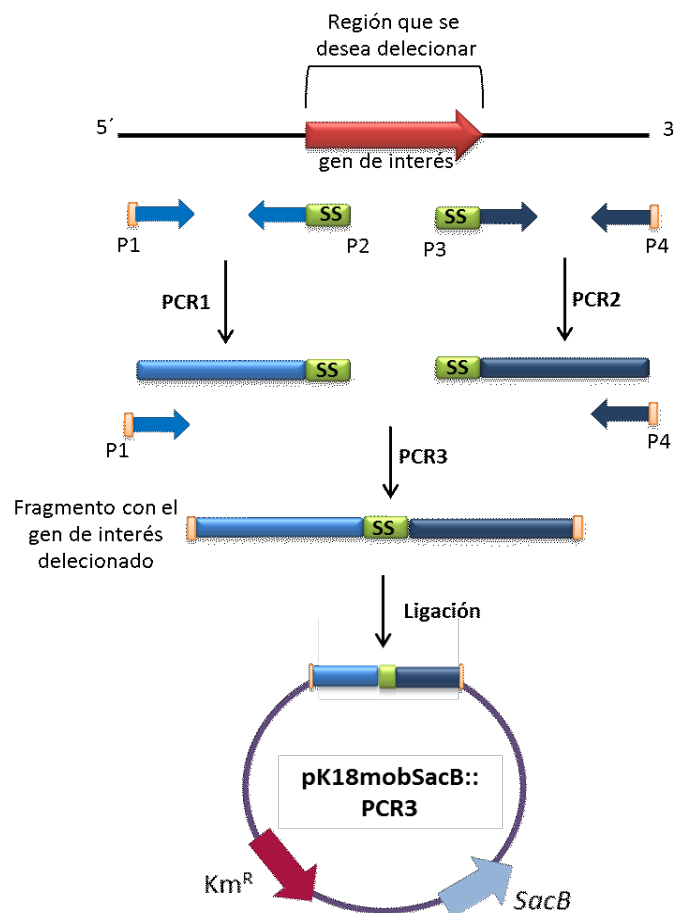
El ADN fue secuenciado utilizando un analizador ABI3730XL, por encargo en Macrogen Inc. (Corea del Sur).

II.3.12 Estrategia general para la obtención de cepas mutantes limpias

La técnica que describiremos a continuación fue descripta para su uso en rizobios por Sukdeo y Charles (2003). Esta técnica permite delecionar un determinado gen de interés

sin provocar cambios en el marco de lectura, lo que resulta esencial para el análisis de genes que se encuentran formando parte de unidades transcripcionales.

Como podemos observar en la **Figura II.2** el primer paso de esta estrategia consiste en diseñar cebadores específicos que hibriden por fuera del gen que deseamos deletar: un par de cebadores que amplifiquen la región río arriba de dicho gen (P1 y P2) para llevar a cabo una PCR que denominaremos PCR1, y un segundo par de cebadores que amplifiquen la región río abajo (P3 y P4) para realizar una segunda PCR, la PCR2. La diferencia de esta estrategia consiste en adicionar al extremo 5' del cebador *Reverse* de la PCR1 (P2) una secuencia sintética de 21 nucleótidos y en el extremo 5' del cebador *Forward* de la PCR2 (P3) la secuencia sintética complementaria. A los cebadores P1 y P4 también puede adicionarse sitios de corte para enzimas de restricción que permitan posteriormente un clonado direccionado.



SS : secuencia sintética y complementaria de 21 nt
 : sitio de corte para enzima de restricción

Figura II.2 Esquema general de la estrategia de clonado utilizada para obtener la construcción que permite deletar un gen de interés sin modificar el marco de lectura.

Una vez que se realizan las PCR1 y PCR2, los fragmentos obtenidos se utilizan en iguales concentraciones como molde para llevar a cabo una tercera reacción de PCR (PCR3) utilizando los cebadores P1 y P4. Como consecuencia de esta PCR3 se obtiene un fragmento final que posee el fragmento río arriba del gen a deletar unido por la secuencia sintética a la región río abajo del mismo. Lo más importante es que la presencia de la secuencia de 21nt permite mantener sin modificaciones el marco de lectura. El fragmento amplificado mediante la PCR3 se clona (utilizando enzimas de restricción seleccionadas especialmente para cada gen a deletar) al vector pK18mobSacB (Schafer *et al.*, 1994), un plásmido suicida en rizobios que contiene un cassette de resistencia a Km.

Una vez obtenida y secuenciada la construcción del pK18mobSacB con el fragmento amplificado por la PCR3, la misma se introduce por transformación en una cepa *E. coli* S17-1 (Simon *et al.*, 1983) y se moviliza a *B. diazoefficiens* USDA 110 mediante una conjugación biparental como se describió previamente en los incisos **II.2.9** y **II.2.10**. La selección de transconjugantes se lleva a cabo en medio YEM suplementado con Km. Aquellas colonias resistentes a Km provenientes del primer evento de recombinación contienen el vector pK18mobSacB, y por lo tanto, el gen *sacB* que codifica para la levansucrasa una enzima que en presencia de sacarosa es capaz de generar un compuesto tóxico para las bacterias Gram-negativas. Debido a esto, los clones de transconjugantes simples seleccionados por resistencia a Km se plaquean en cajas YEM que con 10% de sacarosa con el objetivo de inducir la pérdida del plásmido integrado, y por ende del gen de interés, mediante una segunda recombinación homóloga.

Aquellas colonias capaces de crecer en YEM-sacarosa 10% se repican en placas réplicas YEM-Cm / YEM-Km. La cepa *B. diazoefficiens* USDA 110 es resistente a Cm por lo que las colonias Km^s-Cm^r pueden ser el resultado de una doble recombinación que haya revertido el genotipo al de la cepa salvaje o de una segunda recombinación que haya deletado el gen de interés. Es por esto la deleción del gen de interés se corrobora mediante una PCR con cebadores externos a los sitios de recombinación.

II.4 Técnicas utilizadas para el análisis de proteínas

II.4.1 Obtención de proteínas totales para inmunodetección

Para los ensayos de inmunodetección las proteínas totales se obtuvieron a partir de cultivos de *B. diazoefficiens* crecidos durante 5 días a 28 C y 180 rpm en el medio que se deseaba evaluar (Evans o sus derivados). Para evaluar medios limitados en N (Evans glutamato o Evans NH₄⁺), la muestra se obtuvo a partir de 300 ml de cultivo. Mientras que cuando se evaluaron condiciones de exceso de N (Evans o Evans NG) se obtuvo la muestra a partir de 35 ml de cultivo.

En primer lugar, los cultivos se centrifugaron durante 20 minutos a 12.500 x g. Luego, los pellets bacterianos se resuspendieron en buffer fosfato (PBS) de manera de obtener resuspendidos con una DO_{500nm}= 20-30. Esta DO fue puesta a punto en nuestro laboratorio para permitir la correcta lisis bacteriana.

A 1 ml del resuspendido se le adicionó una mezcla de perlas de vidrio de 0,1 mm (450 mg) y de 0,5 mm (50 mg) y se lisó mecánicamente utilizando un homogeneizador Precellys 24 (Bertin Technologies) a 6.000 x g durante 20 segundos (este procedimiento se realizó 3 veces sobre la misma muestra para asegurar la lisis bacteriana). Los lisados se centrifugaron 5.000 x g durante 5 minutos en frío (4 °C) y se freezó el sobrenadante para realizar ensayos posteriores.

II.4.2 Análisis de proteínas mediante geles de poliacrilamida discontinuos en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

Se empleó la metodología de Laemmli (1970). Los geles de apilamiento se prepararon con 5 % de poliacrilamida en Tris -HCl a pH 6,8, mientras que los de separación se hicieron con 12,5 % de poliacrilamida en Tris-HCl a pH 8,8. En ambos casos con el agregado de SDS y β-mercaptoetanol, para obtener desnaturizantes y disociantes. Las corridas se llevaron a cabo durante 30 a 60 minutos a voltaje constante de 100 o 130 volts.

II.4.3 Tinción de las proteínas

-Tinción Coomassie Blue R-250: para esta tinción el gel se incubó en solución de tinción (0,2 % Coomassie Blue R-250 disuelto en agua bidestilada, metanol, ácido acético (45:45:10) por al menos 1 hora. Para la visualización de las bandas el gel se destiñó en una solución agua:metanol:ácido acético en proporción 50:40:10.

-Tinción Coomassie coloidal: en este caso las proteínas del gel se fijaron con una **solución fijadora** (30 % v/v de etanol y 2 % v/v de ácido fosfórico) durante toda la noche. Posteriormente se realizaron 3 lavados durante 30 minutos con agua destilada. Se agregó **solución de tinción** (18 % v/v de metanol, 17 % p/v de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 2 % v/v de ácido fosfórico) y se dejó en agitación durante 1 hora. Luego se agregó 0,5 g.l⁻¹ Coomassie Blue R-250 en polvo al gel sumergido en la solución de tinción y se agitó suavemente por 1-2 días. Finalmente se realizaron lavados con agua destilada.

II.4.4 Cuantificación de proteínas

Las proteínas que se utilizaron en este trabajo se cuantificaron con el método de Bradford (1976), empleando un reactivo comercial (Bio- Rad Protein Assay). Se siguió el protocolo del fabricante para la técnica de medida en microplaca y utilizando como estándar seroalbúmina bovina (BSA), de concentración 10 mg.ml⁻¹, para confeccionar la curva de calibración. Las medidas de absorbancia a 595 nm se realizaron en un lector de microplaca Benchmark Plus (BIO-RAD).

II.4.5 Inducción de expresión de la proteína glutamino sintetasa II (GSII)

Para la expresión de la proteína GSII se creció durante toda una noche un cultivo de *E. coli* BL21 DE3 (pET22b(+):*glnII*) (conteniendo el gen *glnII* que codifica para la enzima GSII) en medio LB con Amp a 37 °C. Al día siguiente se hizo una dilución 1:100 del cultivo en fase estacionaria en 150 ml de LB sin antibiótico y se dejó crecer 2 horas a 37 °C en agitación hasta alcanzar una DO_{600nm} aproximada de 0,6. Luego, se tomó una muestra de 1 ml de cultivo sin inducir para ser posteriormente utilizada como control de

proteínas totales. Esta fracción se centrifugó a 7.000 x g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se freezó el pellet bacteriano.

Al resto del cultivo, se le agregó la cantidad necesaria de IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) 1M para llegar a una concentración de 0,3 mM y se lo dejó nuevamente creciendo en agitación a 37 °C.

Para establecer el tiempo deseado de inducción se tomaron 3 alícuotas del cultivo creciendo con IPTG, de 1 ml cada una, a tiempos diferentes: 2hs, 5 hs y 24 hs post inducción. Estas alícuotas se centrifugaron a 5.000 x g durante 5 minutos en frío (4 °C). Los pellets obtenidos se resuspendieron en 100 μ l de Buffer Laemli 1X (con β -mercapto) y se hirvieron durante 15 minutos para obtener las proteínas totales, que posteriormente se observaron en un gel SDS-PAGE.

En paralelo, a los mismos tiempos post-inducción, se guardó una fracción de 3 ml del cultivo crecido con IPTG para posteriormente determinar la presencia de la proteína de interés en la fracción soluble o en la fracción insoluble. Para ello, los 3 ml de cultivo se centrifugaron a 5.000 x g durante 5 minutos en frío (4 °C). Los pellets bacterianos obtenidos se resuspendieron en 1ml de buffer fosfato (PBS - cantidades por litro de agua destilada: KH_2PO_4 0,43 g, Na_2HPO_4 1,48 g, NaCl 7,2 g a pH 7,2) y se lisaron mecánicamente como se describió en el inciso **II.4.1**.

Finalmente, las muestras lisadas se centrifugaron 5.000 x g durante 5 minutos en frío (4 °C) y se separó el sobrenadante (donde encontraremos la fracción soluble) del pellet bacteriano (fracción insoluble). A 300 μ l de cada una de las fracciones solubles se le adicionó 60 μ l de Buffer Laemli 4X (con β -mercapto) y se hirvieron durante 15 min. A la par, el pellet bacteriano donde se encontraba la fracción insoluble se resuspendió en 100 μ l de Buffer Laemli 1X (con β -mercapto) y se hirvieron durante 15 min. Estas muestras se corrieron en un gel SDS-PAGE para detectar la presencia de la proteína GSII en las distintas fracciones.

Una vez seleccionado el tiempo de inducción, se preparó nuevamente un cultivo de *E. coli* BL21 DE3 (pET22b(+)::*glnII*) siguiendo las condiciones descriptas previamente para obtener la muestra que será purificada como se describe en el inciso **II.4.5**. Luego, a las 2 horas post inducción se tomó una muestra de 1 ml de cultivo, se centrifugó a 7.000 x g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se freezó el pellet bacteriano para corroborar posteriormente que la inducción haya sido exitosa. 100 ml del cultivo

restante se centrifugaron a 7.000 x g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se freezó el pellet bacteriano para luego llevar a cabo la purificación de la proteína como se describe en el inciso **II.4.7**.

Finalmente, los pellets bacterianos provenientes de 1 ml de cultivo sin inducir y de 1 ml del cultivo de 2 horas post-inducción se resuspendieron en 100 µl de Buffer Laemli 1X (con β-mercapto) y se hirvieron durante 15 min. Estas muestras se corrieron en un gel SDS-PAGE para corroborar que la inducción de la proteína GSII se haya llevado a cabo.

II.4.6 Identificación de la proteína GSII por MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometer)

Una vez confirmada la inducción de la expresión de la proteína GSII, se corrió un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y se lo coloreó con la tinción Coomassie coloidal. Posteriormente, se cortó un taquito de un gel correspondiente a la posición donde se encontraba dicha proteína y se envió la muestra para ser analizada por el servicio brindado por el Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa MALDI-TOF (CEQUIBIEM).

Para estimar la posición de la proteína se corrió en el mismo gel de poliacrilamida la muestra de interés y una alícuota de flagelinas de *B. diazoefficiens* USDA 110 purificadas siguiendo el protocolo descrito por Althabegoiti y col. (2011).

B. diazoefficiens tiene dos sistemas de flagelos, uno fino constituido por flagelinas de 33 kDa y otro grueso constituido por flagelinas de 65 kDa (Kanbe *et al.*, 2007; Althabegoiti *et al.*, 2008). Estas flagelinas se utilizaron como patrón de peso molecular ya que el tamaño de la proteína GSII con la etiqueta de histidina es de 36 kDa, similar al tamaño de las flagelinas que componen el flagelo fino (33 kDa).

II.4.7 Purificación de la proteína GSII en cultivo Batch

La purificación de la proteína GSII se llevó a cabo gracias a la fusión de dicha proteína con la etiqueta His-Tag utilizando la resina de afinidad Ni-NTA (Nikel-nitrilotriacetic acid – Invitrogen). El protocolo utilizado se basó en el descrito en “The QIAexpressionist” (2003) para cultivos en batch en condiciones desnaturalizantes con algunas modificaciones.

En primer lugar, se resuspendió el pellet proveniente de 50 ml de cultivo con 2 horas de inducción (obtenido como se describió previamente en inciso **II.4.5**) en 4 ml de Buffer de Lisis (NaH_2PO_4 100 mM – Tris 10 mM – urea 8 M Imidazol 5 mM) previamente equilibrado a 37 °C, y se le adicionó 1 mM del inhibidor de proteasa fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF).

Posteriormente, las bacterias se lisaron mecánicamente con perlitas de sílice utilizando un homogeneizador Precellys 24 (Bertin Technologies). Los lisados se centrifugaron a 7.000 x g durante 5 minutos y el sobrenadante obtenido se puso en contacto con 1 ml de resina de afinidad Ni-NTA previamente lavada con agua bidestilada y equilibrada con Buffer de Lisis. El sobrenadante y la resina se dejaron en agitación durante 1-2 horas a temperatura ambiente.

Una vez transcurrido el tiempo deseado se dejó precipitar la resina por gravedad y se freezó el sobrenadante. La resina con la proteína adherida se lavó 3 veces durante 15 minutos en agitación con 4 ml de Buffer de Lavado con concentraciones crecientes de Imidazol (NaH_2PO_4 50 mM – NaCl 300 mM – Imidazol 5 mM/10 mM/20 mM). Entre cada lavado se dejó decantar la resina y suavemente se retiró el sobrenadante para posteriormente freezarlo.

La elución de la proteína se llevó a cabo utilizando Buffer de Elución Nativo con concentraciones crecientes de Imidazol (NaH_2PO_4 50 mM – NaCl 300 mM – 50 mM/ 100 mM/ 250 mM). En cada elución se pusieron en contacto 1 ml del Buffer de Elución con la resina y se lo dejó durante 15 minutos en agitación a temperatura ambiente. Nuevamente, entre cada paso se dejó decantar la resina y suavemente se retiró el sobrenadante para freezarlo.

Como control de la purificación se corrió en un gel de SDS-PAGE una muestra sin inducir, una de la proteína 2 horas post-inducción y las distintas fracciones de lavado y de elución. De esta manera se obtuvo la mayor parte de la proteína purificada en la última fracción eluída.

Por último, se llevó a cabo la diálisis de la última fracción de elución utilizando una membrana de celulosa (MEMBRA-CEL MC18 X 100 CLR, Viskase Companies, USA) contra buffer fosfato (PBS). 1 ml de la proteína eluída se puso en contacto con 100 ml de PBS y se lo dejó en agitación suave durante 3 horas a 4 °C. Se realizaron 2 cambios de buffer

fosfatos dejando el último cambio en contacto durante toda una noche manteniendo la agitación suave a 4 °C.

II.4.8 Obtención de anticuerpo anti GSII

Para obtener el antisuero reactivo frente a la proteína GSII se inmunizaron, mediante inyección intraperitoneal, 2 ratones con 3-4 µg de proteína utilizando adyuvante de Freund. Se realizaron dos inmunizaciones más sin adyuvante con intervalos de 14 días, después de las cuales los ratones fueron sangrados a blanco y se obtuvo el suero de los mismos. Este servicio fue llevado a cabo por el laboratorio VacSal de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

II.4.9 Inmunodetección

Las muestras de proteínas a evaluar por inmunodetección se obtuvieron como se describe en el inciso **II.4.1**, y en primer lugar fueron sometidas a una corrida electroforética. Luego, fueron transferidas a una membrana de difluoruro de olivinildieno (PVDF) (Immobilon, Millipore) utilizando el equipo Mini Trans-Blot transfer Cell (BioRad) según las indicaciones del fabricante. Las membranas transferidas fueron bloqueadas durante 1 hora con las proteínas de leche descremada 5 % p/v en buffer PBS. Seguidamente la membrana se trató con el primer anticuerpo en una dilución 1:500 en buffer PBS - leche 5 % p/v. La membrana con el anticuerpo se incubó durante una noche a 4 °C y con agitación suave. Se retiró la solución con el anticuerpo y se realizaron 3 lavados con buffer PBS- leche 5 % p/v. Luego se agregó el segundo anticuerpo específico para IgG-HRP de ratón conjugado con peroxidasa, disuelto en PBS - leche 5 % p/v en una dilución 1:1000, y se incubó durante 2-3 horas a temperatura ambiente con agitación suave. Se retiró la solución del segundo anticuerpo y se realizaron tres lavados con PBS - Tween 0,1 %. Finalmente, en el momento del revelado se preparó una solución A (500 µl Tris – HCl 1M pH 8,5, 52 µl H₂O₂ 30 %, y agua bidestilada hasta llegar a un volumen final de 5 ml) y una solución B (500 µl Tris – HCl 1M pH 8,5, 50 µl de luminol 250 mM en dimetilsulfóxido (DMSO), ácido p-coumárico 90 mM en DMSO, en un volumen final de 5 ml). Las soluciones A y B se mezclaron y la membrana se sumergió en

la solución resultante. El revelado se llevó a cabo en un adquirente de imágenes EpiChemi3 Darkroom (UVP).

II.5 Ensayos bioquímicos

II.5.1 Medida de actividad glutamino sintetasa (GS)

Para llevar a cabo la medida de la actividad enzimática GS se utilizaron cultivos bacterianos en fase exponencial tardía (5 días de crecimiento). Cuando se realizaron las medidas de la actividad GS de cultivos en medios limitados en N éstos se centrifugaron durante 30 minutos a 12.500 x g y el pellet obtenido se lavó con NaCl 1 mM para remover el exopolisacárido producido por las bacterias. Posteriormente los pellets limpios se resuspendieron en el mismo volumen del medio original estéril.

Los cultivos fueron permeabilizados durante 5 minutos a 28 °C y 180 rpm con bromuro de hexadecil-trimetilamonio (CTAB) 1 mg.ml⁻¹ y posteriormente las células se recuperaron por centrifugación. Las bacterias se resuspendieron en una solución de KCl al 1 % de manera de obtener una relación **DO del cultivo inicial/volumen del pellet resuspendido** mayor a 0,65. Esta relación fue previamente optimizada en nuestro laboratorio, donde se vió que a valores mayores de 0,65 la reacción enzimática puede ser detectada correctamente.

Los pellets resuspendidos fueron utilizados como muestra para los dos métodos de determinación enzimática que se describen a continuación:

II.5.1.a Ensayo γ -glutamyltransferasa

La actividad enzimática se midió mediante la reacción γ -glutamyl transferasa (Bender *et al*, 1977). La mezcla de reacción contenía: glutamina 20 mM, imidazol-HCl 135 mM (pH 7,15), hidroxilamina-HCl 18 mM, MnCl₂ 0,27 mM, K₃ASO₄ 25 mM (pH 7,15), ADP 0,36 mM y CTAB 0,1 mg.ml⁻¹. La mezcla de reacción se ajustó a pH 7,55 con NaOH.

450 μ l de la mezcla de reacción se pusieron en contacto con 50 μ l de la muestra (obtenida como se describió anteriormente en el inciso II.5.1) y 50 μ l de glutamina 0,2M y se incubó a 37 °C durante 15 minutos para aquellas muestras provenientes de medios con exceso de N (Evans, Evans N y Evans Bajo C) o durante 30-45 minutos para aquellas

muestras provenientes de medios con limitación de N (Evans glutamato, Evans Bajo N o Evans NH_4^+).

La reacción se detuvo mediante el agregado de una solución que contenía $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 55 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, ácido tricloroacético 20 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ y HCl 8 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$. Luego se midió la absorbancia a 540 nm y se calculó la cantidad de γ -glutamil hidroxamato presente sabiendo que 1 μmol de γ -glutamil hidroxamato da 0,532 unidades de absorbancia. La unidad de actividad específica GS se definió como la cantidad de enzima que produce 1 μmol de γ -glutamil hidroxamato por minuto por mg de proteínas totales.

II.5.1.b Ensayo Biosintético

La mezcla de reacción para el ensayo biosintético fue modificada de la descrita por Shapiro y Stadtman (1970) y consistió en: 100 mM imidazol-HCl (pH 7,15), 100 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 100 mM glutamato de sodio, 100 mM NH_4Cl y 20 mM de ATP. La reacción se inició agregando 80 μl de la muestra de cultivo bacteriano a 80 μl de la mezcla de reacción y se incubó de 15 a 20 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo agregando 640 μl de una solución de $\text{FeSO}_4 - 7,5 \text{ mM H}_2\text{SO}_4$ y 60 μl de $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 6,6 % - H_2SO_4 3,75 M. Las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 16.000 x g y se midió la absorbancia a 660nm. La actividad GS se expresó como $\text{Abs}_{660\text{nm}}$ por minuto por mg de proteínas totales.

Para la obtención de proteínas totales utilizadas para relativizar ambos ensayos de actividad enzimática GS, se procedió a la lisis bacteriana de manera mecánica como se describe en el inciso **II.4.1** pero a partir de la muestra con la que se llevan a cabo las determinaciones enzimáticas.

II.5.2 Cuantificación de amonio en sobrenadantes de cultivos de B. diazoefficiens

La detección de NH_4^+ se llevó a cabo siguiendo el método del Indofenol que es el método de Berthelot (Solorzano, 1969). Las soluciones stock se prepararon como se describe a continuación:

- Solución fenólica: 5,55 ml de fenol saturado en agua en 44,45 ml de etanol 96°.
- Nitroprusiato de sodio: 0,25 g of $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 50 ml de agua bidestilada.

- Citrato alcalino: 10 g de citrate trisodico y 0,5 g de NaOH en 50 ml de agua bidestilada.
- Solución oxidativa: 2 ml de lavandina comercial (NaClO 55 g.l^{-1}) en 48 ml of la solución de citrato alcalino.
- Solución estándar NH_4Cl 50 mM: 0,26745 g de NH_4Cl en 100 ml de agua bidestilada.

Brevemente, se partió de 10 ml de cultivo de cada una de las cepas de *B. diazoefficiens* a evaluar, los cuales fueron crecidos a 28 °C y a 180 rpm durante 2 días (para evaluar el fenotipo en fase exponencial temprana de crecimiento), 5 días (fase exponencial tardía) ó 10 días (en fase estacionaria). Los cultivos se centrifugaron a 16.000 x g durante 10 minutos, se guardaron los pellets bacterianos para cuantificar proteínas totales y se separó 1 ml de cada uno de los sobrenadantes para realizar las determinaciones. Cuando fue necesario se realizaron diluciones de dichos sobrenadantes para realizar las medidas. El ensayo se realizó sobre 200 μl de sobrenadante con 200 μl de la solución fenólica, 200 μl de la solución de nitroprusiato de sodio y 400 μl de solución oxidativa. La mezcla se incubó durante 30 min a 37 °C y posteriormente se midió la absorbancia a 660nm.

La solución estándar de NH_4Cl 50 mM se diluyó para obtener soluciones de 25 μM , 50 μM , 100 μM , 150 μM y 200 μM y se procedió con la curva de calibración igual a lo descrito anteriormente para los sobrenadantes. Los resultados obtenidos se expresaron como $\text{Abs}_{660\text{nm}}$ por mg de proteína total.

Las proteínas totales utilizadas para relativizar los datos se obtuvieron mecánicamente como se describe en el inciso **II.4.1** a partir del pellet bacteriano obtenido al centrifugar los cultivos iniciales.

II.6 Ensayos de plantas

II.6.1 Variedad de Plantas utilizadas

Se trabajó con semillas de *Glycine max* (L.) Merr. (soja), variedad Don Mario 4615.

II.6.2 Desinfección superficial y germinación de semillas de soja

Las semillas de soja se lavaron durante unos segundos con alcohol 96 % v/v y luego fueron inmersas en una solución de lavandina comercial diluida al 20 % v/v durante 10

minutos, con agitación manual. Posteriormente, se descartó la solución y se lavaron al menos siete veces con agua destilada estéril, de forma tal de eliminar el remanente de lavandina. Una vez esterilizadas, las semillas fueron germinadas sobre una superficie de agar-agua al 1,5 % p/v durante 4 días, en estufa a 28 °C y en oscuridad.

II.6.3 Ensayos de nodulación y determinación de peso seco de plantas

Para los ensayos de plantas se utilizó como sustrato una mezcla de perlita y arena en proporción 3:2, la cual fue esterilizada durante 20 minutos a 121 °C en autoclave. 1 ml de una suspensión de rizobios de una concentración de aproximadamente 10^6 bacterias.ml⁻¹ en 50 ml de Fåhraeus, se puso en contacto con plántulas de soja de cuatro días de crecimiento. La suspensión provenía de cultivos de cepas de *B. diazoefficiens* que crecieron en medio Evans líquido hasta fase logarítmica (DO₅₀₀ aproximada de 0,5) en agitador rotatorio a 180 rpm. Posteriormente se diluyeron 1:100 en Evans Bajo N y se crecieron durante 6 días en dicho medio a 180 rpm.

Para evaluar el peso seco de la parte aérea de las plantas (método indirecto de cuantificación de fijación de N₂) se inocularon 10 plantas de cada condición (cepa salvaje, cepas mutantes o Fåhraeus como control negativo) y se crecieron durante 60 días en invernáculo donde permanecieron con una temperatura diurna de 30 °C y una nocturna de 14 °C, y un fotoperíodo de 14 horas.

La parte aérea (tallo y hoja) de cada planta se dispuso por separado en una bolsa de papel madera y se dejó secar durante 20 días a 60 °C. Posteriormente se registró el peso individual de las mismas en una balanza analítica de precisión de ± 1 mg.

Para evaluar los ensayos de nodulación y cuantificación de ureídos en hojas (método indirecto de cuantificación de fijación de N₂), se procedió de la misma manera descripta anteriormente pero en este caso se inocularon 7 plantas por cepa a evaluar. Las plantas se crecieron durante 28 días en cámara de plantas con una temperatura diurna de 26 °C y una nocturna de 20 °C, y un fotoperíodo de 14 horas. Posteriormente se registró la cantidad de nódulos por planta y se los dejó secar durante 20 días a 60 °C para luego medir el peso seco de los mismos. La parte aérea de las mismas también se dejó secar en las mismas condiciones para luego ensayar la cuantificación de ureídos como se describe en el inciso **II.6.4.**

Las plantas se regaron con 500 ml de agua destilada estéril cada 4 días y cada 15 días se procedió a regar con solución de Fåhraeus.

El análisis estadístico del peso seco de parte aérea, número de nódulos y peso seco de nódulos se llevó a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) con $p < 0,01$.

II.6.4 Determinación de ureídos – alantoína en microplaca

La determinación de ureídos se llevó a cabo como una medida indirecta de la fijación de N_2 (Castro y Acuña, 1992; Grageda-Cabrera *et al.*, 2003). Para ello, se utilizó la técnica colorimétrica descrita por Vogeles (1970) con algunas modificaciones.

En primer lugar, se pesaron con balanza analítica de precisión (± 1 mg) entre 5 y 10 mg de masa vegetal seca provenientes de plantas de 21 días registrando el valor individual que correspondía a cada planta. A esa masa vegetal se le agregó 1 ml de NaOH 0,2 N. Se calentó durante 30 minutos a 100 °C. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 8.500 x g y se guardaron a -20 °C durante toda la noche.

Al día siguiente las muestras se centrifugaron durante 20 minutos a 16.000 x g. El sobrenadante obtenido se filtró con un filtro Millipore de 0,22 μ m. 150 μ l de este sobrenadante se mezclaron con 150 μ l de agua bidestilada y 150 μ l de NaOH 0,35 N. La mezcla se calentó durante 10 minutos a 100 °C y se dejó enfriar en hielo. Cuando la muestra estaba fría se añadió 150 μ l de HCl 1N y se calentó 5 minutos a 100 °C.

Para la preparación de la curva patrón se prepararon soluciones stock con concentraciones crecientes de alantoína (0; 0,01; 0,05; 0,10; 0,16; 0,20; 0,25; 0,30; 0,40; 0,50 mM). A 300 μ l de cada una de ellas se le añadieron 150 μ l de NaOH 0,35 N. Se calentó durante 10 minutos a 100 °C y se dejó enfriar en hielo. Cuando la muestra estuvo fría se añadió 150 μ l de HCl 1 N y se calentó 5 minutos a 100 °C.

Finalmente, la detección del compuesto coloreado se realizó en microplaca. Para ello, se añadió en diferentes pocillos, 100 μ l de cada muestra vegetal y de cada concentración de la curva patrón. Se agregó 20 μ l de Buffer Fosfato 0,4 M pH 7,0 (K_2HPO_4 0,245 M y KH_2PO_4 0,156 M). Después se agregó 20 μ l de Fenilhidracina 0,03 M y 20 μ l de Ferricianuro Potásico 4,5 mM. Por último, se añadió 100 μ l de HCl 37 % previamente enfriado. Se incubó 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de microplaca Benchmark Plus (BIO-RAD). La cantidad

de ureídos presentes en la muestra se calculó en base a la curva patrón y se expresó como mM de alantoína por g de planta.

II.7 Microscopía

II.7.1 Microscopía óptica

Los nódulos provenientes de plantas crecidas durante 28 días se cortaron por la mitad y se fijaron en glutaraldehído al 2 % en buffer fosfatos (pH 7,2-7,4) durante 2 horas a 4 °C. Posteriormente se deshidrataron en una serie creciente de etanol (25, 50, 75 y 96 %) y se incluyeron en resina epoxi. Los cortes semifinos obtenidos fueron teñidos con azul de toluidina y observados en un microscopio Nikon Eclipse E200 por contraste de fase en luz visible.

II.7.2 Microscopía electrónica de transmisión (MET)

A los nódulos cortados por la mitad y fijados con glutaraldehído se les realizó una fijación secundaria con tetróxido de osmio 1 % p/v durante una hora a 4 °C y posteriormente se deshidrataron en una serie creciente de etanol (25, 50, 75 y 96 %) y se incluyeron en resina epoxi. Los cortes ultrafinos (70 nm) se realizaron con un ultramicrotomo SuperNova Reichert- J, se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión JEM 1200 EX II (JEOL), ubicado en el Servicio Central de Microscopía de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.

II.8 Análisis bioinformáticos y análisis estadísticos

II.8.1 Bases de datos y programas utilizados para los análisis bioinformáticos

Para el análisis del contexto genético de nuestros genes de interés se recurrió al uso de las bases de datos de acceso público como PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) o MicrobesOnline (www.microbesonline.org), donde se encuentra anotado el genoma completo de *B. diazoefficiens* USDA 110 (Kaneko *et al.*, 2002). A partir de la secuencia

de interés encontrada se utilizaron varias herramientas informáticas online con el fin de llevar a cabo un análisis más profundo de las secuencias de interés.

La herramienta Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) se usó para el diseño de cebadores específicos para ciertas regiones dentro del genoma de *B. diazoefficiens* USDA 110.

Cuando fue necesario obtener la reversa complementaria de alguna secuencia, la herramienta utilizada fue Sequence Manipulation Suite: Reverse Complement (www.reverse-complement.com).

Los plásmidos utilizados y las distintas construcciones obtenidas se analizaron mediante el uso del programa NTI Vector10. Estos análisis nos permitieron predecir las posibles orientaciones del fragmento de interés luego de su clonado en los vectores, la disposición de los cebadores en cada caso y los posibles fragmentos liberados por restricción, así como los tamaños de amplificación de diversas combinaciones de cebadores.

Para identificar sitios específicos de secuencias proteicas se utilizó el servidor ScanProsite (www.prosite.expasy.org/scanprosite) y el alineamiento de secuencias se realizó mediante el programa ClustalO online (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo).

Con el objetivo de comparar los porcentajes de identidad entre secuencias de proteínas o de ADN se utilizó el programa BLAST (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) dentro de la base de datos PubMed.

Para el estudio de los dominios de las proteínas se utilizó el programa Pfam (www.pfam.xfam.org/search/sequence) y en el caso de la construcción de modelados de proteínas se utilizó el servidor Phyre2 (www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2).

Y finalmente, el análisis filogenético se llevó a cabo utilizando el programa MEGA6.

II.8.2. Análisis estadísticos

El análisis de los datos provenientes de las medidas de actividad enzimática GS, de la cuantificación de NH_4^+ en sobrenadantes y de los ensayos de fijación de N_2 y nodulación se realizó mediante el análisis de varianza (ANOVA). Para establecer entre qué medias existían diferencias significativas se utilizó el test de Tukey. Estos análisis se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 6.

Capítulo III

**Búsqueda y selección de las
condiciones de cultivo para
el estudio de la NSR en
B. diazoefficiens USDA 110**



Introducción

Las condiciones ambientales fluctuantes a las que deben enfrentarse los rizobios en los suelos agrícolas son factores críticos para la persistencia y supervivencia de los mismos en vida libre (Abd-Alla, 2014). Debido a esto, al igual que los demás microorganismos del suelo, los rizobios han desarrollado diversos sistemas metabólicos que le permiten subsistir en estas condiciones adversas tales como sistemas de captación de sustratos con alta afinidad, enzimas expresadas diferencialmente y una amplia variedad de mecanismos de control metabólico (Humbeck *et al.*, 1985; Graham *et al.*, 1992; Fujihara y Yoneyama, 1993; Tatè *et al.*, 1998; Duzan *et al.*, 2006; Kajić *et al.*, 2016). Un ejemplo de estos sistemas es la cascada de respuesta al estrés por nitrógeno (NSR).

El N se encuentra presente en el interior celular en una amplia variedad de metabolitos y macromoléculas. Las bacterias lo pueden asimilar a partir de fuentes inorgánicas u orgánicas dependiendo de las vías metabólicas que posea cada microorganismo. En particular, los rizobios en vida libre pueden asimilar como fuentes de N aminoácidos, NO_3^- y NH_4^+ , siendo este último el nutriente nitrogenado preferido (Reitzer, 2003; Leigh *et al.*, 2007). De todas maneras, independientemente de la fuente de N utilizada, las bacterias poseen sistemas específicos que regulan su asimilación con el objetivo de optimizar el crecimiento y la supervivencia de la bacteria.

Como describimos en el **Capítulo I**, la NSR resulta de vital importancia para regular los niveles de α -cetoglutarato y glutamina intracelulares (Ninfa *et al.*, 1995). Cuando esta relación α -cetoglutarato/ glutamina (que representa la relación C/N intracelular) es alta, señal de la limitación de N, la NSR se activa con el fin último de inducir un aumento de la asimilación de NH_4^+ que restablezca los niveles intracelulares de glutamina (Ninfa y Atkinson, 2000; Arcondéguy *et al.*, 2001; Leigh *et al.*, 2007).

Por el contrario, cuando la relación α -cetoglutarato/ glutamina es baja, producto de una disponibilidad de N suficiente, la activación de esta cascada de respuesta al estrés por N no es necesaria y el sistema se mantiene con una función basal para mantener los niveles de estos metabolitos (Arcondéguy *et al.*, 1996; Ninfa y Atkinson, 2000; Arcondéguy *et al.*, 2001; Leigh *et al.*, 2007).

La NSR ha sido ampliamente estudiada en enterobacterias (Reitzer, 2003; Leigh *et al.*, 2007; van Heeswijk *et al.*, 2013). Sin embargo, pocos trabajos hacen referencia a dicha

cascada de señalización en rizobios (Amar *et al.*, 1994; Schluter *et al.*, 2000; Arcondéguy *et al.*, 2001; Yurgel *et al.*, 2008; Yurgel *et al.*, 2010; Yurgel *et al.*, 2011; Yurgel *et al.*, 2012; Franck *et al.*, 2015).

Teniendo en cuenta que el principal objetivo del presente trabajo de Tesis es estudiar la regulación del metabolismo del N en *B. diazoefficiens* y dilucidar cuáles son las principales proteínas que intervienen en la cascada de respuesta al estrés por N, en primera instancia fue necesario encontrar medios de cultivo que nos permitieran evaluar condiciones de escasez y condiciones de exceso de N.

A lo largo de este capítulo mostraremos la caracterización fenotípica de la cepa *B. diazoefficiens* USDA 110 en diversas formulaciones del medio Evans mediante la determinación de cinéticas de crecimiento, la medida de los niveles relativos de transcritos de *glnII* (que codifica para GSII) y ensayos de actividad enzimática GS. Finalmente, desarrollaremos la caracterización de nuestra cepa de interés en los medios de cultivo seleccionados para verificar que los mismos cumplan con los requisitos de limitación/exceso de la fuente nitrogenada.

III.1 Análisis de medios de cultivo

En primer lugar, es importante resaltar que en las diferentes formulaciones que describiremos a lo largo de todo este trabajo de Tesis, vamos a definir a la relación C/N de los medios de cultivo como los g totales de C aportados por la fuente de C en relación a los g de N aportados por la fuente nitrogenada. Otra cuestión importante a tener en cuenta es que los ensayos fueron realizados en sistemas de cultivos *batch*, con los que se pretendió simular situaciones de estrés que pueden encontrar las bacterias en el suelo agrícola. Sin embargo, debemos tener presente que este enfoque se aleja un poco de las situaciones que normalmente los rizobios encuentran en un suelo escaso de nutrientes y en un ambiente con condiciones no controladas. No obstante, si bien en todo cultivo *batch* la limitación de los nutrientes es estequiométrica y por lo tanto los microorganismos detienen su crecimiento cuando se les acaba el sustrato limitante, muchas bacterias pueden detectar esa limitación aún durante su crecimiento exponencial y hacerse más eficientes en metabolizar ese sustrato. Un sistema de cultivo

continuo, en el cual la limitación es cinética y el microorganismo está condicionado continuamente a esa condición de crecimiento, sería el sistema ideal para el estudio de la NSR.

Para comenzar con la selección de estos medios de cultivo decidimos evaluar, a través de la cinética de crecimiento de *B. diazoefficiens* USDA 110, dos variantes del medio Evans (Evans, 1970) que habían sido formuladas previamente en nuestro laboratorio. Uno de los medios de cultivo poseía una escasez extrema de la fuente de N, es decir con una relación C/N elevada ($C/N=3.333$), conteniendo $0,0014 \text{ g.l}^{-1}$ de NH_4Cl y 12 g.l^{-1} de manitol denominado **Evans Bajo N**. El otro medio, formulado con exceso de N, denominado **Evans Bajo C**, poseía una relación C/N baja ($C/N=1,4$), conteniendo $1,07 \text{ g.l}^{-1}$ de NH_4Cl y 1 g.l^{-1} de manitol. Además, cabe resaltar que las cantidades de NH_4Cl ($1,07 \text{ g.l}^{-1}$) y de manitol (10 g.l^{-1}) que contiene el medio **Evans** hace que el mismo se encuentre balanceado en N y C, es decir, no se encuentra limitado en ninguno de estos nutrientes, y presenta una relación C/N intermedia ($C/N=14$).

La diferencia de disponibilidad de nutrientes de estos medios ensayados se puede observar al analizar el crecimiento de *B. diazoefficiens* USDA 110. Para llevar a cabo la determinación de las curvas de crecimiento se cultivó la cepa en estudio en los medios Evans, Evans Bajo N y Evans Bajo C como se detalla en el **Capítulo II.2.5** y se mantuvieron a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ y 180 rpm durante 9 días. La biomasa total se determinó diariamente mediante la medida de la densidad óptica $\text{DO}_{500\text{nm}}$. Como se observa en la **Figura III.1** existe una marcada diferencia en la cinética de crecimiento y en los parámetros calculados, sobretodo en la biomasa final alcanzada en cada uno de los medios evaluados.

En particular, la utilización del medio Evans Bajo N sólo nos permite alcanzar un crecimiento bacteriano con una $\text{DO}_{500\text{nm}}$ final de 0,3, mientras que en el medio Evans Bajo C se alcanza una biomasa final de $\text{DO}_{500\text{nm}}= 2$ y finalmente el cultivo en medio Evans permite alcanzar una $\text{DO}_{500\text{nm}}$ de 6,5. Incluso, como podemos observar en la **Tabla III.1** el tiempo de duplicación de *B. diazoefficiens* USDA 110 en el medio Evans Bajo N es de 47,60 horas demostrando la escasez drástica de N del medio, y por lo tanto probablemente una limitación de este nutriente en el crecimiento bacteriano.

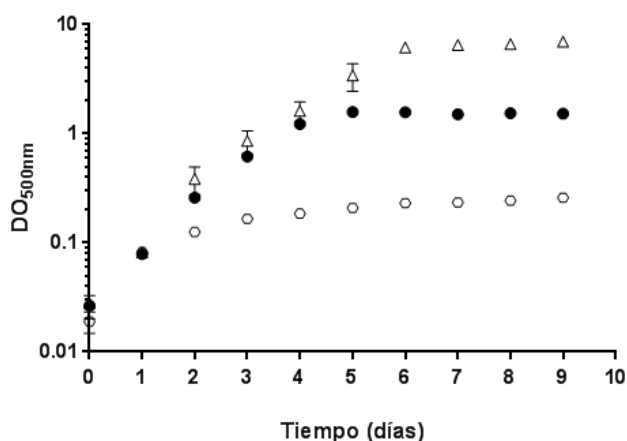


Figura III.1 Cinéticas de crecimiento de *B. diazoefficiens* USDA 110 a 28 °C con agitación a 180 rpm en los medios Evans (Δ), Evans Bajo C (\bullet) y Evans Bajo N (\circ). Los resultados muestran la biomasa estimada por densidad óptica a 500nm (DO_{500nm}) a lo largo del tiempo (días). Los datos corresponden al promedio y la desviación estándar de dos réplicas biológicas independientes. La ausencia de barras de error indica que la desviación fue menor que el tamaño del símbolo utilizado. Para una mejor visualización de los resultados el eje Y se presenta en escala logarítmica.

Por otra parte, en el medio Evans Bajo C el tiempo de duplicación de la cepa resultó similar al obtenido en el medio Evans y fue aproximadamente de 17 horas. Sin embargo, la biomasa final alcanzada en este medio fue significativamente menor, indicando que Evans Bajo C se limita en C mucho antes que se limite el medio de Evans en este nutriente.

Tabla III.1 Parámetros cinéticos de *B. diazoefficiens* USDA 110 cultivado en los medios Evans, Evans Bajo N y Evans Bajo C. En la tabla se muestran los valores de la velocidad específica de crecimiento μ ($horas^{-1}$), tiempo de duplicación g (horas) y cosecha máxima (DO_{500nm}) de la cepa en los medios mencionados. Los valores fueron calculados a partir de los datos obtenidos para las cinéticas de crecimiento (DO_{500nm}) que se muestran en la **Figura III.1** y representan el promedio y la desviación estándar de dos ensayos biológicos independientes.

	Evans	Evans Bajo N	Evans Bajo C
Velocidad de crecimiento ($horas^{-1}$)	0,0413 \pm 0,0054	0,0146 \pm 0,0004	0,0405 \pm 0,0014
Tiempo de duplicación (horas)	16,95 \pm 2,22	47,60 \pm 1,16	17,11 \pm 0,0014
Cosecha máxima (DO_{500nm})	6,5	0,3	2

Además de la determinación de las cinéticas de crecimiento, para evaluar si un cultivo se encuentra creciendo en un medio limitado en N, comúnmente también se evalúa los niveles de transcritos del gen *glnII*, gen que codifica para la enzima glutamino sintetasa

II (GSII), la cual, como mencionamos anteriormente en la Introducción de esta Tesis, se expresa bajo condiciones de inanición de N (Fuchs *et al.*, 1980; Darrow *et al.*, 1981). En base a esto, al analizar la expresión de dicho gen podríamos asociar un incremento en los niveles de transcripto de *glnII* a la presencia de un medio limitado en N. Por otra parte, teniendo en cuenta que hasta el momento no se han reportado regulaciones post-transcripcionales de este gen en *B. diazoefficiens* USDA 110, también podría utilizarse como referencia de la limitación de N la presencia de dicha enzima. A este respecto, análisis de perfiles proteicos de *B. diazoefficiens* llevados a cabo por la Dra. López García antes del inicio de esta Tesis Doctoral, indicaban la presencia diferencial de la proteína GSII en cultivos crecidos en Evans Bajo N y la ausencia de la misma en aquellos cultivos crecidos en Evans Bajo C (datos no mostrados). Estos resultados confirman nuevamente que el medio Evans Bajo N se encuentra limitado en N de manera tal que induce la activación de la cascada NSR de *B. diazoefficiens* y la expresión de GSII. Lo contrario ocurre cuando esta cepa se cultiva en medio Evans Bajo C y por eso no se observa la proteína GSII.

Otra característica que puede ser utilizada para detectar que los cultivos están frente a una limitación de N es la presencia de polisacáridos extracelulares (PSE) que son sintetizados en condiciones de exceso de C y que vuelven los cultivos más viscosos y mucosos. Estos polisacáridos no cumplen funciones como compuestos de reserva ya que no son metabolizables por los rizobios y se clasifican en exopolisacáridos (EPS) y polisacárido capsular (CPS) (Zevenhuizen, 1981). En *B. diazoefficiens* estos dos polisacáridos superficiales poseen idéntica estructura (Mort y Bauer, 1982; Quelas *et al.*, 2006) pero difieren en su localización, los EPS se excretan al medio extracelular como una sustancia viscosa mientras que los CPS se encuentran unidos a la membrana externa de la bacteria. En *B. diazoefficiens* ya se ha reportado que en situaciones de exceso de C, utilizando manitol como única fuente de C y bajo condiciones de inanición de N, los rizobios acumulan polisacáridos extracelulares en el medio de cultivo (López García *et al.*, 2001; Quelas *et al.*, 2006).

En nuestras condiciones, al centrifugar cultivos de *B. diazoefficiens* crecidos durante 7 días en el medio Evans Bajo N es posible detectar a simple vista una gran cantidad de polisacáridos, de textura mucosa, fuertemente adheridos a los pellets bacterianos. Sin embargo, estos compuestos no son observados, o están presentes en muy poca

cantidad, a partir de cultivos crecidos utilizando los medios Evans o Evans Bajo C (**Figura III.2**).

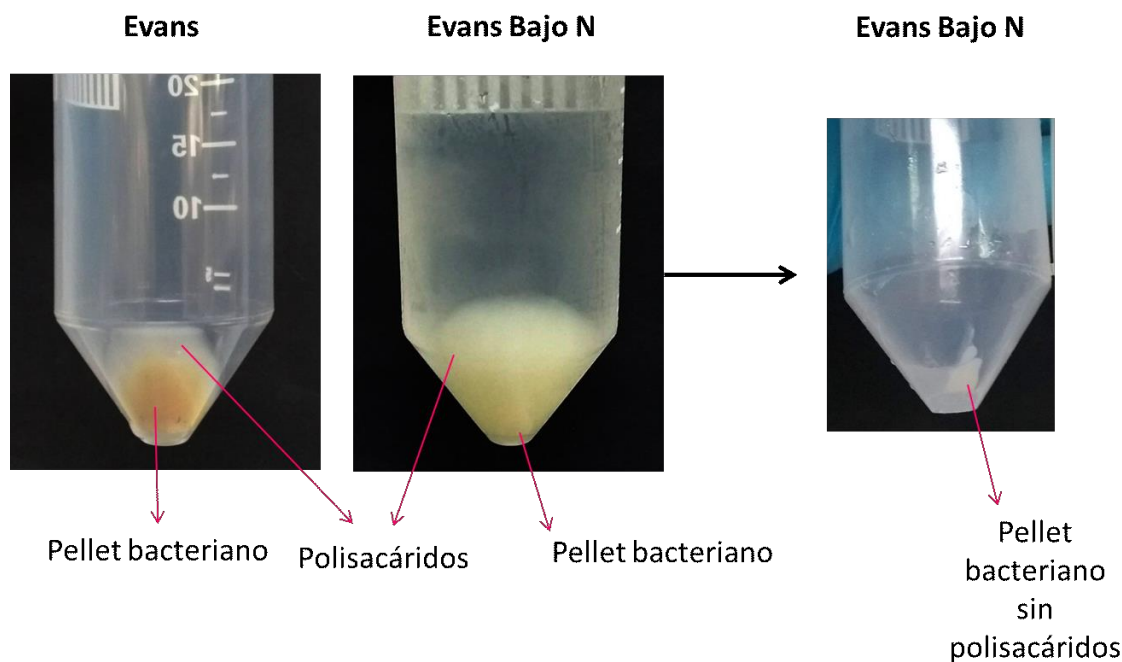


Figura III.2 Fotografías de los pellets bacterianos obtenidos de cultivos de *B. diazoefficiens* USDA 110 en los medios de Evans y Evans Bajo N. 30 ml de cada uno de los cultivos fueron centrifugados a 16.000 x g luego de 7 días de crecimiento (fase estacionaria).

Estas observaciones son coincidentes con otras ya obtenidas en nuestro grupo de trabajo, en las cuales la cuantificación de polisacáridos extracelulares por el método de Antrona (**Tabla III.2**) mostró la mayor cantidad de EPS producida por la cepa *B. diazoefficiens* en el medio Evans Bajo N (López-García *et al.*, datos no publicados).

Tabla III.2. Contenido de polisacáridos extracelulares en *B. diazoefficiens* USDA 110 expresados por mg de proteína celular en cultivos de 5 días, en medios con diferentes contenidos de la fuente de N (López-García *et al.*, datos no publicados).

	Evans	Evans Bajo N	Evans Bajo C
mg EPS/ mg prot.	0,867	2,905	95,8

Lamentablemente, cuando intentamos realizar el análisis de los niveles de transcriptos en la condición de inanición de N utilizando el medio Evans Bajo N, encontramos que

estos polisacáridos que sirvieron de indicio de escasez de N, se encontraban tan adheridos a los pellets bacterianos que dificultaban la obtención de un ARN bacteriano óptimo. A pesar de modificar múltiples variables en la preparación de las muestras de ARN no pudimos obtener una buena calidad de las mismas. En este sentido, en algunas ocasiones antes de llevar a cabo la extracción de ARN los cultivos se centrifugaron a 16.000 x g durante 30 minutos y los pellets bacterianos (junto con los polisacáridos adheridos) se resuspendieron en NaCl 1 M y se los mantuvo en frío, con agitación suave, para favorecer el desprendimiento de los polisacáridos. Sin embargo, luego de la extracción de ARN las muestras obtenidas presentaban más impurezas que en los casos donde no se utilizaba el lavado con NaCl.

En otros intentos, una vez centrifugados los cultivos se procedió a eliminar los polisacáridos de manera manual, con pipeta. Esta técnica eliminaba también gran parte de la masa bacteriana debido a la gran adhesión de los polisacáridos al pellet bacteriano, por lo que la cantidad de ARN extraído resultaba escasa y de mala calidad. Además de estas complicaciones técnicas en la obtención del ARN bacteriano por la presencia de polisacáridos, la manipulación de la muestra resultaba aún más compleja debido a la gran limitación de N del medio de cultivo. Por este motivo, debíamos utilizar grandes volúmenes de cultivo (600 ml de cultivo) y solamente podíamos obtener una biomasa final bacteriana muy escasa ($DO_{500nm} = 0,2$). En igual medida también resultaba muy dificultosa la cuantificación de la actividad enzimática de GS en este medio.

A su vez, durante los intentos de medir el transcripto de *glnII* en el medio Evans bajo N, pudimos detectar que en el medio balanceado Evans, que habíamos comenzado a utilizar como medio de referencia sin limitación de N para realizar los ensayos, el gen *glnII* se encontraba expresado. En la **Figura III.3** se muestra el resultado obtenido a partir de una PCR utilizando como molde ADN complementario de *B. diazoefficiens* y cebadores específicos para amplificar una región interna del gen *glnII* y una región interna del gen de referencia *sigA* cuya transcripción ha sido propuesta como constitutiva (Hauser *et al.*, 2006). Las secuencias de los cebadores utilizados *glnII_RT_Fw/glnII_RT_Rv* y *sigA Fw/ sigA Rv* se detallan en la **Tabla II.3.2**.

Como podemos observar (**Figura III.3**) la cantidad de transcripto de *glnII* en las bacterias cultivadas en Evans Bajo C resultó prácticamente indetectable, mientras que en aquellas bacterias cultivadas en medio Evans los niveles de transcriptos observados fueron mayores. Cabe resaltar que esta detección de transcriptos no pudo llevarse a cabo en bacterias cultivadas en Evans Bajo N ya que, como mencionamos anteriormente, no fue posible obtener ARN bacteriano en esta condición.



Figura III.3 Productos de amplificación obtenidos mediante RT- PCR utilizando los cebadores sigA Fw/ sigA Rv y glnII_RT_Fw/ glnII_RT_Rv

Evans Bajo C: PCR utilizando como molde para la reacción ADNc de *B. diazoefficiens* USDA 110 obtenido en a partir de un cultivo crecido en Evans Bajo C

Evans: PCR utilizando como molde para la reacción ADNc de *B. diazoefficiens* USDA 110 obtenido en a partir de un cultivo crecido en el medio de Evans

(+): control positivo de la PCR utilizando como molde ADN genómico de *B. diazoefficiens* USDA 110

(-): control negativo de la PCR utilizando agua como molde para la reacción

A modo de confirmación, a partir de estos ADNc de *B. diazoefficiens* USDA 110 obtenidos a partir de cultivos crecidos en Evans Bajo C y Evans se llevó a cabo una cuantificación relativa de transcriptos de *glnII* mediante PCR en tiempo real.

Efectivamente, como habíamos observado mediante RT- PCR, confirmamos que la cantidad de transcripto en bacterias cultivadas en medio Evans es aproximadamente 20 veces más que el de las bacterias cultivadas en Evans Bajo C. (**Figura III.4**).

Estos resultados nos indicaban que, a pesar de que el medio Evans no tiene una relación C/N tan alta como para representar una situación de limitación de N, la misma sería suficiente como para que el sistema de respuesta al estrés por N se encuentre activo, al menos, a nivel de la transcripción de uno de los genes involucrados en dicha cascada.

Sin embargo, es importante resaltar que la presencia de transcripto no necesariamente indica la presencia de la proteína funcional.

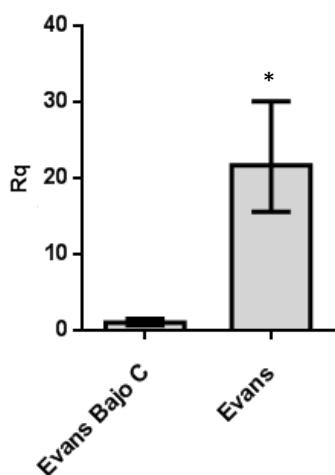


Figura III.4 Análisis de la expresión de transcritos del gen *glnII* por PCR en tiempo real (qRT-PCR) en la cepa *B. diazoefficiens* USDA 110 a partir de cultivos de 5 días en medio Evans tomando como referencia el medio Evans Bajo C. Se utilizaron cebadores para amplificar una región interna al gen *glnII* (*glnII_RT_Fw/ glnII_RT_Rv*) y se utilizó como gen de referencia el gen *sigA* (*sigA Fw/ sigA Rv*). Los resultados corresponden a un ensayo representativo de dos réplicas biológicas y se expresan como **Rq** (el r_q se define como $2^{-\Delta\Delta Ct}$). Un $r_q = 1$ indica la expresión del gen en la cepa mutante no difiere de la expresión en la cepa salvaje. Un $r_q > 2$ indica que el gen está sobreexpresado. (*) representa una diferencia significativa.

Basándonos en los niveles de *glnII* observados, y con el objetivo de determinar si los cultivos crecidos en el medio Evans se encuentran limitados en N, decidimos evaluar la actividad enzimática GS mediante el método biosintético (Shapiro y Stadtman, 1968). En particular, utilizamos este método porque como describiremos más adelante en el **Capítulo IV** éste nos permite determinar la actividad GS total. Para llevar a cabo este ensayo, se creció un cultivo de *B. diazoefficiens* USDA 110 en el medio de Evans y otro en Evans Bajo C. El protocolo llevado a cabo para dicho ensayo se detalla en el **Capítulo II.5.1**. Nuevamente, no fue posible llevar a cabo el ensayo de actividad GS con bacterias cultivadas en Evans Bajo N debido a la gran cantidad de polisacáridos extracelulares que no permitieron obtener una buena calidad de muestra para realizar la medida. Cuando analizamos la actividad enzimática GS encontramos que la cepa cultivada en el medio Evans efectivamente presentaba mayor actividad que los cultivos crecidos en Evans Bajo C (**Figura III.5**), indicando que las bacterias cultivadas en Evans poseen una mayor activación de la cascada NSR que aquellas cultivadas en Evans Bajo C.

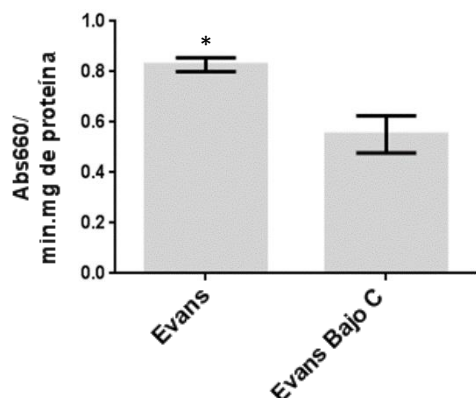


Figura III.5 Medida de la actividad enzimática GS de la cepa *B. diazoefficiens* USDA 110 cultivada durante 5 días en los medios Evans y Evans Bajo C. La determinación enzimática se llevó a cabo mediante el método biosintético. Los datos graficados corresponden al promedio de al menos dos réplicas biológicas evaluadas en triplicado y su desviación estándar. Los valores se expresan como $DO_{660nm} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteínas totales}^{-1}$. (*) representa una diferencia significativa.

Estos resultados tomados en conjunto demuestran que la relación C/N que posee el medio de Evans sería suficiente para comenzar a poner en marcha la NSR. Sin embargo, el sustrato limitante en este medio no es ni el C ni el N, sino algún micronutriente no definido. Debido a esto, decidimos abandonar estos medios y emprender la búsqueda de nuevas variantes del medio Evans que nos permitan analizar condiciones bien definidas de exceso y escasez de dicho nutriente. Además de resultar imprescindible, que la manipulación de las muestras obtenidas sea menos compleja y que nos permitan recolectar una cantidad de bacterias más abundante.

Con este objetivo y basándonos en la formulación de los medios utilizados en bibliografía ya publicada sobre el sistema NSR, comenzamos fijando las cantidades de manitol en $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ y modificando las cantidades de NH_4Cl para obtener diversas relaciones C/N. Denominamos **Evans660** a aquel medio con relación C/N=660, **Evans200** a aquel con C/N=200, **Evans 1,4** a aquel medio con C/N=1,4 y así sucesivamente. Los medios formulados junto con sus relaciones C/N y las fuentes de C y N utilizadas se listan en la **Tabla III.3**.

Tabla III.3 Variantes del medio de Evans analizadas. En la tabla se detallan las fuentes de C y N utilizadas, así como las concentraciones de las mismas. Además, se muestra en cada uno de los medios la relación C/N alcanzada, entendiéndose a la relación C/N como los g totales de C aportados por la fuente de C en relación a los g de N aportados por la fuente nitrogenada para un litro de cultivo.

MEDIO	Fuente de C	Fuente de N	relación C/N
Evans	10 g.l ⁻¹ manitol	1,07 g.l ⁻¹ NH ₄ Cl	14
Evans Bajo N	12 g.l ⁻¹ manitol	0,00535 g.l ⁻¹ NH ₄ Cl	3333
Evans Bajo C	1 g.l ⁻¹ manitol	1,07 g.l ⁻¹ NH ₄ Cl	1,4
Evans1,4	5 g.l ⁻¹ manitol	5,38 g.l ⁻¹ NH ₄ Cl	1,4
Evans2	2 g.l ⁻¹ manitol	1,53 g.l ⁻¹ NH ₄ Cl	2
Evans50	2 g.l ⁻¹ manitol	0,061 g.l ⁻¹ NH ₄ Cl	50
Evans100	2 g.l ⁻¹ manitol	0,03 g.l ⁻¹ NH ₄ Cl	100
Evans200	5 g.l ⁻¹ manitol	0,038 g.l ⁻¹ NH ₄ Cl	200
Evans660	5 g.l ⁻¹ manitol	0,011 g.l ⁻¹ NH ₄ Cl	660
Evans NG	5 g.l ⁻¹ manitol	0,4 g.l ⁻¹ glutamato + 1,07 g.l ⁻¹ NH ₄ Cl	6,8
Evans Glutamato	5 g.l ⁻¹ manitol	0,4 g.l ⁻¹ glutamato	70
Evans NH ₄ ⁺	5 g.l ⁻¹ manitol	0,107 g.l ⁻¹ NH ₄ Cl	70

Como primer paso para evaluar el comportamiento de las bacterias en estos nuevos medios formulados, evaluamos la cinética de crecimiento de *B. diazoefficiens* USDA 110 en cada uno de ellos. Las bacterias se crecieron durante 7 días en los medios Evans1,4, Evans200 y Evans660 y diariamente se determinó su biomasa mediante densidad óptica DO_{500nm} (**Figura III.6**). Como controles de crecimiento también se realizaron cinéticas en los medios Evans Bajo N y Evans.

A partir de las curvas de crecimiento pudimos observar que *B. diazoefficiens* no es capaz de crecer en el medio Evans1,4, probablemente porque la gran cantidad de NH₄Cl requerido para alcanzar esta relación C/N (**Tabla III.3**) resulta tóxico para la bacteria.

Por otra parte, cuando analizamos el crecimiento en Evans660 vimos que la velocidad de crecimiento y la DO_{500nm} final alcanzada resultó prácticamente igual a los valores obtenidos para los cultivos crecidos en Evans Bajo N, lo que nos llevó instantáneamente a descartar esta variante. Por otra parte, el análisis de las cinéticas en Evans200 resultó un poco más alentador, obteniéndose una masa bacteriana final un poco más elevada

que en Evans Bajo N de alrededor de $DO_{500nm} = 0,8$. Incluso, la velocidad de crecimiento μ de *B. diazoefficiens* cultivada en Evans200 ($0,035 \text{ horas}^{-1}$) resultó mayor que la obtenida cuando se cultiva en Evans Bajo N ($0,016 \text{ horas}^{-1}$) y el tiempo de duplicación de la bacteria se redujo de 42 horas (Evans Bajo N) a 19,6 horas (Evans200) indicando que el Evans200 podría ser un buen medio para evaluar limitación de N.

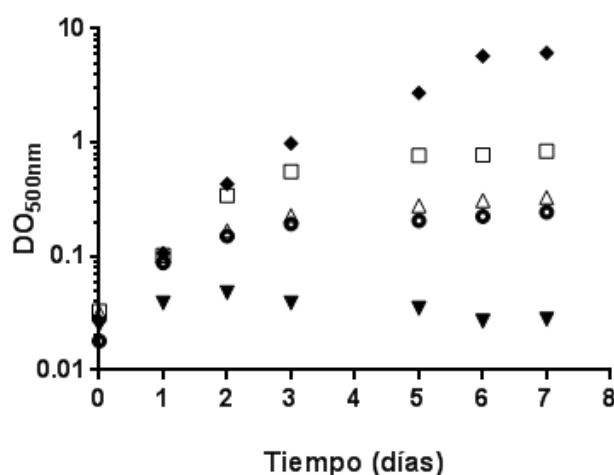


Figura III.6 Cinéticas de crecimiento de *B. diazoefficiens* USDA 110 a 28 °C con agitación a 180 rpm en medios Evans con diversas formulaciones utilizando manitol 5 g.l^{-1} para obtener las relaciones C/N 660 (Δ), 200 (\square) y 1,4 (\blacktriangledown). Como control también se evaluó el crecimiento en el medio Evans original (\blacklozenge) y en el medio Evans Bajo N (\bullet). Los datos graficados pertenecen a un experimento de dos experimentos independientes, cuyos resultados fueron coincidentes.

El paso siguiente del análisis de estos medios fue determinar visualmente la presencia o ausencia de polisacáridos extracelulares y la facilidad para desprenderlo del pellet bacteriano. Así, al llegar al día 7 se tomó una fracción de este cultivo que se encontraba en fase estacionaria y se lo centrifugó durante 10 minutos a $16.000 \times g$. Llamativamente, a partir de esta simple visualización detectamos nuevamente una gran cantidad de polisacáridos muy adheridos al pellet bacteriano que resultaban muy difícil de eliminar por lo que decidimos descartar esta formulación y continuar con nuestra búsqueda.

Debido a los inconvenientes obtenidos al intentar evaluar Evans1,4 (posiblemente por las grandes cantidades de NH_4^+ que se requerían para llegar a esa relación C/N) decidimos fijar la cantidad de manitol en 2 g.l^{-1} y modificar nuevamente la cantidad de NH_4Cl . De esta manera preparamos los medios **Evans100**, **Evans50** y **Evans2**. Las concentraciones de manitol y NH_4Cl utilizadas se detallan en la **Tabla III.3**. Nuevamente

se crecieron cultivos de *B. diazoefficiens* USDA 110 en los medios mencionados y se usó como control el crecimiento de la bacteria en el medio Evans y en Evans Bajo N. La biomasa total se determinó diariamente mediante densidad óptica DO_{500nm} durante 7 días (**Figura III.7**).

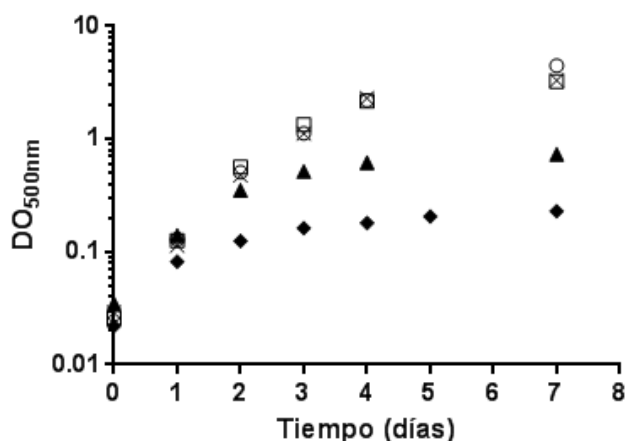


Figura III.7 Cinéticas de crecimiento de *B. diazoefficiens* USDA 110 a 28 °C con agitación a 180 rpm en medios Evans con diversas formulaciones utilizando 2 g.l⁻¹ de manitol para obtener las relaciones C/N 100 (▲), 50 (□) o 2 (×). Como control también se graficó el crecimiento en el medio Evans original (○) y en el medio Evans Bajo N (◆). La biomasa fue estimada por densidad óptica a 500nm (DO_{500nm}) a lo largo del tiempo (días). Los datos graficados pertenecen a un experimento de dos experimentos independientes, cuyos resultados fueron coincidentes.

En este caso, pudimos observar que el crecimiento de la bacteria tanto en Evans50 como en Evans2 mostraba la misma cinética y biomasa final que el crecimiento en Evans original. Mientras que el crecimiento en Evans100, al igual que lo ocurrido en Evans200, mostraba una biomasa final mayor a la obtenida para el Evans Bajo N (Evans100 $DO_{500nm}=0,7$; Evans Bajo N $DO_{500nm}=0,3$) y un menor tiempo de duplicación (Evans100: $g=25,5$ horas; Evans Bajo N: $g=42$ horas) aunque con las mismas dificultades para desprender los polisacáridos una vez centrifugados los cultivos.

Teniendo en cuenta el marcado cambio en la cinética de crecimiento de *B. diazoefficiens* al cultivarla en Evans50 con respecto a Evans100, decidimos probar una relación intermedia entre estas dos: C/N=70. Además, basándonos en los medios reportados en bibliografía ya publicada (Carlson *et al.*, 1987; Franck *et al.*, 2015; Bren *et al.*, 2016), decidimos evaluar también la limitación de N utilizando glutamato como única fuente de N.

En este punto resulta importante aclarar por qué seleccionamos NH_4Cl y glutamato de sodio como fuentes de N para realizar nuestros estudios. En primera instancia, elegimos al NH_4^+ debido a que éste nutriente resulta esencial para las bacterias, y en general es la fuente de N que más fácilmente asimilan los microorganismos (Reitzer, 2003). El NH_4^+ ingresa al interior celular de manera activa a través de los transportadores AmtB y debido a su carga, una vez dentro debe ser rápidamente metabolizado. En *B. diazoefficiens* la función de asimilación de NH_4^+ es catalizada principalmente por la GS la cual mediante el consumo de una molécula de ATP y una de α -cetoglutarato brinda una molécula de glutamina.

Por otra parte, decidimos evaluar como fuente nitrogenada alternativa al glutamato, un nutriente que, junto a la glutamina, ha sido reportado como fuente de N “pobre” (Kaneshiro y Kurtzman, 1982; Salminen y Streeter, 1987; Wang, 2016). Esto se debe a que el cultivo de bacterias en presencia de glutamato presenta menores velocidades de crecimiento y menor biomasa final en relación a los valores obtenidos al utilizar NH_4^+ . No obstante, el glutamato provee el 88% del N para la síntesis de los compuestos nitrogenados que la célula necesita (Reitzer, 2003). En particular, este nutriente es un aminoácido que se encuentra involucrado en la síntesis de proteínas y otros procesos importantes del metabolismo celular como la glicólisis, la gluconeogénesis y el ciclo de Krebs (Berg *et al.* 2007). Este compuesto puede ser metabolizado por la acción de la glutamato descarboxilasa (GAD), o por la acción catalítica de la glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ (NAD-GDH). *B. diazoefficiens* posee en su genoma una copia del gen que codifica para una NAD-GDH que no ha sido estudiada aún, mientras que GDH se encuentra ausente. Suponiendo que la NAD-GDH se encuentre activa, una vez que el glutamato ingresa a la bacteria, el mismo debería ser metabolizado por dicha enzima para dar como resultado una molécula de α -cetoglutarato y una de NH_4^+ , aportando una fuente de N pero también compuestos carbonados. Este aporte, probablemente genere un desbalance de los niveles de C/N intracelulares que conduzcan a la bacteria a detectar una condición de limitación de N y por ende la lleve a activar su cascada NSR. Esto podría deberse al aumento de los niveles de α -cetoglutarato, molécula señal por excelencia del exceso de C intracelular.

Entonces, considerando estos aspectos, para desarrollar nuevas variantes del medio Evans mantuvimos la fuente de C en 5 g.l^{-1} de manitol y agregamos $0,4 \text{ g.l}^{-1}$ de glutamato

de sodio para formular el **Evans Glutamato** (C/N=70); 0,107 g.l⁻¹ de NH₄Cl para formular el **Evans NH₄⁺** (C/N=70), y finalmente 0,4 g.l⁻¹ de glutamato de sodio y 0,107 g.l⁻¹ de NH₄Cl para formular un medio con exceso de N que denominamos **Evans NG** (C/N=6,8). Los detalles de las formulaciones de estos medios se describen en el **Capítulo II.2.1** y en la **Tabla III.3**. Cabe destacar que, a pesar de que los medios con escasez de N poseen diferentes fuentes nitrogenadas (NH₄Cl o glutamato de sodio), se buscó obtener para ambos una misma relación C/N que, como mencionamos en la Introducción de este capítulo, es la relación que indica si existe o no una limitación intracelular de N. Para lograr equiparar esta relación en ambos medios también consideramos que el glutamato provee a la bacteria de compuestos carbonados.

Posteriormente, realizamos las cinéticas de crecimiento de *B. diazoefficiens* USDA 110 en estos nuevos medios formulados, determinando nuevamente durante 10 días la biomasa mediante densidad óptica DO_{500nm}. Los resultados obtenidos se observan en la **Figura III.8**. En este caso también se graficaron como referencia los medios Evans Bajo N, Evans y Evans Bajo C.

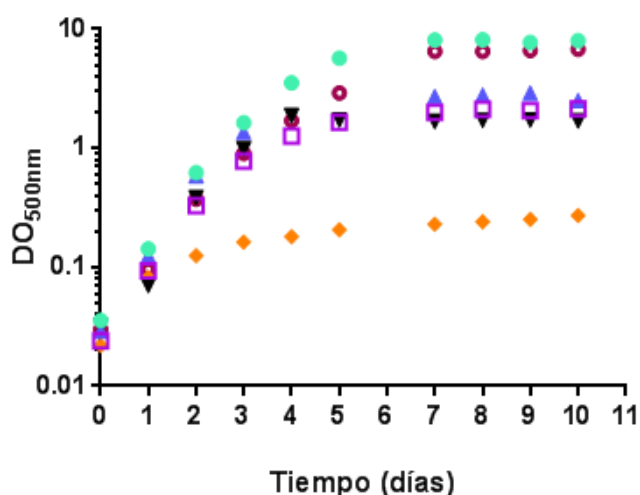


Figura III.8 Cinéticas de crecimiento preliminares de *B. diazoefficiens* USDA 110 a 28 °C con agitación a 180 rpm en los medios Evans NG (●), Evans Glutamato (■) y Evans NH₄⁺ (▲) Como control también se grafican las cinéticas de crecimiento obtenidas cuando *B. diazoefficiens* se cultiva en los medios Evans Bajo C (▼), Evans Bajo N (◆) y Evans (●). La biomasa fue estimada por densidad óptica a 500nm (DO_{500nm}) a lo largo del tiempo (días). Los datos graficados pertenecen a un experimento de dos experimentos independientes, cuyos resultados fueron coincidentes.

Como se puede observar, los medios con relación C/N=70 ya sea utilizando glutamato o NH_4^+ como fuente nitrogenada, permitieron alcanzar una biomasa final mucho más elevada ($\text{DO}_{500\text{nm}} = 2$) que la obtenida con Evans Bajo N ($\text{DO}_{500\text{nm}} = 0,3$). Mientras tanto, el crecimiento en Evans NG logró alcanzar una cinética similar al crecimiento en el medio Evans hasta una $\text{DO}_{500\text{nm}} = 8$.

Para evidenciar la producción de polisacáridos en estos nuevos medios, luego de transcurridos los 7 días de la curva de crecimiento estos cultivos se centrifugaron durante 10 minutos a $16.000 \times g$ y se evaluó visualmente la producción de los mismos. Efectivamente pudimos comprobar que tanto los cultivos crecidos en Evans Glutamato como los crecidos en Evans NH_4^+ presentaban no sólo una mayor cantidad de pellet bacteriano sino también una alta producción de polisacáridos, signo de la probable limitación de N (López-García *et al.*, 2001; Quelas *et al.*, 2006). Sin embargo, a diferencia de los medios anteriores, la gran acumulación de polisacáridos podía ser eliminada fácilmente mediante inversión dejando un pellet bacteriano limpio y abundante.

En el caso de los cultivos crecidos en Evans NG los pellets bacterianos obtenidos al centrifugar en las condiciones anteriormente mencionadas no presentaron producción de polisacáridos sino un pellet bacteriano definido y abundante.

En base a los resultados obtenidos decidimos elegir para continuar con nuestros estudios estas tres formulaciones de medios: Evans NG (medio balanceado sin limitación de N), Evans Glutamato (medio limitado en N) y Evans NH_4^+ (limitado en N).

III.2 Caracterización fenotípica de *B. diazoefficiens* USDA 110 cultivada en los medios Evans NG, Evans Glutamato y Evans NH_4^+

Para confirmar que los tres medios seleccionados efectivamente representaban las condiciones de limitación (Evans Glutamato y Evans NH_4^+) y de exceso de N (Evans NG) deseadas, decidimos en primer lugar realizar nuevamente la cinética de crecimiento de *B. diazoefficiens* determinando su biomasa diariamente no sólo a partir de la densidad óptica a 500nm ($\text{DO}_{500\text{nm}}$) sino también mediante el número de células viables por recuento en placa de las Unidades Formadoras de Colonia por ml ($\text{UFC} \cdot \text{ml}^{-1}$). En la **Figura III.9** y en la **Tabla III.4** podemos observar que efectivamente las bacterias cultivadas en Evans Glutamato y Evans NH_4^+ alcanzan una biomasa final $\text{DO}_{500\text{nm}}$ mucho menor

($DO_{500nm}=2$) que las bacterias cultivadas en Evans NG ($DO_{500nm}=8$). Hay que tener en cuenta que la única modificación cuali y cuantitativa entre los 3 medios es la fuente de N. El mismo fenotipo pudo observarse a partir del recuento de las UFC. ml^{-1} , a pesar de que en los tres medios evaluados se mantienen dentro del mismo orden de magnitud ($\sim 10^9$ UFC. ml^{-1}) (**Figura III.9**).

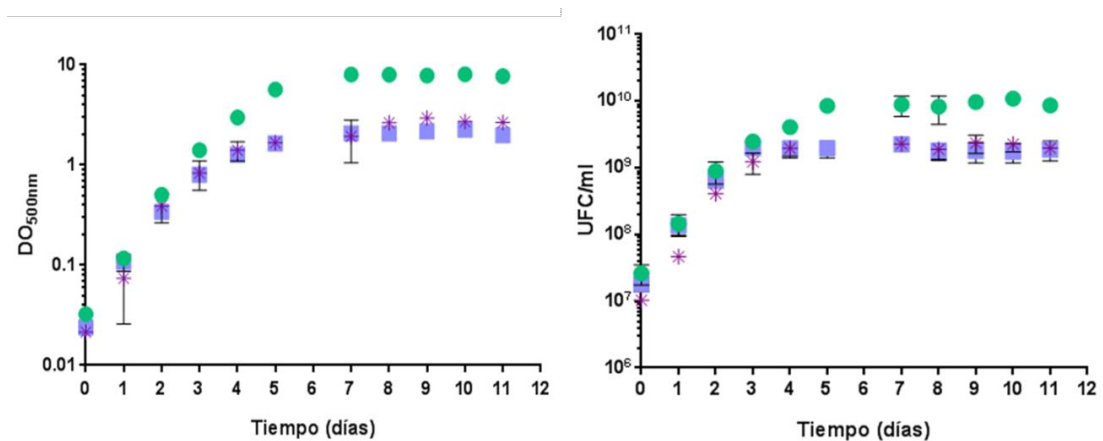


Figura III.9 Cinéticas de crecimiento de *B. diazoefficiens* USDA110 a 28 °C con agitación a 180 rpm en los medios Evans NG (●), Evans Glutamato (■) y Evans NH₄⁺ (*). En el panel de la izquierda se muestra la biomasa estimada por densidad óptica (DO_{500nm}) y a la derecha la estimación del número de células viables por recuento en placa de las unidades formadoras de colonias por ml de cultivo (UFC. ml^{-1}).

Los datos corresponden al promedio y la desviación estándar de dos réplicas biológicas independientes. La ausencia de barras de error indica que la desviación fue menor que el tamaño del símbolo utilizado.

El análisis de la velocidad de crecimiento (μ) de *B. diazoefficiens* cultivada en Evans NH₄⁺ o Evans Glutamato resultó un poco menor que la μ obtenida cuando se cultiva en Evans NG (**Tabla III.4**). Sin embargo, la μ obtenida en Evans NH₄⁺ no fue tan diferente a la obtenida para el medio Evans NG, a diferencia de lo que ocurría entre las velocidades obtenidas en Evans con respecto al medio Evans bajo N (**Tabla III.1**).

De la misma manera, los tiempos de duplicación de la bacteria en los medios limitados en N resultaron mayores que el obtenido en el medio con exceso de N. Además, las bacterias cultivadas en los medios Evans NH₄⁺ y Evans Glutamato mostraron un tiempo de duplicación similar.

Tabla III.4 Velocidad de crecimiento μ (horas⁻¹), tiempo de duplicación g (horas) y cosecha máxima (DO_{500nm}) de la cepa salvaje *B. diazoefficiens* USDA 110 cultivada en medio de Evans NG, Evans NH₄⁺ y Evans Glutamato. Los valores fueron calculados a partir de los datos obtenidos para las cinéticas de crecimiento (DO_{500nm}) que se muestran en la **Figura III.9** y muestran el promedio y la desviación estándar de dos ensayos biológicos independientes.

	Evans NG	Evans NH ₄ ⁺	Evans Glutamato
Velocidad de crecimiento (horas ⁻¹)	0,04479±0,0001	0,03433±0,0038	0,03461±0,0022
Tiempo de duplicación (horas)	15,47±0,04	20,31±2,23	20,07±1,30
Cosecha máxima (DO _{500nm})	8	2,5	2

Posteriormente, y con el objetivo de corroborar que efectivamente el nutriente limitante en los medios Evans Glutamato y Evans NH₄⁺ es el N y no algún otro, cultivamos la cepa *B. diazoefficiens* en los medios anteriormente mencionamos durante 6 días hasta alcanzar su fase estacionaria. Al llegar a dicho tiempo, adicionamos al cultivo NH₄Cl hasta alcanzar una concentración de 1,07 g.l⁻¹ (concentración de NH₄Cl que posee el medio Evans NG). Como control también le adicionamos la misma cantidad de NH₄Cl al cultivo de *B. diazoefficiens* crecido en medio Evans NG. La **Figura III.10** muestra que las bacterias cultivadas en los medio Evans Glutamato y Evans NH₄⁺ retomaron su crecimiento hasta alcanzar la misma biomasa final que la cepa cultivada en Evans NG. Mientras que ésta última, al adicionarle NH₄Cl a los 6 días, no varió su biomasa final. Estos resultados indican que efectivamente los medio Evans Glutamato y Evans NH₄⁺ se encuentran limitados en N, mientras que en el medio Evans NG este nutriente no es el limitante del crecimiento.

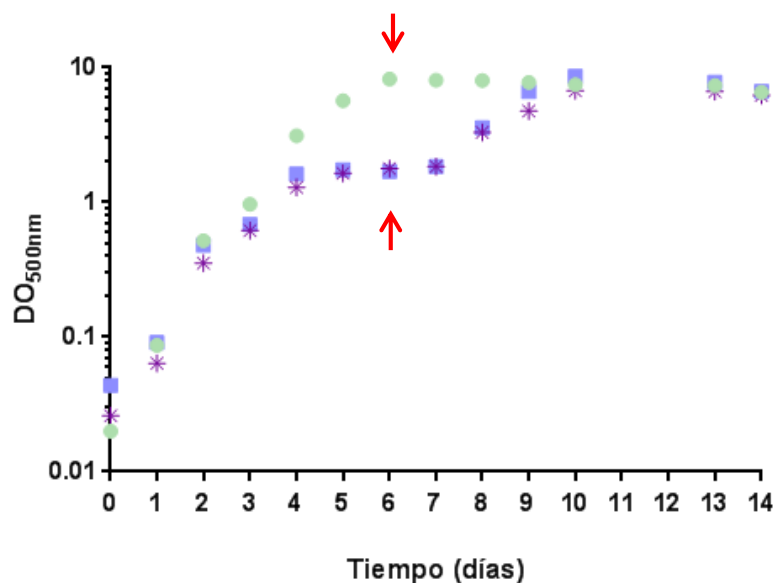


Figura III.10 Efecto de la adición de NH_4Cl a cultivos en fase estacionaria de *B. diazoefficiens* USDA 110 en los medios Evans NG (●), Evans Glutamato (■) y Evans NH_4^+ (*). En la figura se muestra la biomasa estimada por densidad óptica ($\text{DO}_{500\text{nm}}$) durante 14 días. Las flechas rojas señalan el día 6 en el cual se adicionó a los cultivos crecidos en Evans Glutamato y Evans NH_4^+ , NH_4Cl para alcanzar una concentración de $1,07 \text{ g.l}^{-1}$ equivalente a la del medio Evans NG. Para corroborar que este último medio no se encuentre limitado en N también se le adicionó NH_4Cl . Los datos corresponden a un ensayo biológico representativo de dos ensayos realizados de manera independiente con resultados coincidentes.

Para continuar con la caracterización fenotípica de la cepa *B. diazoefficiens* USDA 110 en estos medios, decidimos analizar los niveles relativos de transcriptos del gen *glnII*, indicador de la inanición de N. Para ello, se cultivó la cepa *B. diazoefficiens* USDA 110 durante 5 días en los medios Evans NG, Evans Glutamato y Evans NH_4^+ , y a partir de estos cultivos, se obtuvo el ADN complementario como se describe en el **Capítulo II.3.6**, el cual se utilizó como molde para la reacción de PCR cuantitativa. Los cebadores específicos utilizados, *glnII_RT_Fw/glnII_RT_Rv* y *sigA Fw/sigA Rv*, se detallan en la **Tabla II.3.2**.

En la **Figura III.11** podemos observar que la expresión del gen *glnII* se encuentra significativamente aumentada en las bacterias cultivadas tanto en Evans Glutamato como en Evans NH_4^+ en relación a la expresión de este gen en las bacterias cultivadas en Evans NG, indicando nuevamente que el sistema NSR se encuentra más activado en las

bacterias cultivadas en los nuevos medios limitados en N que en el medio con exceso de dicho nutriente.

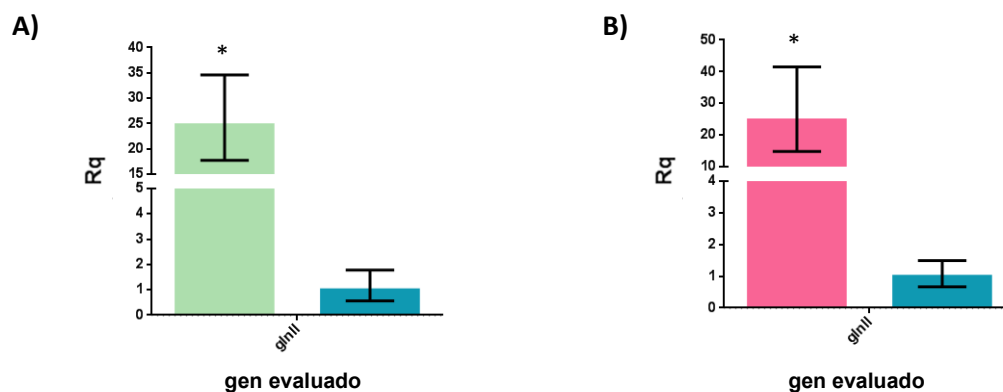


Figura III.11 Expresión relativa del gen *glnII* en *B. diazoefficiens* USDA 110 cultivada durante 5 días en Evans NH₄⁺ (■) (A) o Evans Glutamato (■) (B). Los resultados son representativos de al menos dos ensayos biológicos independientes que mostraron la misma tendencia. Las barras representan la desviación estándar. Los valores se expresan como **Rq** (el **Rq** se define como $2^{-\Delta\Delta Ct}$) utilizando como referencia la expresión en Evans NG (■). Un **Rq**=1 indica la expresión del gen en la cepa mutante no difiere de la expresión en la cepa salvaje. Un **Rq**>2 indica que el gen está sobreexpresado. (*) representa una diferencia significativa.

Finalmente, para confirmar que los resultados obtenidos a partir de la evaluación de transcritos se vieran reflejados en un aumento de actividad enzimática, realizamos la determinación de la misma mediante el método biosintético. Para ello, la cepa *B. diazoefficiens* USDA 110 se cultivó durante 5 días en las nuevas variantes del medio de Evans (Evans NG, Evans Glutamato y Evans NH₄⁺) y se continuó con la metodología descrita en el **Capítulo II.5.1**.

Los cultivos crecidos en los medios limitados en N, Evans Glutamato y Evans NH₄⁺, mostraron una actividad enzimática significativamente mayor en relación a los valores obtenidos al cultivar la misma cepa en el medio Evans NG (**Figura III.12**). Sin embargo, podemos observar que la actividad GS total de la cepa cultivada en Evans Glutamato fue significativamente mayor que cuando se cultiva en Evans NH₄⁺ (**Figura III.12**). Este resultado fue llamativo, ya que el diseño de la formulación de estos medios se llevó a cabo minuciosamente para obtener en ambos la misma relación C/N. No obstante, coincide con los datos bibliográficos que destacan al glutamato como una fuente de N

pobre e ideal para estudiar el sistema de respuesta al estrés por N. Probablemente las diferencias observadas se deban a los distintos procesos metabólicos que deben desencadenarse para asimilar estas fuentes nitrogenadas como mencionamos anteriormente en este capítulo. Aún así, los resultados obtenidos en Evans NH_4^+ también nos resultaron interesantes, ya que cuando *B. diazoefficiens* se cultiva en dicho medio, el sistema NSR se encuentra más activado en relación a la cepa crecida en Evans NG.

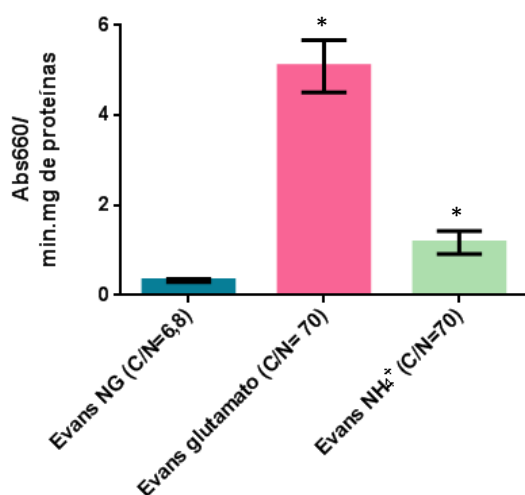


Figura III.12 Medida de la actividad glutamino sintetasa de la cepa *B. diazoefficiens* USDA 110 cultivada en distintas variantes del medio de Evans durante 5 días. La actividad GS total se determinó mediante el método biosintético y los datos se expresan como $\text{DO}_{660\text{nm}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteínas totales}^{-1}$. Las columnas representan el promedio y las barras la desviación estándar de 3 ensayos biológicos independientes realizados con 3 réplicas técnicas cada uno. (*) representa una diferencia significativa.

Por último, en base a todos los resultados expuestos, que indicaron la activación de la NSR en *B. diazoefficiens* cuando la misma se cultiva en los medios Evans Glutamato y Evans NH_4^+ , decidimos continuar nuestros estudios de la regulación del metabolismo de N con estos medios limitados en N y utilizar como medio de cultivo con exceso de dicho nutriente el medio Evans NG.

III.3 Resumen y discusión

A lo largo de este Capítulo abordamos la búsqueda de diferentes medios de cultivo que nos permitieran obtener condiciones de limitación y de exceso de N para finalmente caracterizar los reguladores del metabolismo de N en *B. diazoefficiens* en los siguientes Capítulos.

En una primera etapa caracterizamos nuestra cepa de interés en el medio de Evans (Evans, 1970) y dos variantes del mismo las cuales habían sido formuladas específicamente para lograr condiciones metabólicas de exceso de N (Evans Bajo C) o limitación de N (Evans Bajo N). Sin embargo, a medida que comenzamos a profundizar nuestros estudios, nos encontramos que el cultivo de la cepa *B. diazoefficiens* en inanición de N, nos traía aparejado una serie de complicaciones técnicas que nos impedían tener la cantidad de biomasa final necesaria y suficiente para realizar futuros ensayos, y además, generaba grandes dificultades para obtener muestras óptimas para llevar a cabo análisis de expresión génica y de la medida de actividad GS.

En base a estas complicaciones metodológicas, decidimos emprender la búsqueda de nuevas formulaciones de medios que nos permitieran tener muestras menos complejas para finalmente caracterizar nuestro sistema en exceso, y principalmente, en limitación de N. Basándonos en datos bibliográficos, y luego de varias pruebas que incluyeron la variación de las cantidades de manitol (fuente de C) y de NH_4Cl o glutamato de sodio (fuentes de N) (**Tabla III.1**), encontramos mediante diferencias en las cinéticas de crecimiento, tres medios que parecían ser los adecuados para evaluar la limitación de N, y por ende, la NSR: Evans Glutamato y Evans NH_4^+ con una relación C/N=70; y para evaluar el exceso de N: Evans NG, con una relación C/N=6,8 (**Figura III.9**).

A partir de las cinéticas de crecimiento pudimos determinar que el cultivo de *B. diazoefficiens* en los medios Evans Glutamato y Evans NH_4^+ presentaron un tiempo de duplicación significativamente mayor que el observado cuando la bacteria es cultivada en Evans NG. Más aún, los cultivos en los medios limitados alcanzaron una menor biomasa final (DO_{500} aproximadamente 2) en relación a la obtenida cuando se cultivaron en Evans NG ($\text{DO}_{500}=8$) (**Tabla III.4**).

Por otra parte, los cultivos de *B. diazoefficiens* crecidos en Evans NH_4^+ y Evans Glutamato presentaron un aumento relativo de los niveles de ARNm del gen *glnII* que codifica para la enzima GSII y que se induce en condiciones de escasez de N (Carlson *et al.*, 1987) en relación a los niveles obtenidos para los cultivos en Evans NG (**Figura III.11**). Estos resultados nos indican que las bacterias cultivadas en los medios Evans Glutamato o Evans NH_4^+ tienen activada, al menos a nivel de expresión, la cascada NSR.

Adicionalmente, pudimos corroborar que los resultados observados a nivel de transcripto se vieron reflejados en la funcionalidad de la enzima, indicando que el

sistema de respuesta al estrés por N se encuentra más activado en los medios Evans Glutamato o Evans NH_4^+ que en el medio Evans NG. Así, pudimos determinar que la cepa cultivada en los medios Evans Glutamato o Evans NH_4^+ mostró una mayor actividad GS comparada con la medida para las bacterias cultivadas en Evans NG (**Figura III.12**), indicando que los dos medios seleccionados se encontraban limitados en N. Es importante destacar que el método biosintético utilizado mide la actividad GS total, es decir, de todas las isoformas activas de la enzima, y no solamente la activación de la isoforma GSII. En los capítulos siguientes ahondaremos en este tema en profundidad. Finalmente, con los datos recolectados nos propusimos evaluar el sistema de respuesta al estrés por N en estos tres medios Evans NG, Evans Glutamato y Evans NH_4^+ para analizar las condiciones del sistema “apagado” (exceso de N) o “encendido” (limitación de N). Sin embargo, y debido a que esta problemática de reformulación de medios se llevó a cabo una vez que ya habíamos avanzado en gran medida en el estudio del sistema, decidimos no descartar los resultados obtenidos en los medios con las formulaciones originales de Evans, Evans Bajo N y Evans Bajo C. Es por esto que los resultados que se muestran en los capítulos siguientes también corresponden a la caracterización del sistema en estos medios originales.

Capítulo IV

**Caracterización genómica
de las glutamino sintetasas
de *B. diazoefficiens* USDA 110**



Introducción

Como mencionamos en el **Capítulo III**, las bacterias pueden utilizar una amplia gama de fuentes nitrogenadas que van desde simples compuestos inorgánicos tales como NH_4^+ , N_2 , NO_3^- y NO_2^- , a compuestos más complejos que incluyen aminoácidos o compuestos orgánicos. Cualquiera sea la fuente nitrogenada utilizada, en primer lugar, ésta debe ser metabolizada hasta obtener NH_4^+ . Luego, en el caso particular de los rizobios, la vía más importante para la asimilación de este nutriente en vida libre es el ciclo de la glutamino sintetasa / glutamato sintetasa (ciclo GS/GOGAT). Esto se debe a que, como ya mencionamos en la Introducción de este trabajo, estas bacterias carecen de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) que poseen muchos microorganismos.

En el ciclo GS/GOGAT, la enzima GS es la responsable de catalizar la reacción en la cual el NH_4^+ es incorporado en una molécula de glutamato para producir otro aminoácido con mayor contenido de N, la glutamina (Darrow, 1980).



La glutamina por su parte provee el N para la biosíntesis de los monómeros de los ácidos nucleicos, proteínas, diversos cofactores y otros compuestos de importancia biológica, lo que convierte a la GS en una de las enzimas clave del metabolismo del N.

Una particularidad de la enzima GS es que se encuentra altamente distribuida en la naturaleza, puede encontrarse tanto en bacterias y arqueas como en tejidos animales y plantas. En el caso de nuestra bacteria de estudio, *B. diazoefficiens* USDA 110, se han descrito hasta el momento la presencia de dos isoformas de GS, a diferencia de las enterobacterias que sólo tienen una. Como ya mencionamos en capítulos anteriores, estas isoformas se denominan GSI y GSII (Carlson *et al.*, 1985; Carlson *et al.*, 1987), y están codificadas por los genes *glnA* y *glnII* respectivamente.

Al iniciar nuestro trabajo, detectamos mediante búsquedas en las bases de datos genómicos la presencia de más de una copia putativa para el gen *glnA* en el genoma de *B. diazoefficiens* USDA 110 (Kaneko *et al.*, 2002), mientras que para GSII solamente encontramos una copia del gen que la codifica. Las distintas copias de *glnA* no han sido descritas ni estudiadas hasta este momento. Por lo tanto, dada la importancia de esta

enzima en el metabolismo de N, nos preguntamos si todas las copias son funcionales, y de ser así, en qué condiciones se activan. Además, nos resultó interesante investigar si todas las copias de *GlnA* están involucradas en la asimilación de NH_4^+ y finalmente, si pueden reemplazarse unas a otras.

Con el objetivo de intentar responder alguna de estas preguntas, nos propusimos profundizar en el estudio de cada una de ellas. En primer lugar, realizaremos un análisis *in silico* de las diversas secuencias encontradas para las posibles GS de *B. diazoefficiens*. Además, abordaremos la construcción de mutantes delecionales de cada una de los genes que las codifican para luego llevar a cabo un análisis fenotípico de las cepas obtenidas y, de esta manera, intentar dilucidar el rol que cumplen cada una de ellas en *B. diazoefficiens*.

IV.1 Análisis bioinformático de las posibles copias de la enzima GS

Al comenzar con el estudio de las GSs observamos que en las bases de datos genómicos como Pubmed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) o Microbesonline (www.microbesonline.org), las búsquedas del gen *glnA* nos arrojaba como resultado la presencia de varias copias putativas de dicho gen en el genoma de *B. diazoefficiens* USDA 110 (Kaneko *et al.*, 2002), anotados en todos los casos como glutamina sintetasa. Debido a esto, decidimos nombrar como *glnA1* (ORF blr4949) a aquella copia que ha sido originalmente detectada por homología de secuencia con *glnA* de *E. coli* (Carlson *et al.*, 1985), y las siguientes copias se denominaron al azar como *glnA2* (blr4835), *glnA3* (bll1069) y *glnA4* (blr2084). Por otra parte, la búsqueda en bases de datos del gen *glnII* arrojó un único resultado que corresponde al ORF blr4169.

Como podemos observar en la **Figura IV.1**, las distintas copias de *glnA* de *B. diazoefficiens* se encuentran dispersas en el genoma. En general, la disposición génica de *glnA* en los genomas depende de la especie bacteriana que se esté estudiando. En *E. coli*, y otras enterobacterias en las que se ha descrito ampliamente el regulón Ntr, el gen *glnA* se encuentra formando parte del operón *ntr*, junto a los genes que codifican el sistema de dos componentes NtrB-NtrC (Schumacher *et al.*, 2013; van Heeswijk *et al.*, 2013).

En cambio, en *B. diazoefficiens*, como en muchas otras bacterias pertenecientes a las familias Rhizobiaceae y Bradyrhizobiaceae, *glnA1* (de 1410 nt) se encuentra ubicado de manera adyacente a *glnB* formando parte de una unidad transcripcional (Martin *et al.*, 1989; Chiurazzi *et al.*, 1990; Arcondéguy *et al.*, 1996). En el caso de *glnA2* (de 1431 nt) pareciera expresarse de manera independiente, mientras que *glnA3* (de 1437 nt) se encontraría formando parte de un operón con el gen *blr1070* que codifica para una enzima dioxigenasa. Por su parte, *glnA4* (de 1338 nt) parece expresarse en conjunto con los genes *blr2082* y *blr2083* (codificando proteínas hipotéticas). Finalmente, *glnII* (de 1035 nt) se expresaría de manera independiente. Los datos de coexpresión de los genes mencionados anteriormente se obtuvieron del servidor www.microbesonline.org.

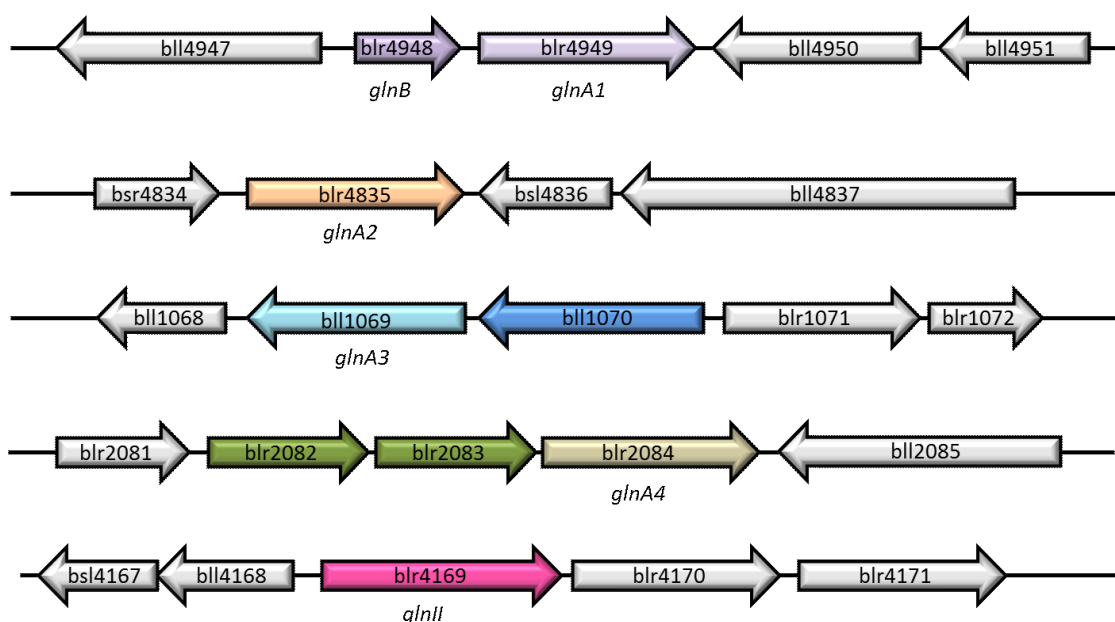


Figura IV.1 Representación del entorno genético y la disposición de los genes que codifican para las glutamino sintetasas de *B. diazoefficiens* USDA 110. En cada sección del genoma esquematizado se representan coloreados los genes correspondientes a las glutamino sintetasas y aquellos genes adyacentes que se coexpresan (los datos de coexpresión se obtuvieron del servidor www.microbesonline.org). En gris se representan los genes adyacentes que tienen expresión independiente y que no se encuentran involucrados en el metabolismo del N.

Como primera aproximación para estudiar las múltiples copias putativas de las enzimas glutamino sintetasas de *B. diazoefficiens*, decidimos evaluar, mediante diversos programas bioinformáticos, las características de las secuencias de aminoácidos de

dichas proteínas. A través del servidor ScanProsite (www.prosite.expasy.org/scanprosite), llevamos a cabo un análisis de sitios característicos donde pudimos observar que sólo las secuencias de GlnA1, GlnA2 y GSII presentaban una región característica de GS (secuencia resaltada en verde en la figura) y una región de unión a ATP (resaltada en amarillo) (**Figura IV.2**).

GlnA1 (blr4949)

MKTAKDVLKSIKDNVQYVDLRFTDPRGKQHVTFDVSMIDEDIFAEGTMFDGSSIAGWKAINESDMCLMPDPVTATIDPFFAETTMVITCDVLE
PTTGEPYNRDPRGIAKKAEAMVKSIMGVGDVTVFVGPAAEFFVDFDVRFSSTPYNTGFRLDSSSELPNTDTEYEGGNLGHRRVTKGGYFPVPPQDSV
QDMRSEMLGAMAKMGVKEKHHHEVASAQHELGMKFDTLMLADHLQIYKYCIHQVAHIYGKTATFMPKPVYGDNGSGMHVHQS IWKDGK
PVFAGNKYADLSETCLHYIGIHKAKAINAFTNPSTNSYKRLVPGYEAPVLLAYSARNRSASCRIPYTASPKAKRVEVRFDPDLANPYLGFAMLMMA
GLDGIKNKIDPGPAMDKDLYDLPKEELKQIPTVCGSLREALELNDKDRFLKAGGVDFDDFDISYIELKMTVEVERFEMTPHPVEFDMYYSG

GlnA2 (blr4835)

MVAKCTTAEDLVKAITDEKVMIDLRFTDLPGVWQHFSVPPSAVNADALNEGIGFDGSSIRGFQEIQESDMLV VADPTTAFVDPYSPAKTLVLIGNI
RDPVTTGQSYSDARAYIAQKAEIHLKGTGRADTSYFGPEAEFFVDEVRYAQGINYAMHAVDSSEGSWNTGSEEGPNLGHKPRPKGEYFPVPPPTDS
MQALRTEMVLTMESLGIQIEAHHHEVATGGQNEIDMRFTTLTRMADNLMIYKYVVKNTAHQH GKATATFMPKPLFEDNASGMHVHQS LWKGE
TNLFYDKGDYAELSQLGRYYIGLLSHAWALCGLCAPTNSYRRLVPGYEAPINLVYSQRNRASACRIPMYSNPRAKRVEFRSPDPSNPNYLAFAA
MLMAGLDGIDKQIDPGSPIDKNLYDLPPTTEAKEVKSTPGSLDQALDALERDHAFLLRGDVFTADVIETWLDYKRKKEVDPIRLRPHPYEFHLYYDI

GlnA3 (bl1069)

MTFVARHALWSDEQKDAQRMRRIIVEKNLEVIRLAFDPQHGILRGKTIIAEAIASLES GCSITTTMLAKDTS HRTVFPVFTSGGGFGMKEMEGA
ADVLVMDPTTFRVLPWAPTTGWVLCDLHFNDGRPVFATRGLYRKYVLELAGRGHDFVAGLEVEFHIFKLDLDPHMRADAGQPGTPPSVLSLLS
HGYYLQTEQRFQMEPVLEILRRDVALGLPLRSVEVEFGPSQCEFTFAPRKGLEPADNMVLFSAVKQJARRRHGYHATFMCRPKLPNLFAAGWH
LHQSVSRSTGENQFMAQAGGEPLSAFGRAYLAGLLDHARASAVFTPTINGYKRYRSYSLAPDRAIWGRDNRGVMIRVLGAAGDAATRLNRI
EPAANPYLYMASQILSGLDGVDRKLDPGPSADTPYETKAPLLPKSLRDAVAALKEDPFFREKFGAEFVDYYTHIKNAEIDRFLAEVTDWEHREYFEM
F

GlnA4 (blr2084)

MPTDPRFTGANPARAAMVGVSDFDGVLGRKHVLGEDLSGGDKVIKFEAVLAWDCTDRVIPASFTQKPLSAFGDADLRLILSGTGRSVSHLGSQYL
YLAFTGAHENICPRGVLKVLRRADHGYDCTAGFEFEFILFKENADTIEKPFGEWAPLTRGPFYSIARSIQHELFGELALCEKARIPSLGLHFET
GPGVVEASLRHCDALEAADRATIFKSMIKAWAQRGMMATFMAKVSEKWPQSGHIHISMSSDSQNAFYDGDADFNVSDLMRQFIAGQLEY
MINEFCVLAAPNFNSYKRLVPGSWAPICPSWGDNRSCAVRAIPGEPASHRLEYLPGADANPYLALACAIGSGILGVETGPALPASIVGDASVEMC
RPSARLPQSLSEATSRFAESAAASDVFGERFVGAFCSRHWEWQAVQHRVTDFFERRRYFEII

GSII (blr4169)

MTKYKLEYIWLGDYTPNLRGKTQIKEFASFPTEQLPLWGFDSSTQQAEGHSSDCVLPKVAVFPDAARTNGVLVMCEVMMMPDGKTPHASNK
RATILDDAGAWFGFEQYFYKDGRLGFPSTSGYPAPQGPYYTGVGFSNVGDVARKIVEEHLDLCLAAGINHEGINAEVAKGQWFEQIFGKGSKK
AADEMWMARYLMLRLTEKYIDIEFHCKPLGDTDWNGSGMHANFS TEYMRTVVGKEYFEALMAAFDKNLMDHIAVYGPNDKRLTGKHETA
PWNKFSYGVADRGAASIRVPHSVFNNGYKGYLEDRRPNSQGDPPYQIASQILKTISSVPTKKA

Figura IV.2 Análisis de regiones características de las secuencias proteicas de las enzimas glutamino sintetasas de *B. diazoefficiens* USDA 110, realizado a través del servidor *online* ScanProsite (www.prosite.expasy.org/scanprosite). La región característica de GS se resalta en verde, la región de unión a ATP se resalta en amarillo y la región donde se lleva a cabo la adenilación/deadenilación (inactivación/activación) de las proteínas GSI se resalta en celeste.

Además, en las secuencias de GlnA1 y GlnA2 se detectó la región característica de las isoformas GSI, donde se lleva a cabo la adenilación/deadenilación (inactivación/activación) de la proteína (resaltada en celeste), secuencia que no se encuentra en la isoforma GSII ya que no se regula por adenilación. Llamativamente, en

las secuencias de GlnA3 y GlnA4 no fue posible detectar ninguna de estas tres regiones (**Figura IV.2**).

Estos datos resultaron coincidentes con el análisis de dominios de dichas secuencias (utilizando el servidor *online* Pfam - www.pfam.xfam.org/search/sequence), donde pudimos observar que sólo GlnA1, GlnA2 y GSII poseían los dos dominios característicos: un dominio N-terminal de plegamiento beta-Grasp (en el que se encuentra la región característica GS) y un dominio catalítico en el extremo C-terminal (en el que está el sitio de unión a ATP y de adenilación para el caso de las GlnA). A partir de las secuencias de las copias GlnA3 y GlnA4 sólo se pudo detectar la presencia del dominio catalítico (**Figura IV.3**).



Figura IV.3 Análisis de dominios de las proteínas glutamino sintetasa de *B. diazoefficiens* USDA 110 (utilizando el servidor *online* Pfam). En la Figura se observan el dominio N-terminal de plegamiento beta-Grasp (verde) y un dominio catalítico en el extremo C-terminal (rojo).

De manera similar, cuando alineamos las secuencias proteicas (mediante el servidor *online* ClustalO- www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo) de las copias putativas GlnA2, GlnA3 y GlnA4, en relación a la copia GlnA1, y las comparamos a través del programa BLAST (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) pudimos observar que el porcentaje de identidad entre GlnA1 y GlnA2 es de un 53% (**Figura IV.4 – Panel A**), mientras que GlnA1 con GlnA3 y con GlnA4 tan sólo tienen un 29% y un 26% de identidad, respectivamente (**Figura IV.4 – Paneles B y C**).

Además, podemos observar que los sitios característicos obtenidos a través del servidor ScanProsite para GlnA1 no se encuentran conservados en las copias GlnA3 y GlnA4,

siendo esta última copia la que posee la diferencia más exacerbada (Figura IV.4 – Paneles B y C).



Figura IV.4 Alineamiento de las secuencias proteicas (mediante el servidor *online* ClustalO) de las distintas GS de *B. diazoefficiens* USDA 110. Tomando como referencia la copia GlnA1, se compara con las secuencias proteicas de **A)** GlnA2, **B)** GlnA3, **C)** GlnA4 y **D)** GSII. Las regiones resaltadas corresponden a la región característica de GS (verde), la región de unión a ATP (amarillo) y el sitio de adenilación/deadenilación de las proteínas GSI (celeste). Se resaltan en colores más oscuros aquellos aminoácidos que no coinciden exactamente con la secuencia de GlnA1.

Por su parte, cuando comparamos la secuencia proteica de la isoforma GSII con la copia GlnA1, encontramos que el porcentaje de identidad entre ellas es bajo, de tan sólo 24%. Sin embargo, ambas secuencias proteicas poseen los sitios característicos de GS y el sitio

de unión a ATP como mencionamos anteriormente (**Figura IV.2**). Como es de esperar, las secuencias de estas regiones características en GSII y GlnA1 no son exactamente iguales (**Figura IV.4 – Panel D**), pero pueden ser reconocidas como tales por el servidor ScanProsite y probablemente lleven a cabo la misma función.

Para completar estos análisis, llevamos a cabo un modelado de las probables proteínas GS utilizando el programa Phyre2 (www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2 -Kelley y Sternberg, 2009). Nuevamente, encontramos una mayor similitud entre la estructura predicha para las copias GlnA1 y GlnA2 (**Figura IV.5**), mientras que las copias GlnA3 y GlnA4 se diferencian de GlnA1 y GlnA2, ya que parecieran carecer de una región de plegamiento lámina beta (indicadas en la **Figura IV.5** con flechas blancas). Asimismo, y como era de esperar, el modelo de estructura proteica predicha para GSII difiere de los modelos para GSI.

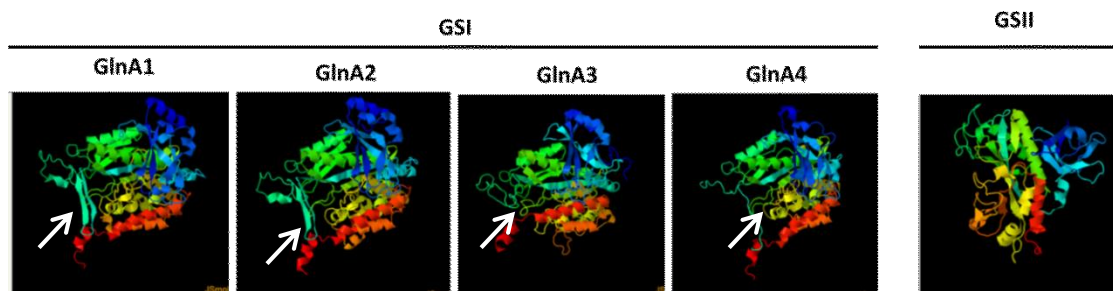


Figura IV.5 Representación de los modelados proteicos predichos para las distintas copias/isoformas de las glutamino sintetasas de *B. diazoefficiens* USDA 110. Los modelos de homología fueron desarrollados mediante el programa *online* Phyre2 (Kelley. y Sternberg, 2009). Los colores del arcoíris indican el camino desde el extremo N (rojo) al C terminal (azul). Las flechas blancas indican la región del plegamiento de lámina beta que se encuentra presente en las copias GlnA1 y GlnA2 y ausente en las copias GlnA3 y GlnA4.

Finalmente, para completar nuestros estudios, realizamos un análisis evolutivo de las secuencias mediante la construcción de un árbol filogenético (**Figura IV.6**).

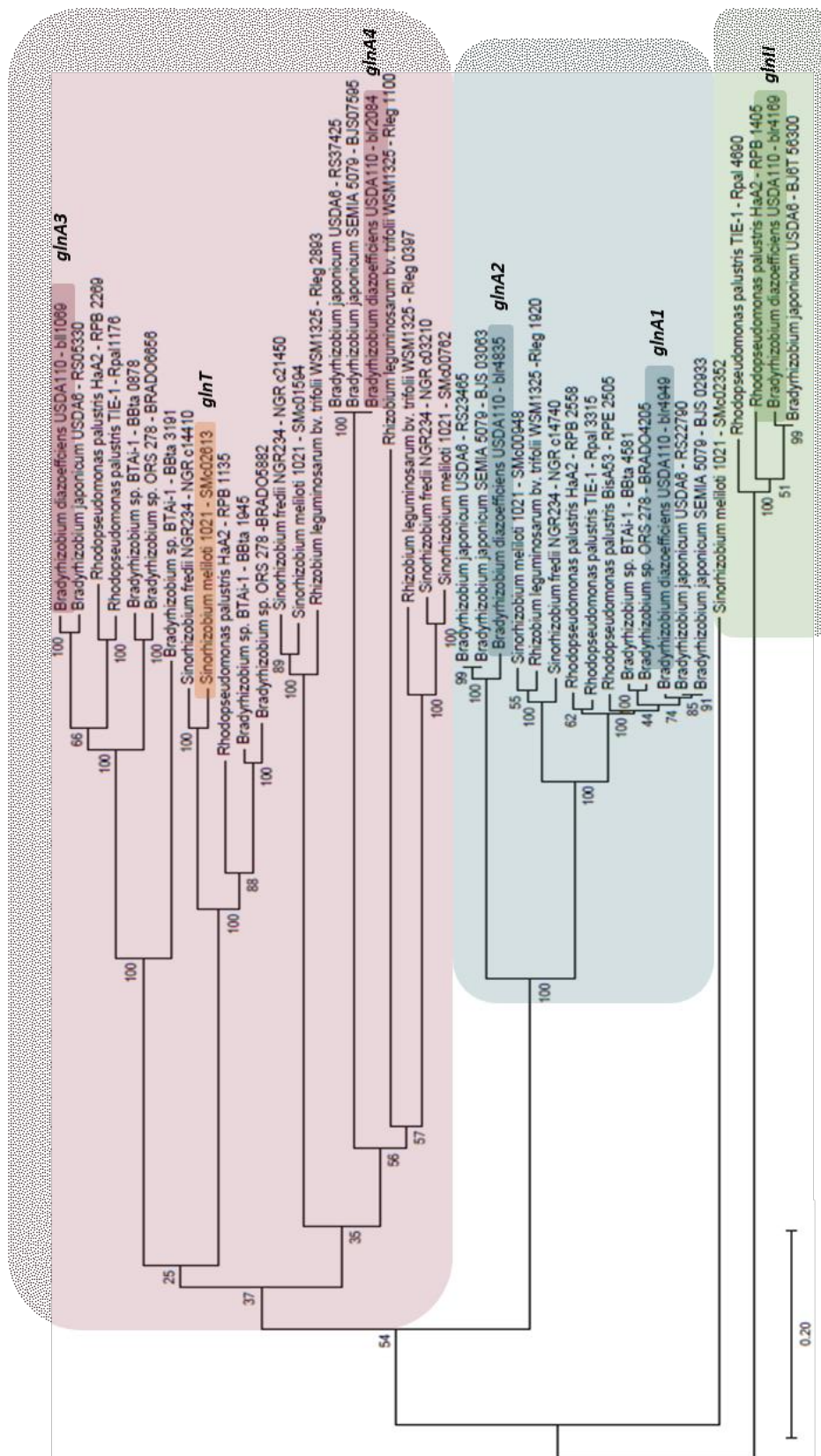


Figura IV.6 Análisis filogenético de las enzimas glutamino sintetasas de *B. diazoefficiens* USDA 110. La historia evolutiva se dedujo utilizando el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo LG (Le y Gascuel, 1993). El porcentaje de árboles en el que los taxones asociados se agrupan se muestra junto a las ramas. El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama medidas en el número de sustituciones por sitio. El análisis involucró 34 secuencias de aminoácidos. Se eliminaron todas las posiciones que contenían lagunas y datos faltantes. Hubo un total de 287 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se llevaron a cabo en MEGA6 con 1000 repeticiones (Tamura *et al.*, 2013).

Para llevar a cabo la construcción del árbol se obtuvieron las secuencias de las enzimas GSI de diversas bacterias evolutivamente cercanas a *B. diazoefficiens* y secuencias de las GSII para enraizar el árbol. Mediante esta búsqueda de secuencias pudimos confirmar que la presencia de múltiples copias para *glnA* no es una característica única de nuestro rizobio de interés, sino que también es posible encontrarlas en muchas otras bacterias dentro de las familias Rizobiaceae y Bradyrhizobiaceae. Incluso, se ha reportado ya hace varios años que en bacterias como *E. meliloti*, *Rhizobium etli* o *R. leguminosarum* existe una tercer isoforma de GS, la que se denominó GSIII (codificada por el gen *glnT*), que sólo tiene un 28 % de identidad con las GS de otras bacterias (de Brujin *et al.*, 1989; Chiurazzi *et al.*, 1992; Shatters *et al.*, 1993).

El análisis del árbol filogenético obtenido para las distintas GSs (**Figura IV.6**) nos arrojó que las copias *glnA1* y *glnA2* de *B. diazoefficiens* se encuentran ubicadas dentro de un mismo grupo, mientras que las copias *glnA3* y *glnA4* se encuentran en grupos diferentes y distantes de las copias 1 y 2. Incluso, *glnA3* se encuentra cercana a *glnT* (GSIII) de *E. meliloti* 1021.

Resumiendo, los resultados de estos análisis bioinformáticos, hemos encontrado que GlnA1 y GlnA2 son enzimas que pertenecen a la familia de la isoforma GSI. Mientras que las copias GlnA3 y GlnA4 parecerían estar más alejadas y pertenecer a una familia diferente de GS.

IV.2 Obtención de cepas mutantes en las enzimas glutamino sintetasas

Las enzimas GS ejercen un rol muy importante en el flujo metabólico del N en vida libre. Como la actividad de esta enzima y su regulación ha sido poco estudiada en *B. diazoefficiens*, resulta de interés profundizar el papel que juegan GSI y GSII en la asimilación y el reciclado de N intracelular en los rizobios en vida libre. Debido a esto, y dada la relevancia de estas enzimas nos propusimos obtener cepas mutantes en las diversas copias de las glutamino sintetasas.

*IV.2.1 Obtención del mutante delecional en el gen *glnII* (que codifica para la enzima GSII)*

La estrategia general que elegimos para llevar a cabo la mutagénesis del gen *glnII* implica la obtención de un mutante delecional de dicho gen a partir de una doble recombinación homóloga y la inserción de un cassette que confiere resistencia a kanamicina. Dado que el gen *glnII*, no se encuentra formando parte de ninguna unidad transcripcional (**Figura IV.1**), el reemplazo de dicho gen por un cassette de resistencia no debería afectar la expresión de los genes vecinos.

Para esta estrategia, se propuso insertar en el plásmido pG18mob2 (un vector suicida en rizobios) dos fragmentos homólogos a los extremos 5' y 3' del gen de interés, separados por el gen que confiere resistencia a Km.

La obtención de la construcción necesaria para generar el mutante en el gen *glnII* se inició como parte de mi Trabajo Final de Licenciatura (Lamelza, 2013), por lo que en la estrategia general descrita en la **Figura IV.7** sólo se muestran los pasos llevados a cabo en el presente trabajo para culminar la obtención del mutante. En este contexto, durante el trabajo previo, se logró insertar en el pG18mob2 el fragmento homólogo al extremo 3' del gen *glnII* y el cassette de resistencia a Km, obteniéndose el plásmido pG18mob::*l3'*::Km.

Sin embargo, cuando intentamos insertar directamente el fragmento homólogo al extremo 5' de *glnII* en el plásmido pG18mob::*l3'*::Km, se presentaron grandes dificultades en el clonado, como se detalla en Lamelza, 2013. Estos inconvenientes nos llevaron a pensar que alguno de los sitios de restricción que se habían adicionado a los cebadores *glnII* 5'FW / *glnII* 5'Rv (detallados en la **Tabla II.3.1**) probablemente contenían algún error en su secuencia haciendo que la digestión enzimática no se llevara a cabo correctamente por lo que decidimos diseñar una nueva estrategia. Para ello, nos propusimos clonar en primer instancia, el fragmento 5' en el vector pG18mobLK y luego subclonarlo al pG18mob::*l3'*::Km, utilizando los sitios de restricción que confiere el sitio de múltiple clonado del plásmido pG18mobLK.

En primer lugar, se amplificó por PCR el fragmento 5' utilizando los cebadores *glnII* 5'FW / *glnII* 5'Rv y la enzima PFU polimerasa para obtener un fragmento de extremos romos de 451pb, como se observa en la **Figura IV.7 – gel a**. Paralelamente, se obtuvo el ADN

plasmídico del pG18mobLK y se lo digirió con la enzima *SmaI* para obtener el plásmido linealizado con extremos romos (**Figura IV.7 – gel b**). Finalmente, se procedió a llevar a cabo la ligación del fragmento y el plásmido linealizado. La inserción del fragmento 5' en el pG18mobLK se chequeó por PCR utilizando los cebadores universales M13(-40) Fw /M13(-40) Rv que hibridan únicamente en el plásmido y por fuera del sitio múltiple de clonado, esperando obtener un fragmento de 666pb. En la **Figura IV.7 – gel c** puede observarse que se obtuvo un único clon que posee el fragmento deseado.

A partir del ADN plasmídico del clon seleccionado se llevó a cabo una digestión enzimática con *KpnI* para liberar nuestro fragmento de interés (**Figura IV.7 – gel d**). En particular, se seleccionó la enzima *KpnI* ya que el pG18mobLK, como se indica en el esquema de la **Figura IV.7**, posee 2 sitios de restricción para *KpnI* ubicados en los extremos del sitio múltiple de clonado y por fuera del sitio *SmaI* donde se insertó el fragmento 5'. A la vez se llevó a cabo la digestión enzimática del plásmido pG18mob:://3'::Km con la enzima *KpnI* para linealizarlo (**Figura IV.7 – gel d**).

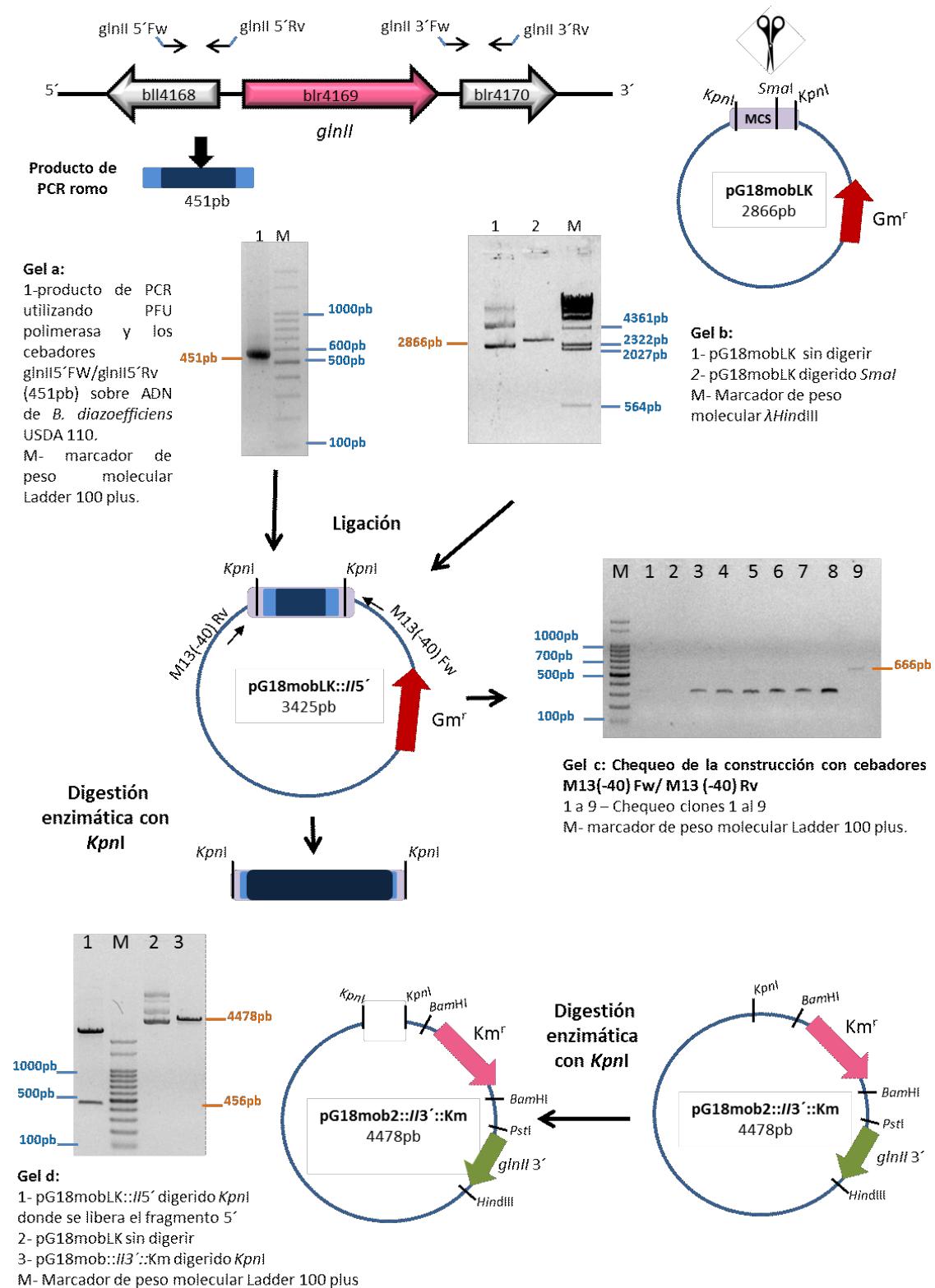


Figura IV:7 Esquema general de la estrategia de clonado del fragmento 5' del gen *glnII* en el plásmido pG18mob::II3'::Km. A los lados de los geles se indican los pesos moleculares de los fragmentos de interés (naranja) y del marcador de peso molecular (celeste).

Posteriormente, se ligó el plásmido linealizado con el fragmento liberado con *KpnI*. Como resultado de la ligación pueden obtenerse dos posibles orientaciones (**Figura IV.8 – Panel A**). Una de ellas con el fragmento insertado en la orientación deseada (orientación 1) y otra con el fragmento en la orientación invertida (orientación 2).

Las colonias obtenidas luego de la transformación se chequearon por PCR utilizando la combinación de los cebadores M13(-40) Rv y *glnII* 5'Rv (ver secuencia **Tabla II.3.1**). Como muestra el esquema de la **Figura IV.8 – Panel A** al utilizar este par de cebadores sólo se obtendrá la amplificación de un fragmento de 495pb en aquellas colonias que contengan el fragmento 5' en la orientación deseada (orientación 1).

En la **Figura IV.8 – Panel B** se puede observar que como resultado de la PCR con los cebadores M13(-40) Rv y *glnII* 5'Rv se obtuvieron dos colonias con el fragmento 5' en la orientación correcta. Se seleccionó una de ellas, se extrajo el ADN plasmídico y se confirmó la presencia del fragmento de interés mediante digestión enzimática con la enzima *EcoRI* liberándose un fragmento de 430pb (**Figura IV.8 - Panel C**). Luego, esta construcción se secuenció y se la denominó pFL4169. Finalmente, el plásmido pFL4169 se transfirió a *E. coli* S17-1 y se llevó a cabo la conjugación biparental con *B. diazoefficiens* USDA 110 como se describió en el **Capítulo II**.

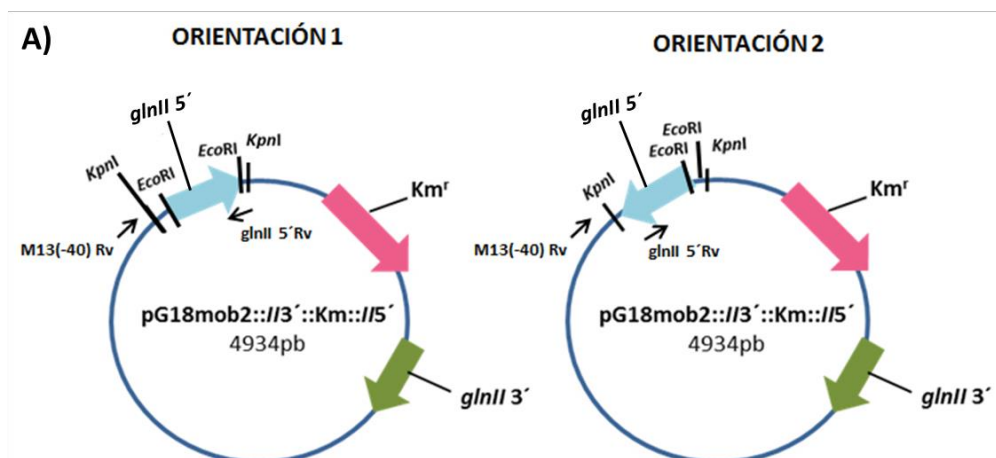


Figura IV.8 Mapa esquemático de las orientaciones que se pueden obtener mediante la ligación del pG18mob2::I13'::Km y el fragmento I15' y confirmación de la obtención del vector pG18mob2::I13'::Km::I15'. **A)** Esquema de los posibles resultados de la ligación del pG18mob2::I13'::Km y el fragmento 5' del *glnII* digeridos *KpnI*. Además, se esquematizan los sitios de hibridación de los cebadores M13(-40) Rv y *glnII* 5'Rv utilizados para los chequeos de construcción. A la izquierda se muestra el vector con la orientación 1 (vector deseado) y a la derecha, se muestra el vector con la orientación 2 con el fragmento 5' del *glnII* invertido.

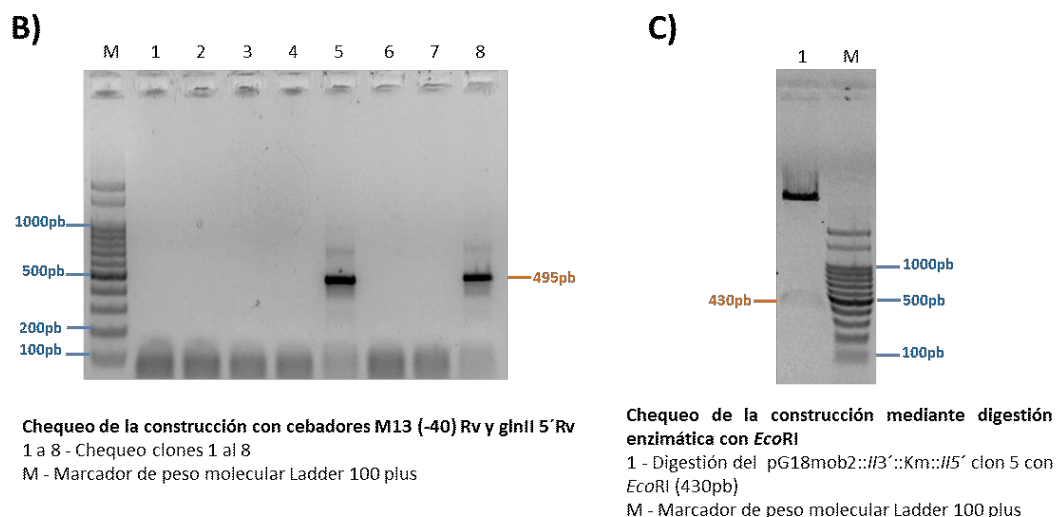


Figura IV.8 – Continuación **B)** Fragmentos amplificados mediante la PCR con cebadores M13(-40) Rv y *glnII* 5'Rv sobre ADN obtenido por lisis bacteriana de los clones obtenidos de la ligación de pG18mob2::*IIB*::Km y el fragmento 5'. **C)** Fragmento obtenido por digestión enzimática con *EcoRI* del plásmido pG18mob2::*IIB*::Km::*IIS* clon 5 que confirma que el clon posee la orientación 1.

Inicialmente, se seleccionaron los transconjugantes Cm^r (resistencia conferida por *B. diazoefficiens*) y Km^r (resistencia conferida por el cassette insertado entre el fragmento 5' y el 3'). Las colonias transconjugantes obtenidas se repicaron en cajas réplicas Cm-Km y Cm-Km-Gm y se seleccionaron aquellas colonias Km^r Gm^s (indicando la presencia del cassette de resistencia a Km pero la ausencia del plásmido que confiere resistencia Gm). Finalmente, la obtención del mutante se chequeó mediante PCR utilizando el cebador Cheq_ *glnII*_Fw que hibrida por fuera del sitio de recombinación del extremo 5' del *glnII* y el cebador Km Rv que hibrida en el cassette de resistencia a Km. Como producto de la PCR obtuvimos un fragmento de 1100pb (**Figura IV.9 – gel a**). Para comprobar que la recombinación por el extremo 3' de *glnII* también se llevó a cabo exitosamente, se realizó otra PCR utilizando el cebador Cheq_ *glnII*_Rv que hibrida por fuera del sitio de recombinación del extremo 3' del *glnII* y el cebador Km Fw dando como resultado un fragmento de 840 pb (**Figura IV.9 – gel b**). En ambos casos, se obtuvieron los fragmentos esperados, los cuales se purificaron y se secuenciaron de manera de corroborar que la inserción se produjo en el lugar del genoma deseado y que efectivamente se obtuvo el mutante en el gen *glnII* el cual se denominó Δ *glnII*.

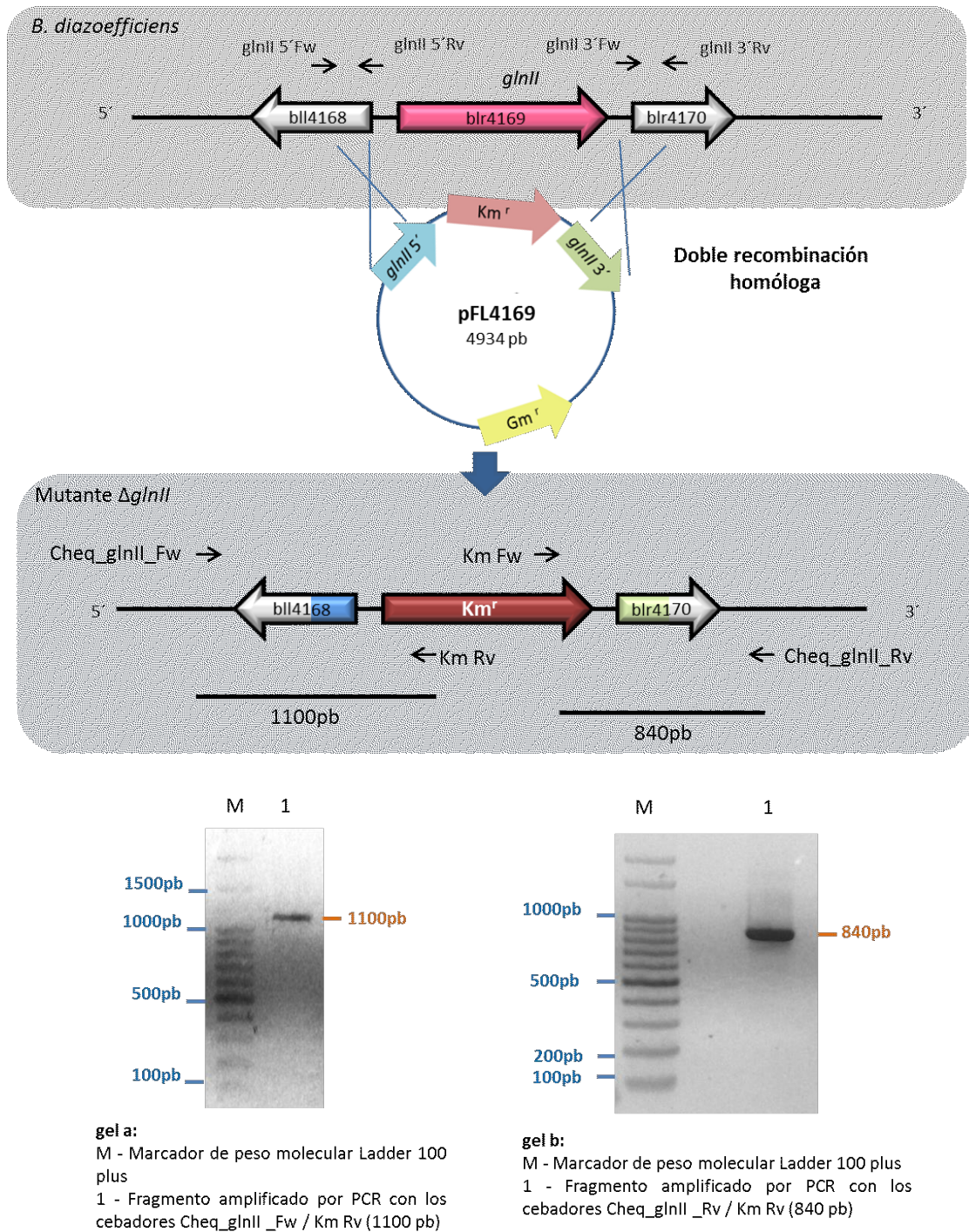


Figura IV.9 Obtención del mutante Δ *glnII* por doble recombinación homóloga, y posterior confirmación del mismo. En la parte superior de la figura se observa un esquema de la estrategia de doble recombinación homóloga y el sector del genoma que se propuso deletar en la cepa salvaje *B. diazoefficiens* USDA 110 (recuadro gris) así como también el esquema de la región génica obtenida luego de la recombinación con la inserción del cassette Km^r que da como resultado la cepa mutante en *glnII* (recuadro celeste). Además, se esquematiza el sitio de hibridación de los cebadores Cheq_glnII_Fw/ Km Rv y Cheq_glnII_Rv/ Km Fw utilizados para corroborar la obtención del mutante Δ *glnII*. En la parte inferior se observan las amplificaciones obtenidas por PCR con los cebadores Cheq_glnII_Fw/ Km Rv (**gel a**) y Cheq_glnII_Rv/ Km Fw (**gel b**) que confirman la obtención de la cepa mutante. A los lados del gel se indican los pesos moleculares de los fragmentos de interés (naranja) y del marcador de peso molecular (celeste).

IV.2.2 Obtención de cepas mutantes en los genes que codifican para las enzimas GSI

En base a los datos bioinformáticos obtenidos al analizar las secuencias de las GSI y con el objetivo de profundizar en el estudio de estas enzimas en *B. diazoefficiens* USDA 110, nos propusimos obtener mutantes en los genes que codifican para las distintas copias de GSI: *glnA1*, *glnA2* y un doble mutante *glnA1glnA2*. Sin embargo, teniendo en cuenta algunos resultados observados cuando comenzamos a caracterizar las cepas mutantes en *glnA* que habíamos construido hasta ese momento, y dado que *glnA3* pareciera ser similar a la GSIII de *E. meliloti* (al menos se agrupa en el árbol filogenético cerca de *glnT*), nos propusimos también deletar esta copia aunque no posea las regiones características de las GSI.

Para la obtención de los mutantes de las GSI se llevaron a cabo distintas estrategias. En particular, para la delección de *glnA1* se llevó a cabo la estrategia que se muestra en la **Figura IV.10**. Se utilizaron los cebadores *glnA1 Fw* y *glnA1 Rv* (ver secuencia en **Tabla II.3.1**) para amplificar, mediante PCR con la enzima PFU polimerasa, un fragmento como de 1708pb que contenía el gen *glnA1* completo y parte de las zonas flanqueantes al mismo (**Figura IV.10 - esquema y gel a**). Simultáneamente, se realizó una extracción de ADN plasmídico del vector pBlueScriptSK(+) (Stratagene), el cual posee en su sitio múltiple de clonado la región de corte para la enzima de restricción *EcoRV* que nos permite obtener un plásmido lineal con extremos romos. El pBlueScriptSK(+) se digirió con dicha enzima (**Figura IV.10- gel b**) y se ligó con el fragmento de extremos romos que contenía el *glnA1*, obteniéndose la construcción pBlue::*glnA1*. Luego, utilizando los sitios de restricción *HindIII* y *XbaI* del sitio múltiple de clonado (MCS) del plásmido, se liberó el fragmento que había sido inicialmente clonado y se lo transfirió al vector pK18mobSacB (Schafer *et al.*, 1994) (que previamente había sido digerido con las enzimas *HindIII* y *XbaI*) (**Figura IV.10- gel c**). De esta manera, obtuvimos el vector pK18mob::*glnA1* conteniendo el gen *glnA1* completo.

Finalmente, a partir de los sitios de restricción *XhoI* que se encuentran en el interior del gen *glnA1* se llevó a cabo una nueva digestión enzimática permitiendo la liberación de un fragmento de 975pb perteneciente a la región media de dicho gen. Esta digestión y posterior re-ligación del plásmido permite mantener dos regiones homólogas al genoma

de *B. diazoefficiens* de 400pb río arriba de la región eliminada y de 333pb río abajo de la misma. Estas regiones serán las utilizadas posteriormente para llevar a cabo la doble recombinación homóloga que conducirá a la delección de *glnA1* y la obtención de la cepa mutante. Se corroboró por PCR, utilizando los cebadores *glnA1_Fw* y *glnA1_Rv*, que el plásmido pK18mobSacB contenga el gen *glnA1* truncado (**Figura IV.10- gel d**) y posteriormente mediante secuenciación. La construcción obtenida se denominó pFL4949.

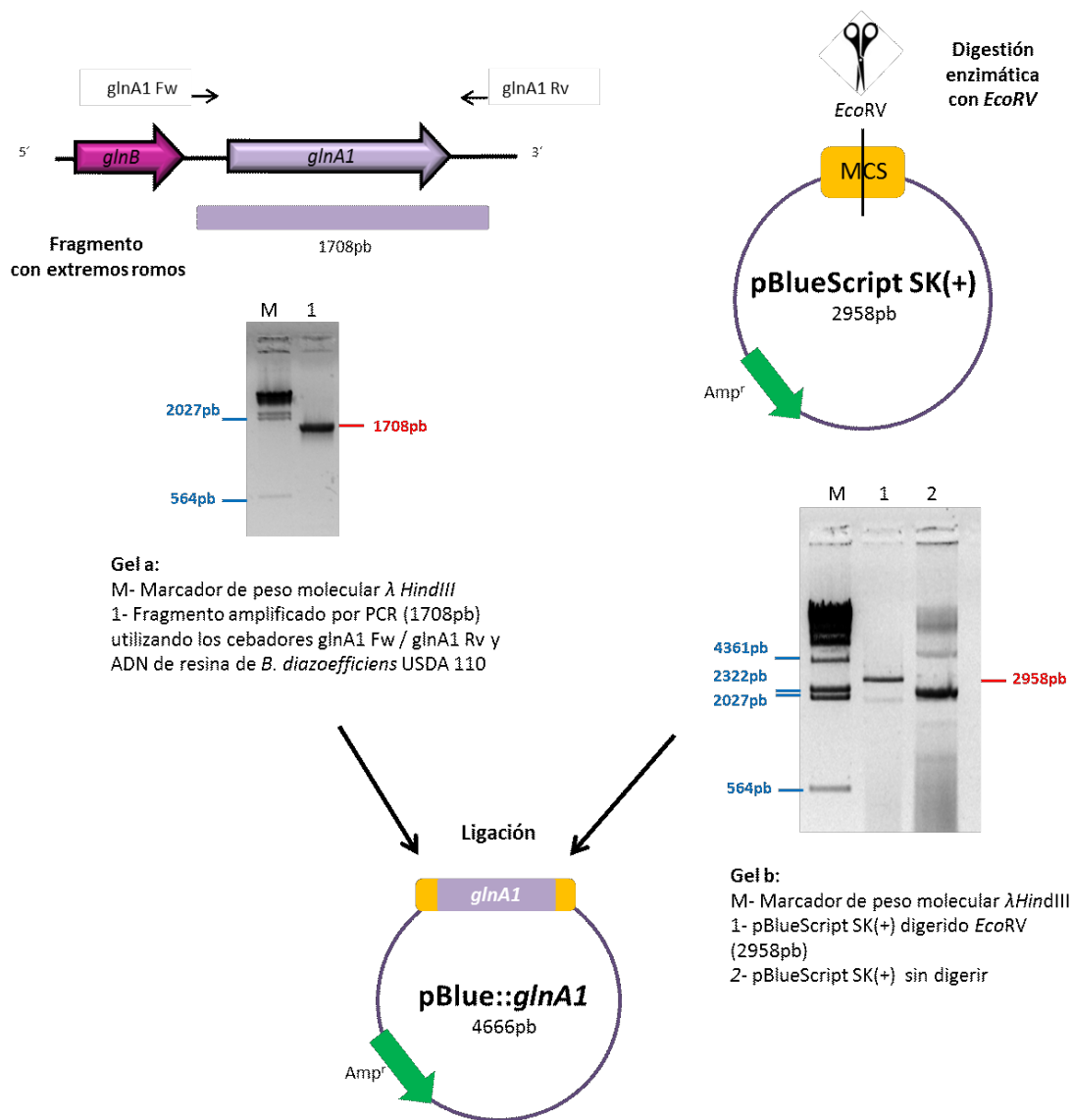


Figura IV.10 Esquema de la estrategia de clonado para la construcción del vector pFL4949 empleado para realizar la delección de *glnA1* (blr4949) en *B. diazoefficiens* USDA 110. A los lados del gel se indican los pesos moleculares de los fragmentos de interés (rojo) y del marcador de peso molecular (celeste).

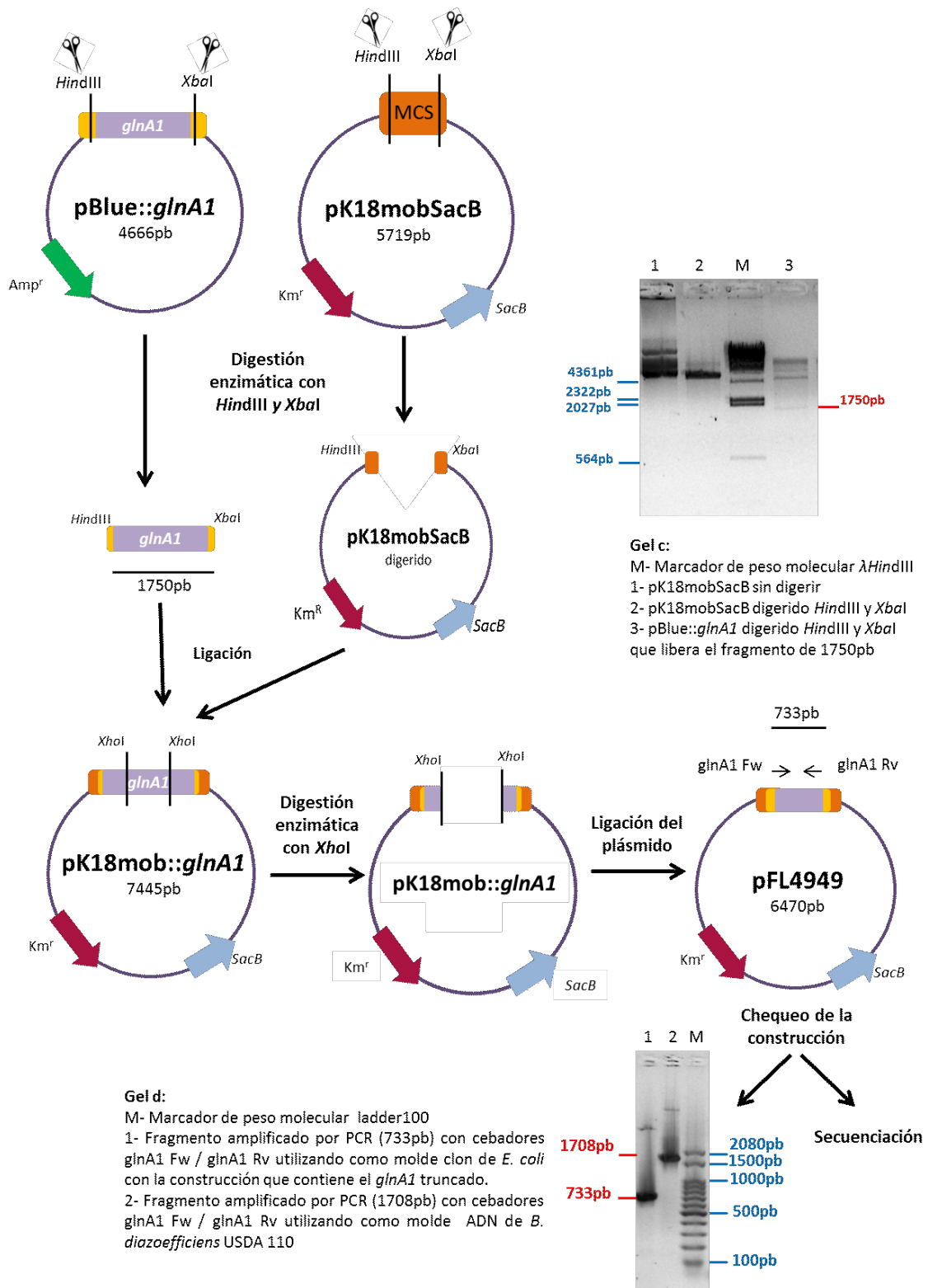


Figura IV.10 Continuación Esquema de la estrategia de clonado para la construcción del vector pFL4949 empleado para realizar la delección de *glnA1* (blr4949) en *B. diazoefficiens* USDA 110 y chequeo de la construcción obtenida. A los lados de los geles se indican los pesos moleculares de los fragmentos de interés (rojo) y del marcador de peso molecular (celeste).

Una vez obtenido el vector pFL4949 se introdujo en una cepa *E. coli* S17-1 y se movilizó a *B. diazoefficiens* USDA 110 mediante una conjugación biparental como se detalla en el **Capítulo II**. La selección de transconjugantes se llevó siguiendo la estrategia descrita por Sukdeo y Charles (2003) como se detalla en el inciso **II.3.12**. Brevemente, se seleccionaron los transconjugantes Km^r y se realizó la segunda selección en el medio YEM-sacarosa 10% (con el objetivo de inducir la segunda recombinación homóloga). De las colonias capaces de crecer en YEM-sacarosa 10% se seleccionaron aquellas Km^s-Cm^r. La delección de *glnA1* se corroboró mediante PCR con cebadores externos a los sitios de recombinación Check_ *glnA1*_Fw/Check_ *glnA1*_Rv (ver secuencia en **Tabla II.3.1** y **Figura IV.11**) y posteriormente se secuenció verificándose la delección del gen en el lugar correcto. El mutante obtenido se denominó Δ *glnA1*.

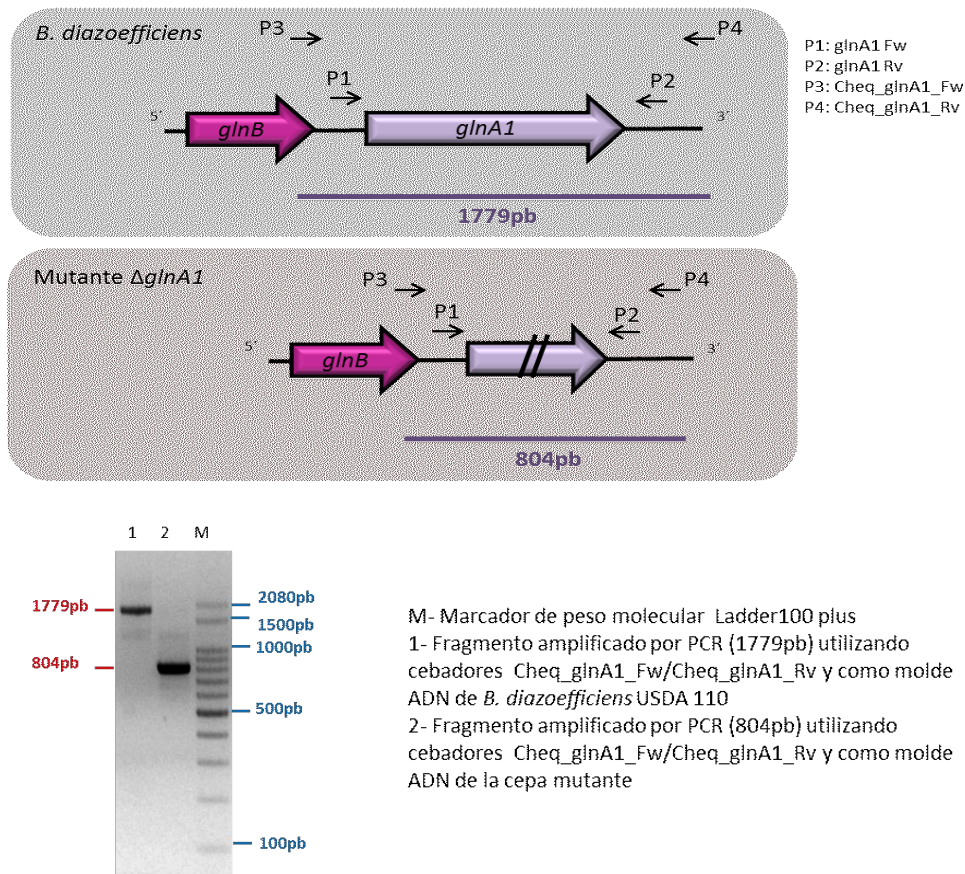


Figura IV.11 Mapa esquemático del gen *glnA1* (blr4949) y confirmación mediante PCR de la obtención del mutante Δ *glnA1*. En la parte superior de la imagen se observa un esquema del sitio de hibridación de los cebadores Check_ *glnA1*_Fw/Check_ *glnA1*_Rv en la cepa salvaje *B. diazoefficiens* USDA 110 (recuadro gris) y en la cepa mutante en *glnA1* (recuadro rosa). En la parte inferior se observa la amplificación que confirma la obtención de la cepa mutante mediante PCR con los cebadores mencionados anteriormente. También se incluye como control la amplificación obtenida para la cepa salvaje. A los lados del gel se indican los pesos moleculares de los fragmentos de interés (rojo) y del marcador de peso molecular (celeste).

La estrategia utilizada para la obtención del mutante en la copia *glnA2* (blr4835) se detalla en la **Figura IV.12**. En primer lugar, se amplificaron por PCR fragmentos flanqueantes al gen de interés utilizando los cebadores *glnA2* 5'Fw/ *glnA2* 5'Rv obteniéndose un fragmento de 270pb río arriba del gen *glnA2* (**PCR1**) y el par de cebadores *glnA2* 3'Fw/ *glnA2* 3'Rv que amplifican 314pb del extremo 3' del gen *glnA2* (**PCR2**) (**Figura IV.12 - gel a**). Las secuencias de los cebadores utilizados se encuentran detalladas en la **Tabla II.3.1**. Estos cebadores fueron diseñados para introducir en el extremo 5' del cebador Reverse de la PCR1 una secuencia sintética de 21 nucleótidos y en el extremo 5' del cebador Forward de la PCR2 la secuencia sintética complementaria. Estas secuencias complementarias, a su vez, tienen incluido un sitio de corte para la enzima de restricción *Bam*HI.

Una vez obtenidos los productos de las PCR1 y PCR2, los mismos se utilizaron en cantidades iguales como ADN molde para llevar a cabo una tercer PCR (**PCR3**) utilizando la combinación de cebadores *glnA2* 5'Fw/ *glnA2* 3'Rv. El producto final obtenido (de 576pb) contiene la región río arriba del gen a delecionar unido por la secuencia sintética a la región 3' del mismo (**Figura IV.12 - gel b**). A partir del fragmento de la PCR3 se llevó a cabo la digestión enzimática del mismo utilizando las enzimas de restricción *Eco*RI y *Hind*III cuyos sitios de corte fueron adicionados en los cebadores *glnA2* 5'Fw y *glnA2* 3'Rv, respectivamente. En simultáneo, se llevó a cabo la misma digestión enzimática sobre el vector suicida en rizobios pG18mob2 (Kirchner *et al.*, 2003) que contiene los sitios de corte para dichas enzimas en el sitio múltiple de clonado (**Figura IV.12 - gel c**). Posteriormente, se procedió con la ligación del plásmido y el fragmento, obteniéndose como resultado el vector pG18mob::*glnA2*.

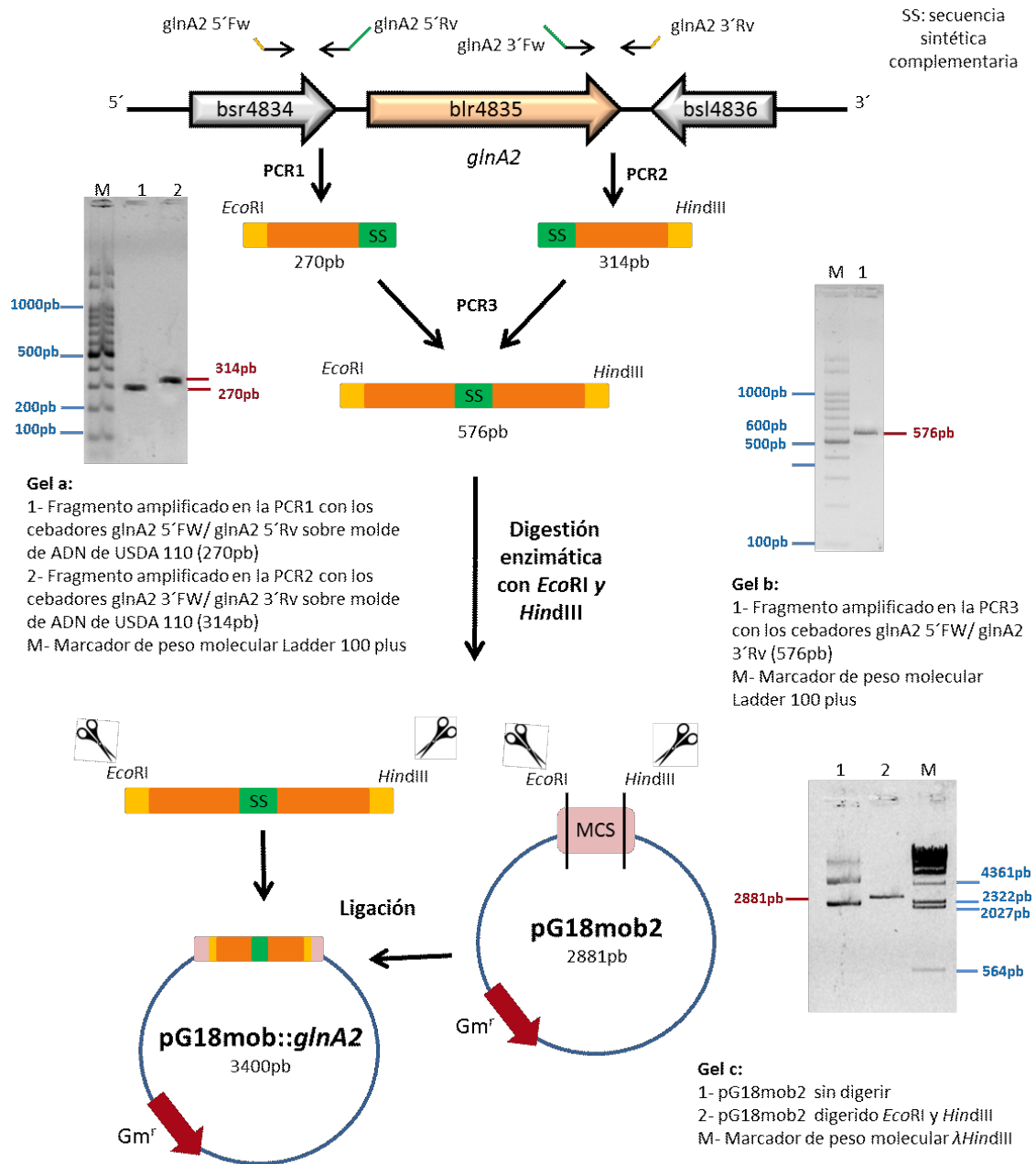


Figura IV.12 Esquema de la estrategia de clonado para la construcción del vector pFL4835 empleado para realizar la delección de *glnA2* (*blr4835*) en *B. diazoefficiens* USDA 110 y en la cepa mutante Δ *glnA1*. A los lados de los geles se indican los pesos moleculares de los fragmentos de interés (bordó) y del marcador de peso molecular (celeste).

Como mencionamos previamente, la secuencia sintética amplificada contiene un sitio de corte para la enzima *Bam*HI que se encuentra ubicado en la región media entre las dos secuencias homólogas al genoma de *B. diazoefficiens* amplificadas en las PCR1 y

PCR2. Utilizando este sitio de corte, clonamos entre las secuencias de la PCR1 y la PCR2 el omegón que confiere resistencia a Estreptomicina (Str)/Espectinomicina (Sp) (que previamente había sido digerido con la misma enzima de restricción *Bam*HI del vector pHPΩ45).

La construcción obtenida fue corroborada por PCR utilizando los cebadores Str/Sp y M13 (-40) Rv (la secuencia de los cebadores se detalla en **Tabla II.3.1**) (**Figura IV.12 - gel d**) y posteriormente secuenciado. El plásmido se denominó pFL4835.

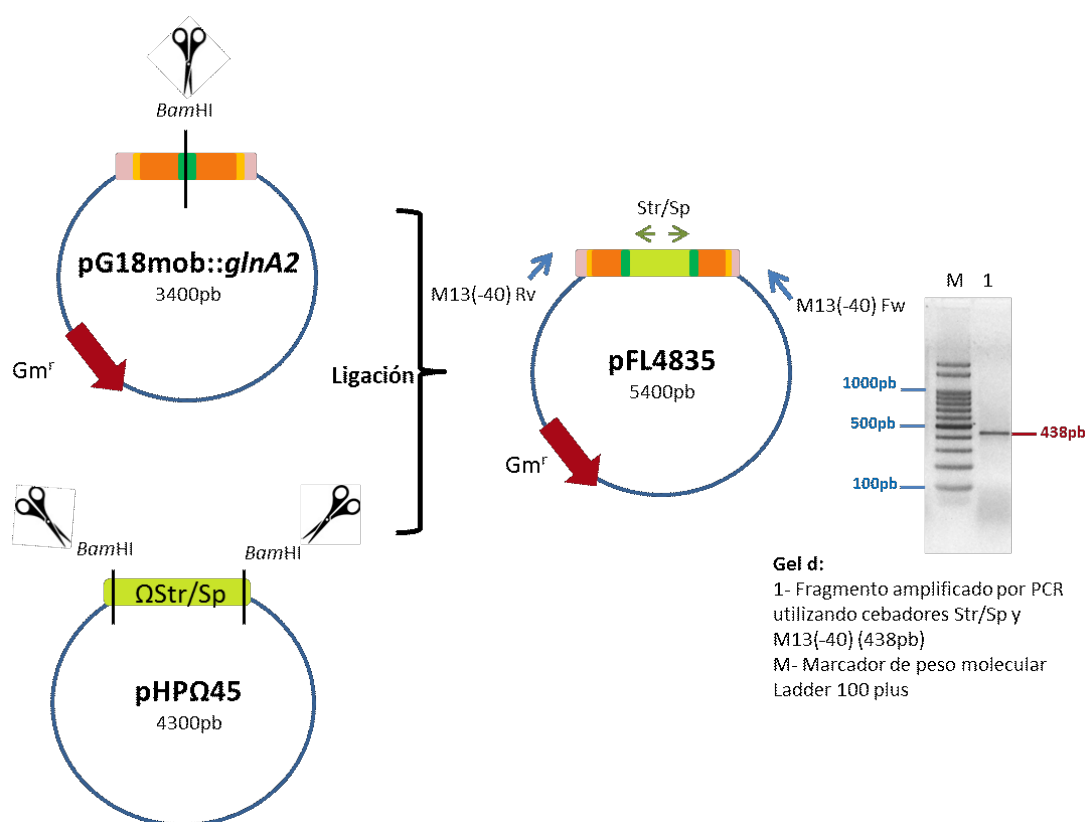


Figura IV.12 Continuación Esquema de la estrategia de clonado para la construcción del vector pFL4835 empleado para realizar la delección de *glnA2* (blr4835) en *B. diazoefficiens* USDA 110 y en la cepa mutante $\Delta glnA1$. A los lados de los geles se indican los pesos moleculares de los fragmentos de interés (bordo) y del marcador de peso molecular (celestes).

Una vez obtenido el vector pFL4835 se introdujo en la cepa *E. coli* S17-1 por transformación y luego se movilizó a *B. diazoefficiens* USDA 110 mediante una conjugación biparental. La selección de transconjugantes se llevó a cabo en medio YEM suplementado con Str y Sp. Aquellas colonias resultantes de la conjugación resistentes

a Str y Sp se repicaron en cajas réplicas de YEM-Str y YEM-Gm. Aquellos clones Str^r/Gm^s podrían ser el resultado de una doble recombinación homóloga donde se haya deletado el gen *glnA2* y en su lugar, se haya introducido en el genoma el omegón Str/Sp. La verificación de la obtención de la cepa mutante $\Delta glnA2$ se llevó a cabo sobre estos clones Str^r/Gm^s mediante PCR utilizando la combinación de cebadores externos a los sitios de recombinación y el cebador Str/Sp (Cheq_glnA2_Fw/Str/Sp y Cheq_glnA2_Rv/ Str/Sp – secuencias detalladas en **Tabla II.3.1**) (**Figura IV.13 - gel a**). Finalmente, se corroboró la mutación por secuenciación y la cepa obtenida se denominó $\Delta glnA2$.

Para la construcción del doble mutante $\Delta glnA1\Delta glnA2$ se utilizó la cepa de *E. coli* S17-1 que contiene el plásmido pFL4835 y se llevó a cabo una conjugación biparental con la cepa mutante $\Delta glnA1$. El procedimiento para la obtención y chequeo de la cepa mutante doble se realizó de la misma manera que se describió previamente para obtener la cepa mutante $\Delta glnA2$ (**Figura IV.13- gel b**).

Por último, para obtener la cepa mutante en *glnA3* (bll1069) se utilizó también la misma estrategia de doble recombinación homóloga descrita para el mutante *glnA2* (Sukdeo y Charles, 2003) que se describe en el **Capítulo II.3.12**. La **Figura IV.14** muestra el esquema general de clonado utilizado. Para la PCR1 se utilizaron los cebadores glnA3 5'Fw/ glnA3 5'Rv obteniéndose un fragmento de 427pb y para la PCR2 se utilizó el par de cebadores glnA3 3'Fw/ glnA3 3'Rv para amplificar 472pb río abajo del gen *glnA3* (**Figura IV.14, gel a**). Las secuencias de los cebadores utilizados se encuentran detalladas en la **Tabla II.3.1**. La PCR3 se llevó a cabo con los cebadores glnA3 5'Fw/ glnA3 3'Rv y se obtuvo un producto final de 899pb que contiene la región río arriba del gen a deletar unido por la secuencia sintética a la región río abajo del mismo (**Figura IV.14, gel b**).

La amplificación de este fragmento se llevó a cabo utilizando la enzima PFU ADN polimerasa para obtener un producto con extremos romo. Finalmente, el fragmento se clonó en el vector pK18mobSacB, que previamente había sido digerido con la enzima de restricción *Sma*I. La obtención de la construcción deseada se chequeó por secuenciación. El plásmido resultante se denominó pFL1069.

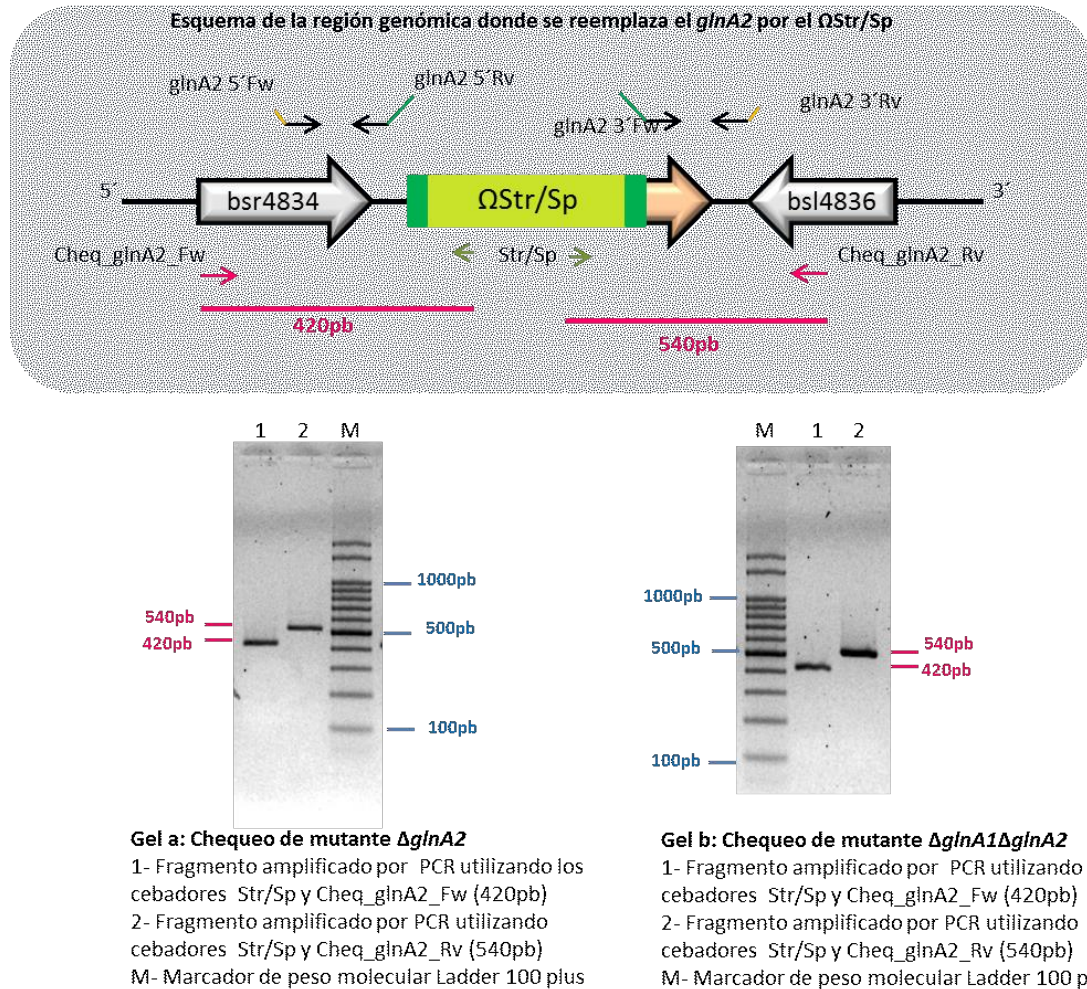


Figura IV.13 Mapa esquemático del gen *glnA2* (*blr4835*) y confirmación mediante PCR de la obtención del mutante Δ *glnA2* y del doble mutante Δ *glnA1* Δ *glnA2*. En la parte superior de la imagen se muestra un esquema de la región genómica donde se inserta el Ω Str/Sp y los cebadores Cheq_glnA2_Fw, Cheq_glnA2_Rv y Str/Sp. En la parte inferior se observa la amplificación mediante PCR con las combinaciones de cebadores Cheq_glnA2_Fw/ Str/Sp y Cheq_glnA2_Rv/ Str/Sp que confirma la obtención de la cepa mutante Δ *glnA2* (**gel a**) y la obtención de la doble mutante Δ *glnA1* Δ *glnA2* (**gel b**). A los lados del gel se indican los pesos moleculares de los fragmentos de interés (rosa) y del marcador de peso molecular (celeste).

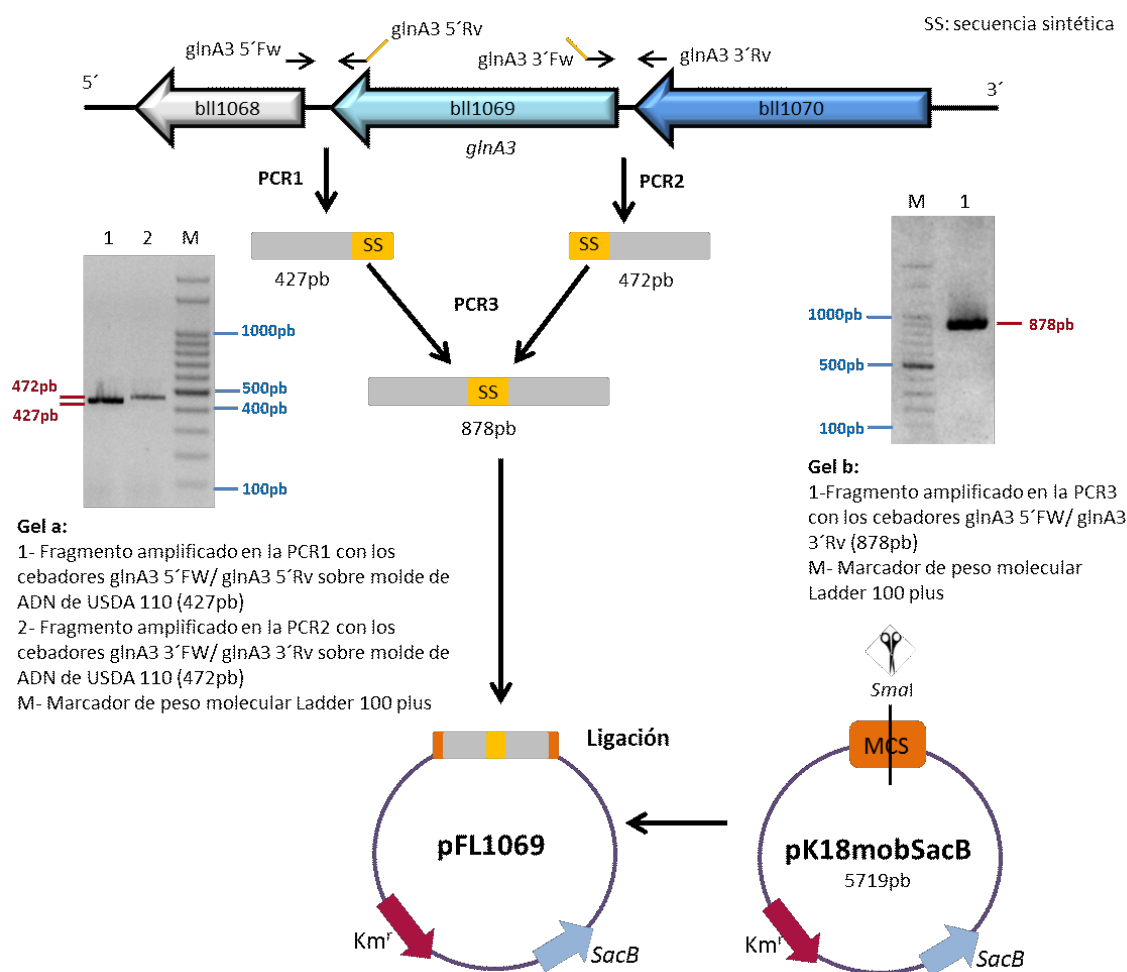


Figura IV.14 Esquema de la estrategia de clonado utilizada para la construcción del vector pFL1069 empleado para realizar la delección de *glnA3* (bll1069) en *B. diazoefficiens* USDA 110. A los lados del gel se indican los pesos moleculares de los fragmentos de interés (bordó) y del marcador de peso molecular (celeste).

La construcción pFL1069 se introdujo en una cepa *E. coli* S17-1 por transformación y se movilizó a *B. diazoefficiens* USDA 110 mediante una conjugación biparental como se describe en el **Capítulo II**. La selección de transconjugantes se llevó a cabo como se describió previamente en el **Capítulo II.3.12**. Finalmente, la delección de gen *glnA3* se corroboró mediante PCR con cebadores externos a los sitios de recombinación Check_glnA3_Fw/ Check_glnA3_Rv (ver secuencia en **Tabla II.3.1**) (**Figura IV.15**). La cepa obtenida se denominó $\Delta glnA3$.

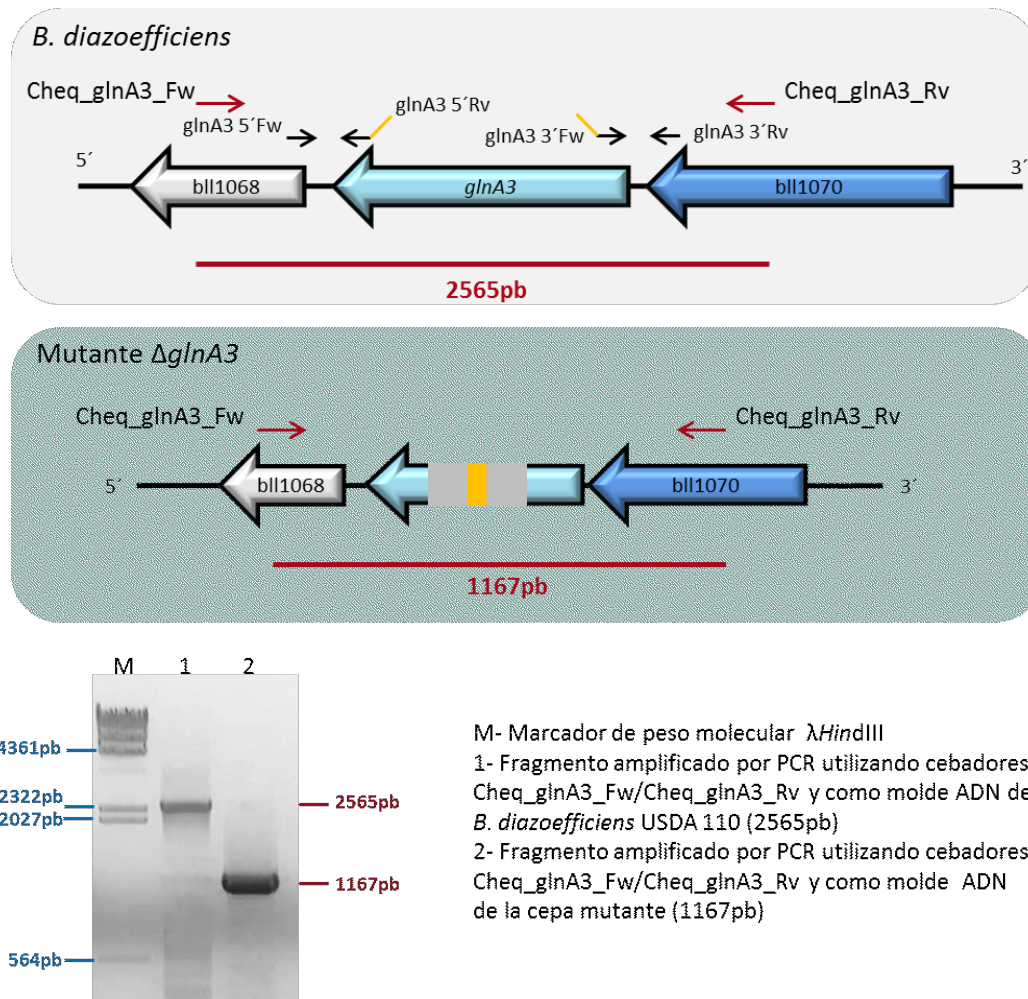


Figura IV.15 Mapa esquemático del gen *glnA3* (bll1069) y confirmación mediante PCR de la obtención del mutante Δ *glnA3*. En la parte superior de la imagen se observa un esquema del sitio de hibridación de los cebadores Cheq_glnA3_Fw/ Cheq_glnA3_Rv en la cepa salvaje *B. diazoefficiens* USDA 110 (recuadro gris) y en la cepa mutante en *glnA3* (recuadro celeste). En la parte inferior se observa la amplificación que confirma la obtención de la cepa mutante mediante PCR con los cebadores mencionados anteriormente. También se incluye como control la amplificación obtenida para la cepa salvaje. A los lados del gel se indican los pesos moleculares de los fragmentos de interés (bordó) y del marcador de peso molecular (celeste).

De manera simultánea a la obtención de estas cepas mutantes, llevamos a cabo varios ensayos de conjugación para obtener un doble mutante en los genes *glnA1* y *glnII* utilizando como cepa receptora la mutante $\Delta glnA1$ y como donora la cepa *E. coli* S17-1 (pFL4169). Carlson y col. (1987) demostraron que para lograr obtener el doble mutante en los genes *glnA1* y *glnII* en *B. diazoefficiens* USDA 110 era necesario suplementar el medio utilizado durante todos los pasos con 10 mM de glutamina. Teniendo en cuenta esta aclaración, utilizamos varias estrategias para favorecer la delección del gen *glnII* en la cepa $\Delta glnA1$, como por ejemplo, suplementar el medio YEM con distintas concentraciones de glutamina o con mayores cantidades de extracto de levadura. Sin embargo, a pesar de los múltiples intentos no fue posible obtener una cepa doble mutante $\Delta glnA1\Delta glnII$ lo que nos sugiere que estos dos genes son fundamentales para el metabolismo de N de nuestra bacteria de estudio.

IV.3 Resumen y discusión

B. diazoefficiens, como muchas otras bacterias del orden Rhizobiales, posee dos isoformas de las enzimas GS: GSI y GSII. A lo largo del presente Capítulo describimos la presencia de varias copias del gen *glnA* en el genoma de *B. diazoefficiens* USDA 110 (Kaneko *et al.*, 2002), las que fueron nombradas como *glnA1* (ORF blr4949), *glnA2* (ORF blr4835), *glnA3* (ORF blr1069) y *glnA4* (ORF blr2084). La copia codificada por el ORF blr4949 se denominó *glnA1* debido a homología de secuencia con *glnA* de *E. coli* (Carlson *et al.*, 1985). Las restantes copias de GSI fueron denominadas al azar. Por otra parte, la búsqueda en bases de datos del gen *glnII* arrojó un único resultado que corresponde al ORF blr4169 (**Figura IV.1**).

A partir del análisis de sitios a través del servidor ScanProsite pudimos determinar que sólo las secuencias de GlnA1, GlnA2 y GSII presentaban las regiones características para una enzima glutamino sintetasa (**Figura IV.2**). Por otra parte, mediante un análisis de dominios con el programa Pfam, pudimos detectar que estas mismas copias GlnA1, GlnA2 y GSII poseen dos dominios definidos, un N terminal de plegamiento y un C terminal catalítico, mientras que las copias GlnA3 y GlnA4 solamente presentan el dominio catalítico (**Figura IV.3**).

Además, al comparar las secuencias proteicas utilizando el servidor Blastp pudimos detectar que el porcentaje de identidad entre GlnA1 y GlnA2 es de un 53%, mientras que GlnA1 con GlnA3 y con GlnA4 tan sólo tienen un 29% y un 26% de identidad respectivamente (**Figura IV.4**). Estos resultados son coincidentes con los modelados obtenidos mediante el servidor Phyre2 donde encontramos una mayor similitud entre la estructura predicha para las copias GlnA1 y GlnA2 (**Figura IV.5**).

Finalmente, el análisis del árbol filogenético de las glutamino sintetetasas de *B. diazoefficiens* USDA 110 determinó que las copias *glnA1* y *glnA2* se encuentran ubicadas dentro de un mismo *cluster*, mientras que las copias *glnA3* y *glnA4* se encuentran en un *cluster* diferente y distante de las copias *glnA1* y *glnA2* (**Figura IV.6**).

Los resultados obtenidos mediante el análisis bioinformático en su conjunto nos conducen a pensar que GlnA1 y GlnA2 son parte de la misma familia de la isoforma GSI, mientras que las copias GlnA3 y GlnA4 podrían estar formando parte de una familia de glutamino sintetetasas diferente. De todas maneras, a pesar de tener tan poca identidad en relación a GlnA1, y de no poseer ni las regiones ni los dominios característicos, estas 2 últimas copias podrían ser funcionales como ocurre en aquellos organismos con GSIII. Para estudiar en profundidad el posible rol de estas enzimas obtuvimos, mediante diversas estrategias, cepas mutantes en las copias *glnA1*, *glnA2*, *glnA3* y un doble mutante *glnA1glnA2*. Considerando los resultados obtenidos a partir del análisis *in silico* de las secuencias de estas proteínas y de la filogenia, decidimos no estudiar la copia *glnA4*, ya que este gen no pareciera codificar una enzima GS. Así, solamente obtuvimos cepas mutantes en las demás copias mencionadas. En este punto es importante resaltar que, cuando comenzamos con el presente trabajo de Tesis, las bases de datos arrojaban, como hemos mencionado anteriormente, la presencia de las 4 copias de *glnA*. Sin embargo, con actualizaciones más recientes de estas mismas bases, ya no es posible obtener como resultado la presencia de 4 copias de *glnA*, sino que sólo obtenemos las copias *glnA1* y *glnA2* (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed). Ni *glnA3* ni *glnA4* aparecen ahora anotadas como posibles glutamino sintetetasas.

Adicionalmente, en el presente capítulo describimos la estrategia utilizada para obtener el mutante en el gen *glnII*, que codifica para la isoforma GSII, que habíamos comenzado durante mi Trabajo Final de Licenciatura (Lamelza, 2013). Por último, también realizamos varios intentos para obtener para obtener el doble mutante *glnA1glnII*, pero

lamentablemente no obtuvimos resultados positivos. Probablemente, considerando la importancia que tienen estos genes en la asimilación de N de la bacteria, la delección de ambos resulte letal.

La caracterización fenotípica de los mutantes obtenidos en las distintas GS se desarrollará en el **Capítulo V**.

Capítulo V

**Caracterización funcional de las
enzimas glutamino sintetetasas
de *B. diazoefficiens* USDA 110**



Introducción

Como mencionamos en los Capítulos anteriores, las GS son enzimas clave dentro del metabolismo de N de los rizobios ya que son las responsables de llevar a cabo la asimilación de NH_4^+ durante su crecimiento en vida libre. La activación de GSI y la expresión de GSII, dependen de las cantidades de α -cetoglutarato y glutamina intracelulares, es decir, de la relación C/N intracelular (Darrow *et al.*, 1981; Martin *et al.*, 1988). Cuando esta relación es alta, debido a la escasez de N en el medio de cultivo, la isoforma GSI es deactivada (activada) y la expresión del *glnII* se induce (Darrow, 1980; Fuchs *et al.*, 1980; Carlson *et al.*, 1987; Martin *et al.*, 1988), con el fin de incrementar la asimilación de NH_4^+ y restituir los niveles intracelulares de glutamina.

En el **Capítulo IV** describimos las diversas estrategias de biología molecular utilizadas que nos permitieron obtener las cepas mutantes de *B. diazoefficiens* USDA 110 en las copias de los genes que codifican para la isoforma GSI: ΔglnA1 , ΔglnA2 , ΔglnA3 y la doble mutante $\Delta\text{glnA1}\Delta\text{glnA2}$; al igual que el mutante en la isoforma GSII: ΔglnII . El siguiente paso consiste en intentar dilucidar si todas estas enzimas GS están involucradas en la asimilación de NH_4^+ en *B. diazoefficiens* y, si es así, cuál es el rol que cumple cada una de ellas.

De esta manera, a lo largo del presente capítulo nos propusimos evaluar la respuesta de las cepas mutantes obtenidas en condiciones de escasez y de exceso de N. Aquellos mutantes que muestren un fenotipo diferencial nos brindarán un indicio concreto del rol de estas enzimas en la asimilación de N. La caracterización fenotípica de las cepas mutantes se llevará a cabo determinando las cinéticas de crecimiento, la medida de actividad enzimática GS y cuantificaremos los niveles relativos de transcritos de las diversas copias que codifican para las GS. Estos ensayos se realizarán en las variantes del medio Evans que han sido formulados en el **Capítulo III**, para obtener relaciones C/N que nos permitan analizar condiciones de exceso y de limitación de N.

V.1 Rol de las enzimas GS en el crecimiento bacteriano

Para comenzar la caracterización de las diferentes copias de las GS de *B. diazoefficiens*, evaluamos el fenotipo de las cepas mutantes ΔglnA1 , ΔglnA2 , ΔglnA3 , ΔglnII y del doble mutante $\Delta\text{glnA1}\Delta\text{glnA2}$ mediante la determinación de sus cinéticas de crecimiento en

cultivos *batch*. Utilizamos el medio Evans NG (conteniendo como fuentes nitrogenadas NH_4Cl y glutamato y con una relación C/N baja=6,8) para evaluar una condición con exceso de N, y los medios Evans Glutamato y Evans NH_4^+ (ambos con relación C/N alta=70) para evaluar condiciones con escasez de N utilizando como fuente nitrogenada únicamente glutamato de sodio o NH_4Cl , respectivamente. Para los tres medios, la fuente de C utilizada fue manitol, y las formulaciones detalladas de cada uno los medios se muestran en el **Capítulo II.2.2**. Las cepas mutantes y la parental se cultivaron en cada uno de los medios anteriormente mencionados a 28°C y a 180 rpm durante 11 días, y diariamente se determinó su biomasa total por la medida de $\text{DO}_{500\text{nm}}$ y se estimó el número de células viables por recuento en placa de las $\text{UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$ (**Figura V.1**).

Los resultados obtenidos demostraron que ninguna de las cepas mutantes evaluadas se ve afectada ni en su velocidad de crecimiento ni en la biomasa final alcanzada en relación al comportamiento de la cepa parental cuando se cultivaron en un medio con exceso de N como es el Evans NG (**Figura V.1 – Paneles A y B**).

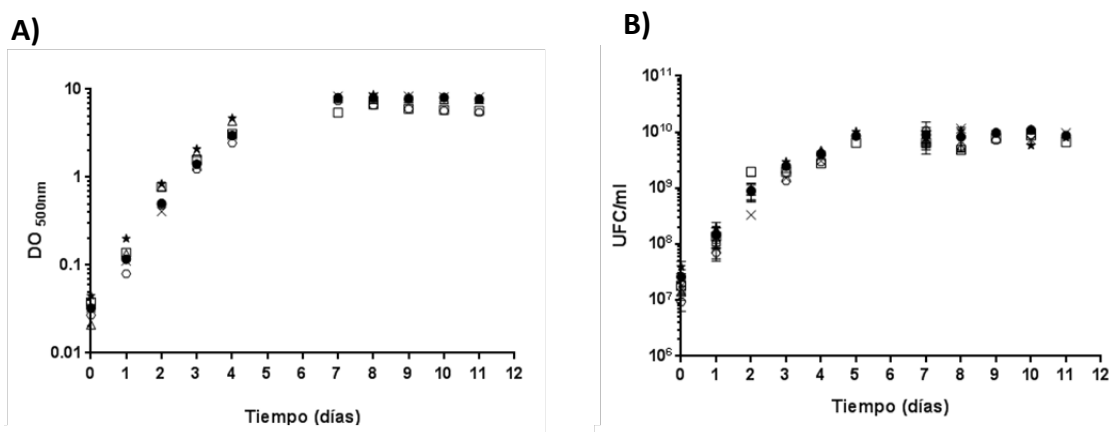


Figura V.1 Cinéticas de crecimiento de las cepas mutantes (\circ) ΔglnA1 , (Δ) ΔglnA2 , (\square) $\Delta\text{glnA1}\Delta\text{glnA2}$, (\times) ΔglnA3 y (\star) ΔglnI1 en comparación con la cepa parental *B. diazoefficiens* USDA 110 (\bullet) en el medio Evans NG. La cinética se llevó a cabo a 28°C con agitación a 180 rpm. En el **Panel A** se muestra la biomasa total estimada por la medida de la densidad óptica a 500nm ($\text{DO}_{500\text{nm}}$); en el **Panel B** se muestra la estimación de células viables por recuento en placa de las unidades formadoras de colonias por ml de cultivo ($\text{UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$). Los datos corresponden a un ensayo representativo de dos réplicas biológicas independientes con igual tendencia. La desviación estándar en los gráficos de $\text{UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$ se obtuvo a partir de al menos 10 réplicas técnicas de un ensayo biológico. El eje Y se presenta en escala logarítmica.

Considerando la importante función que estas enzimas cumplen en el metabolismo de N, es posible que el efecto de la mutación de las diferentes copias, se observe en una condición de estrés de la fuente nitrogenada. Para ello, evaluamos el crecimiento de las cepas mutantes en condiciones limitantes de N como Evans Glutamato (**Figura V.2 - Paneles A y B**) y Evans NH_4^+ (**Figura V.2 - Paneles C y D**).

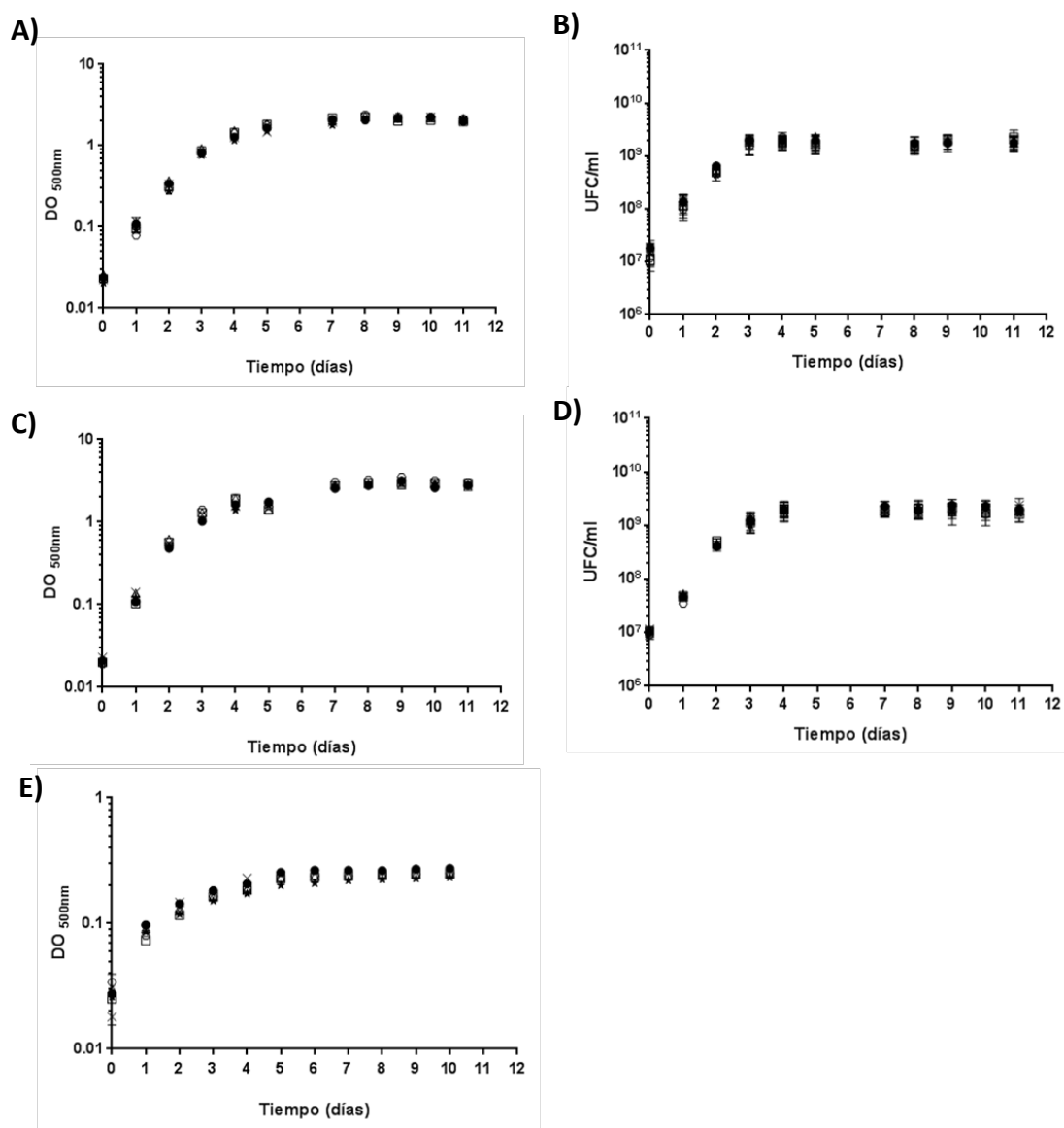


Figura V.2 Cinéticas de crecimiento de las cepas mutantes (○) $\Delta glnA1$, (△) $\Delta glnA2$, (□) $\Delta glnA1\Delta glnA2$ (x) $\Delta glnA3$ y (★) $\Delta glnII$ en comparación con la cepa parental *B. diazoefficiens* USDA 110 (●) cultivadas en los medios Evans Glutamato (**A y B**), Evans NH_4^+ (**C y D**) y Evans Bajo N (**E**). Las cinéticas se llevaron a cabo a 28°C con agitación a 180 rpm. En los paneles **A, C y E** se muestra la biomasa total estimada por densidad óptica a 500 nm ($\text{DO}_{500\text{nm}}$) y en los paneles **B y D** la estimación de células viables por recuento en placa de las unidades formadoras de colonias por ml de cultivo ($\text{UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$). Los datos corresponden a un ensayo representativo de dos réplicas biológicas independientes con igual tendencia. La desviación estándar en los gráficos de $\text{UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$ se obtuvo a partir de al menos 10 réplicas técnicas de un ensayo biológico.

Llamativamente, en estas condiciones tampoco se observaron diferencias en las curvas de crecimiento de los mutantes en relación al crecimiento de la cepa salvaje. En base a estos resultados nos preguntamos entonces si la ausencia de alguna de las GSs sólo se pone de manifiesto en condiciones drásticas de crecimiento, por lo que evaluamos, a modo de prueba, las cinéticas de crecimiento de las cepas mutantes en el medio de Evans Bajo N (limitado drásticamente en NH_4Cl , con una relación C/N=3.333). Nuevamente pudimos observar que no existen diferencias significativas en el comportamiento de ninguna de las cepas mutantes en relación a la cepa salvaje, ni en velocidad de crecimiento ni en biomasa final alcanzada (**Figura V.2 - Panel E**).

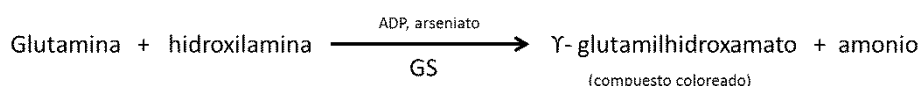
Los resultados obtenidos hasta aquí, muestran que ninguna de las copias o isoformas de GS es fundamental por sí sola para el crecimiento de la bacteria en ninguno de los medios de cultivos evaluados. En particular, la capacidad de la cepa $\Delta glnII$ de crecer igual que la cepa salvaje en medios con escasez de N, como son el Evans NH_4^+ y el Evans Glutamato, nos resultó muy llamativa ya que, como ha sido ampliamente reportado, la expresión del gen *glnII* se induce ante una limitación de N (Carlson *et al.*, 1987). Sin embargo, nuestros datos sugieren que dicha isoforma no es esencial para el crecimiento de la bacteria en limitación de dicho nutriente, probablemente debido a la existencia de las múltiples copias de GSI que probablemente se encuentren remplazándola en esta condición.

V.2 Análisis de las glutamino sintetasas en medios limitados en N

La respuesta al estrés por N (NSR) involucra cambios en la fisiología bacteriana que tienen como objetivo final aumentar la asimilación de N en condiciones en las que dicho nutriente se encuentra limitado. Esta respuesta consiste en la activación de una cascada de proteínas que finalmente culmina con la activación de las proteínas GSI y la inducción de la transcripción de *glnII*. Por lo tanto, es posible que el crecimiento bacteriano no se vea afectado ante la falta de alguna de estas enzimas por la activación de otra GS que suplante la función de la proteína faltante. Con el objetivo de confirmar esta hipótesis, procedimos a medir la actividad enzimática de estas proteínas para observar si existen diferencias entre los distintos mutantes.

V.2.1 Evaluación de la actividad enzimática GS

La actividad de la enzima GS puede determinarse mediante dos métodos. Uno de ellos, el método γ -glutamyltransferasa (Bender *et al.*, 1976), es un método colorimétrico ampliamente utilizado, que permite detectar, mediante una reacción indirecta, la actividad específica total de la enzima:



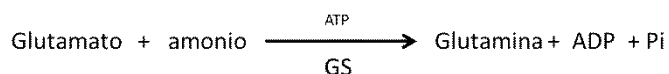
La enzima GS puede utilizar como cofactores tanto Mg^{+2} o Mn^{+2} . Así, se ha observado que cuando a la mezcla de reacción se le adiciona Mg^{+2} , sólo las subunidades no adeniladas de GSI son activas, mientras que en presencia de Mn^{+2} es posible detectar la actividad de GSII como de GSI en sus formas adenilada y deadenilada o sea la actividad total de la enzima (Shapiro y Stadtman 1970; Darrow y Knotts, 1977; Carlson *et al.*, 1985).

A pesar de que este método es el más utilizado y aceptado, los resultados que obtuvimos al adicionar Mg^{+2} a la mezcla de reacción, no resultaron reproducibles, por lo que no se mostrarán en este trabajo.

Otra particularidad de estas enzimas, que ya mencionamos en el **Capítulo I**, es la diferencia de sensibilidad que poseen frente al calor, siendo GSI estable a 50 °C mientras que GSII no lo es (Darrow y Knotts, 1977; Darrow, 1980; Carlson *et al.*, 1985). Teniendo en cuenta esta característica es posible determinar la actividad total de GSI, mediante el calentamiento de la muestra durante una hora a 50 °C. Sin embargo, nuevamente en nuestros ensayos nunca pudimos detectar actividad enzimática cuando calentamos la muestra a esa temperatura. Más aún, realizamos distintas pruebas cambiando la temperatura y el tiempo de calentamiento, y sin embargo nunca obtuvimos valores de actividad.

Por lo tanto, con el método γ -glutamyltransferasa solamente fue posible obtener medidas de la actividad enzimática total de GS, activa e inactiva.

El segundo método de detección de la actividad enzimática es el método biosintético (Shapiro y Stadtman, 1970 con algunas modificaciones), y determina la actividad GS a partir de la reacción directa de asimilación de NH_4^+ :



En este caso la mezcla de reacción ya contiene Mg^{2+} , por lo que las medidas obtenidas representan la cantidad total de GS activa.

En primer lugar, decidimos analizar la actividad GS de las cepas mutantes mediante el método γ -glutamyltransferasa cuando éstas se cultivan en medios con limitación de N. Esta determinación se llevó a cabo como se describe en el **Capítulo II.5.1** a partir de cultivos de 5 días en los medios Evans NH_4^+ y Evans Glutamato de las cepas mutantes ΔglnA1 , ΔglnA2 , ΔglnA3 , ΔglnII y $\Delta\text{glnA1}\Delta\text{glnA2}$ y de la cepa salvaje *B. diazoefficiens* USDA 110.

Sorprendentemente, pudimos observar que, con el método γ -glutamyltransferasa, no es posible detectar actividad enzimática GS en la cepa mutante ΔglnA1 (**Figura V.3**).

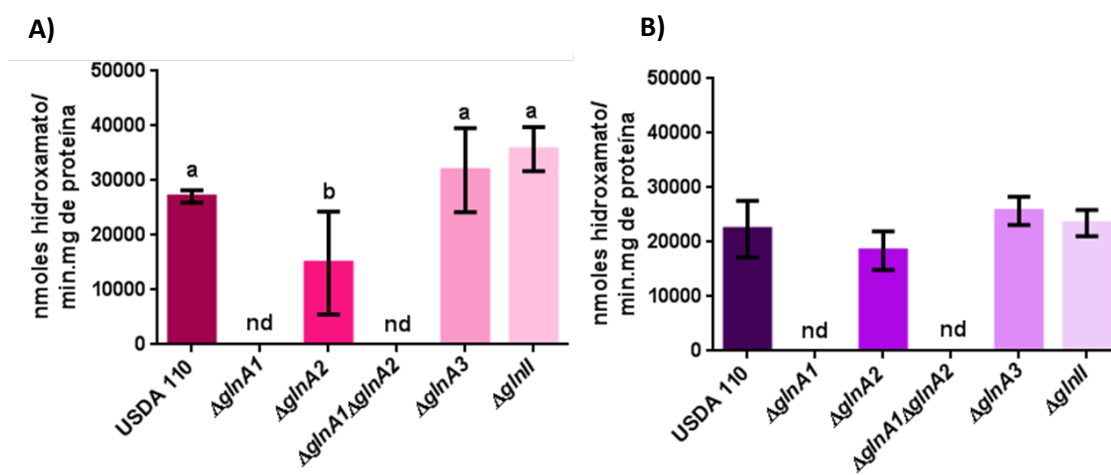


Figura V.3 Medida de la actividad enzimática GS mediante el método γ -glutamyltransferasa de las cepas ΔglnA1 , ΔglnA2 , $\Delta\text{glnA1}\Delta\text{glnA2}$, ΔglnA3 y ΔglnII en comparación con la cepa salvaje *B. diazoefficiens* USDA 110 cultivadas en medio Evans NH_4^+ (A) y Evans Glutamato (B). La medida de la actividad GS fue determinada a partir de cultivos de 5 días de crecimiento por la reacción γ -glutamyl transferasa. Los datos se expresan como nmoles de hidroxamato formado. $\text{min}^{-1}.\text{mg}$ de proteínas totales⁻¹. Las columnas representan el promedio y las barras la desviación estándar de 3 ensayos biológicos independientes realizados con 3 réplicas técnicas cada uno. (nd) indica que no fue posible detectar actividad enzimática. Las letras iguales o la ausencia de letras indican que no hay diferencias significativas con $p < 0,01$ en un análisis de varianza utilizando el test de Tukey.

Este resultado nos resultó muy interesante debido a que, según se describe en bibliografía, este método permite medir la actividad de las isoformas GSI y GSII (Darrow, 1980). Sin embargo, como mostraremos a lo largo de este capítulo, para aquellas cepas que tienen delecionada la copia *glnA1* (blr4949), es decir tanto para $\Delta glnA1$ como para $\Delta glnA1\Delta glnA2$, no fue posible detectar la actividad enzimática en ninguno de los medios evaluados. Es necesario señalar que la actividad GSII fue medida anteriormente por investigadores del grupo de Trabajo, en otras condiciones de cultivo y de trabajo experimental (López-García y col., 2001). Por ello, a lo largo de los dos primeros años de este trabajo de Tesis Doctoral, realizamos múltiples intentos por encontrar una condición en la cual sea posible determinar la actividad enzimática GSII de estas cepas variando PH, temperaturas, soluciones, tiempos de reacción, reactivos, etc. Sin embargo, y lamentablemente, no fue posible encontrar una condición óptima para detectar actividad GS en las cepas $\Delta glnA1$ o $\Delta glnA1\Delta glnA2$ utilizando el método γ -glutamyltransferasa. Esto nos indica que, al menos en las condiciones utilizadas para llevar a cabo este ensayo, éste método sólo nos permite determinar la actividad enzimática de la isoforma GSI, y en particular de la copia *GlnA1*.

Teniendo presente esta consideración, al analizar la actividad GS mediante el método γ -glutamyltransferasa observamos que, en el medio Evans NH_4^+ , la mutante $\Delta glnA2$ presentó una leve (pero estadísticamente significativa con $p < 0,01$) disminución de la actividad con respecto a la cepa salvaje (**Figura V.3- Panel A**). Sin embargo, en presencia de glutamato como única fuente nitrogenada el fenotipo de la mutante $\Delta glnA2$ fue similar al de la cepa salvaje (**Figura V.3- Panel B**). Esto nos sugiere que *GlnA2* podría estar interviniendo de alguna manera, aún no descrita, para que *GlnA1* lleve a cabo su actividad sólo en presencia de NH_4^+ .

Como ya hemos mencionado en capítulos anteriores, el glutamato y el NH_4^+ se metabolizan de maneras diferentes: el NH_4^+ una vez que ingresa al interior celular se asimila mediante la acción de la GS para dar glutamina; el glutamato, en cambio, en *B. diazoefficiens* parecería ser metabolizado inicialmente por una NAD-GDH que cataliza la conversión de dicho compuesto a una molécula de α -cetoglutarato y una de NH_4^+ que serán luego utilizados según las necesidades metabólicas de la bacteria. alguna de estas diferencias metabólicas probablemente sea la responsable de activar o inactivar la

función de GlnA2 frente a una fuente de N y no frente a la otra. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo no son suficientes para esclarecer esta regulación. Por otra parte, al analizar la actividad de las cepas $\Delta glnA3$ y $\Delta glnII$ observamos que no tienen diferencias significativas en relación a la cepa salvaje cuando se cultivan en Evans Glutamato (**Figura V.3 - Panel B**), indicando que ni la falta de la copia GlnA3 ni la falta de GSII afectan la actividad GlnA1 en dicho medio.

En el caso de la actividad GS medida en la cepa $\Delta glnII$ cultivada en Evans NH_4^+ , los resultados muestran un leve aumento de la actividad GlnA1 (**Figura V.3 – Panel A**). Sin embargo, estos datos no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la cepa parental con un análisis de varianza con $p < 0,01$ ni $p < 0,05$. Este fenotipo observado en la mutante $\Delta glnII$ nos lleva a pensar que la ausencia de GSII podría estar produciendo un aumento en la actividad de GlnA1.

En concordancia con estos resultados, cuando analizamos mediante el mismo método el fenotipo de la cepa $\Delta glnII$ en un medio con extrema escasez de NH_4^+ , como es el medio Evans Bajo N, efectivamente pudimos confirmar que el aumento de la actividad de GlnA1 se exagera y la diferencia se vuelve estadísticamente significativa (**Figura V.4**).

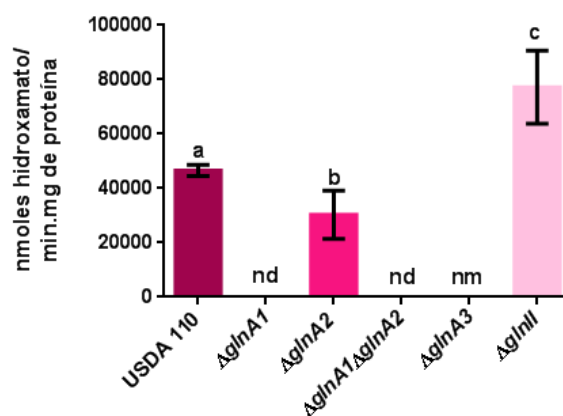


Figura V.4 Medida de la actividad enzimática GS mediante el método γ -glutamyltransferasa de las cepas $\Delta glnA1$, $\Delta glnA2$, $\Delta glnA1\Delta glnA2$ y $\Delta glnII$ en comparación con la cepa salvaje *B. diazoefficiens* USDA 110 cultivadas en medio Evans Bajo N. La medida de la actividad GS fue determinada a partir de cultivos de 5 días de crecimiento por la reacción γ -glutamyl transferasa. Los datos se expresan como nmoles de hidroxamato formado. $\text{min}^{-1}.\text{mg}$ de proteínas totales $^{-1}$. Las columnas representan el promedio y las barras la desviación estándar de 3 ensayos biológicos independientes realizados con 3 réplicas técnicas cada uno. (nd) indica que no fue posible detectar actividad enzimática. (nm) indica que no fue medida la actividad enzimática en dicha cepa. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas con $p < 0,01$ en un análisis de varianza utilizando el test de Tukey.

Esto podría indicar que la ausencia de GSII en un medio muy limitado en NH_4^+ , podría estar siendo reemplazada por GlnA1. Por su parte, la mutante ΔglnA2 presentó menor actividad que la cepa salvaje, sugiriendo nuevamente la participación de esta copia en presencia de NH_4^+ .

Debido a la imposibilidad encontrada de medir la actividad GlnA1 con el método γ -glutamilttransferasa, decidimos evaluar la actividad enzimática mediante el método biosintético. Esta determinación se llevó a cabo a partir de las mismas muestras de bacterias cultivadas en Evans NH_4^+ y Evans Glutamato utilizadas para el ensayo γ -glutamilttransferasa descrito anteriormente.

En la **Figura V.5** se puede observar, en primer lugar, que a diferencia de lo ocurrido con el ensayo γ -glutamilttransferasa, en todas las cepas mutantes fue posible detectar actividad enzimática. Además, al analizar las cepas de manera individual encontramos que, tanto en el medio Evans NH_4^+ (**Figura V.5 - Panel A**) como en el medio Evans Glutamato (**Figura V.5 - Panel B**), ΔglnA1 y $\Delta\text{glnA1}\Delta\text{glnA2}$ presentaron una menor actividad GS en relación a la obtenida para la cepa parental.

En el caso de las cepas cultivadas en Evans Glutamato la disminución en la cepa doble mutante pareciera ser exclusivamente debido a la ausencia de GlnA1 ya que al evaluar la cepa ΔglnA2 no encontramos diferencias significativas con respecto a la cepa salvaje (**Figura V.5 - Panel B**). Por el contrario, en presencia de NH_4^+ , ΔglnA2 también se ve afectada presentando menor actividad GS total (**Figura V.5 - Panel A**). Estos resultados son coincidentes con lo observado a través del método γ -glutamilttransferasa (**Figura V.3**), por lo que podemos hipotetizar que GlnA2 se encuentra regulando de alguna manera en la actividad de GlnA1, pero sólo en medios que contienen NH_4^+ . Adicionalmente, estos resultados indican que las copias GlnA1 y GlnA2 de la isoforma GSI son relevantes cuando las condiciones de N son limitantes, a pesar de que los datos bibliográficos hacen hincapié en el importante rol de GSII en estas condiciones (Darrow, 1980; Carlson *et al.*, 1987; Martin *et al.*, 1988).

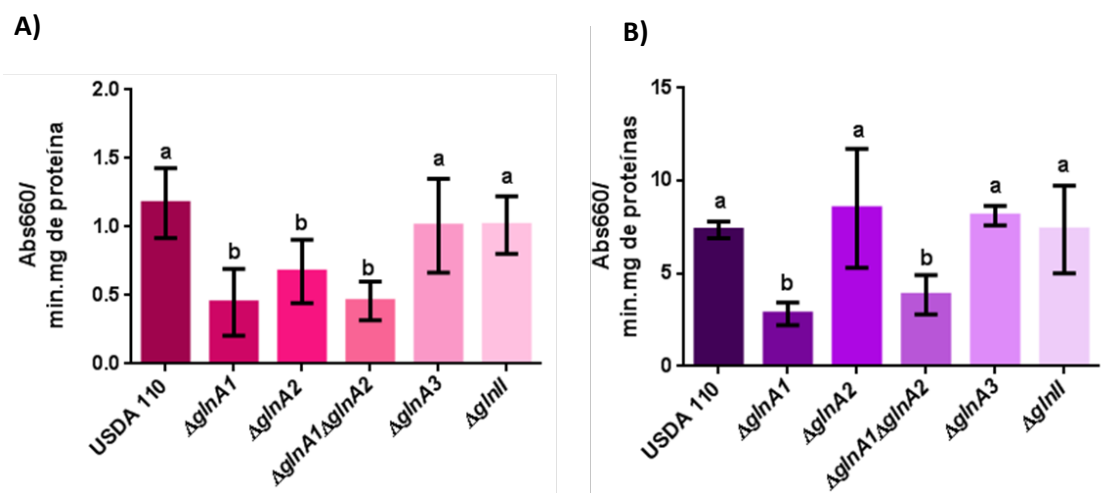


Figura V.5 Medida de la actividad enzimática GS mediante el método biosintético de las cepas *ΔglnA1*, *ΔglnA2*, *ΔglnA1ΔglnA2*, *ΔglnA3*, y *ΔglnII* en comparación con la cepa salvaje *B. diazoefficiens* USDA 110 cultivadas en medio Evans NH_4^+ (A) y Evans Glutamato (B). La medida de la actividad GS fue determinada a partir de cultivos de 5 días de crecimiento por el método biosintético. Los datos se expresan como $\text{DO}_{500\text{nm}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteínas totales}^{-1}$. Las columnas representan el promedio y las barras la desviación estándar de 3 ensayos biológicos independientes realizados con 3 réplicas técnicas cada uno. (nd) indica que no fue posible detectar actividad enzimática. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas con $p < 0,01$ en un análisis de varianza utilizando el test de Tukey.

Por otra parte, los datos obtenidos al evaluar la actividad de la cepa *ΔglnA1* en Evans NH_4^+ y en Evans Glutamato (**Figura V.5**), nos indican que la enzima que está activa en esas condiciones posee una menor actividad específica. Sin embargo, aún con esos valores de actividad, esta cepa mutante puede lograr un crecimiento semejante al de la cepa salvaje (**Figura V.2**).

Finalmente, al igual que en el ensayo γ -glutamyltransferasa, la delección de la copia *glnA3* y de *glnII* no afectan la actividad GS total de la bacteria en ninguno de los medios evaluados. Como ya discutimos anteriormente en este capítulo, hubiéramos esperado un descenso en la actividad GS para la cepa mutante *ΔglnII* dada la importancia de esta isoforma en condiciones limitantes de N. Sin embargo, estos resultados son coincidentes con las cinéticas de crecimiento donde tampoco apreciamos que la falta de GSII tenga consecuencias sobre el crecimiento de la bacteria cuando se enfrenta a condiciones adversas de limitación de N (**Figura V.2**). Podríamos hipotetizar entonces que, en este caso, la copia de GSI que se encuentre reemplazando la función de la isoforma GSII, posee una mayor actividad específica que en la cepa salvaje.

V.2.2 Análisis de expresión de las distintas copias de GS

En base a los datos obtenidos mediante los ensayos de actividad enzimática, nos preguntamos si las diversas glutamino sintetetasas que encontramos en *B. diazoefficiens* podrían estar reemplazándose unas a otras. Para intentar responder esta incógnita decidimos evaluar la expresión relativa de las distintas copias de GSI y de GSII en los mutantes $\Delta glnA1$ y $\Delta glnII$. En esta ocasión, seleccionamos evaluar inicialmente sólo estas dos cepas mutantes ya que, por un lado, GSII es la única copia de esta isoforma en *B. diazoefficiens* y por otro, GlnA1 es la copia de la isoforma GSI que se ha descrito inicialmente y que se encuentra más conservada tanto en su secuencia como de su entorno génico en relación el resto de las GSI procariontas. Además, se ha descrito previamente que cuando se delecionan simultáneamente *glnA1* y *glnII*, *B. diazoefficiens* sólo es capaz de crecer si se adiciona al medio de cultivo glutamina, indicando que estas copias serían fundamentales para el metabolismo de N (Carlson *et al.*, 1987).

Los análisis de expresión se llevaron a cabo cultivando las cepas $\Delta glnA1$ y $\Delta glnII$ y la cepa salvaje *B. diazoefficiens* USDA 110 durante 5 días en los medios Evans NH_4^+ y Evans Glutamato a 28 °C y a 180 rpm. A partir de estos cultivos, se extrajo el ARN total de los rizobios y se obtuvo el ADNc como se describe en el **Capítulo II**. Para la reacción de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), se diseñaron cebadores específicos para amplificar una región de los genes *glnA1* (blr4949), *glnA2* (blr4835), *glnA3* (bll1069), *glnA4* (blr2084) y *glnII* (blr4169). Los cebadores utilizados se muestran en la **Tabla II.3.2**. Este ensayo se llevó a cabo utilizando el método $\Delta\Delta Ct$ (**Capítulo II.3.8**), a partir del cual comparamos los niveles de transcritos de las distintas copias de GS y las normalizamos con los transcritos de la cepa salvaje, utilizando como control de ambas cepas un gen de expresión constitutiva. Los valores obtenidos se representan como el *fold change*, el cual indica cuántas veces aumenta o disminuye la expresión de un mismo transcrito en la cepa mutante comparado con la cepa salvaje. En este sentido, optamos por considerar como sobreexpresados aquellos genes cuyo *fold change* sea mayor o igual a 2 y como inhibidos aquellos con *fold change* menor o igual a -2.

La **Figura V.6** muestra los resultados de expresión obtenidos al cultivar las cepas en Evans NH_4^+ . Como puede observarse en la cepa $\Delta glnA1$ no hay modificaciones en los

niveles relativos de transcripto de *glnA2*, y llamativamente pareciera haber una leve disminución de los transcritos de *glnII* (**Figura V. 6 - Panel A**).

Sin embargo, dado que tomamos como punto de corte un *fold change* menor o igual a -2, entonces los niveles de transcritos de *glnII* no se ven modificados significativamente. Estos resultados se correlacionan con la disminución de la actividad enzimática GS total observados para esta cepa mutante (**Figura V.5 – Panel A**).

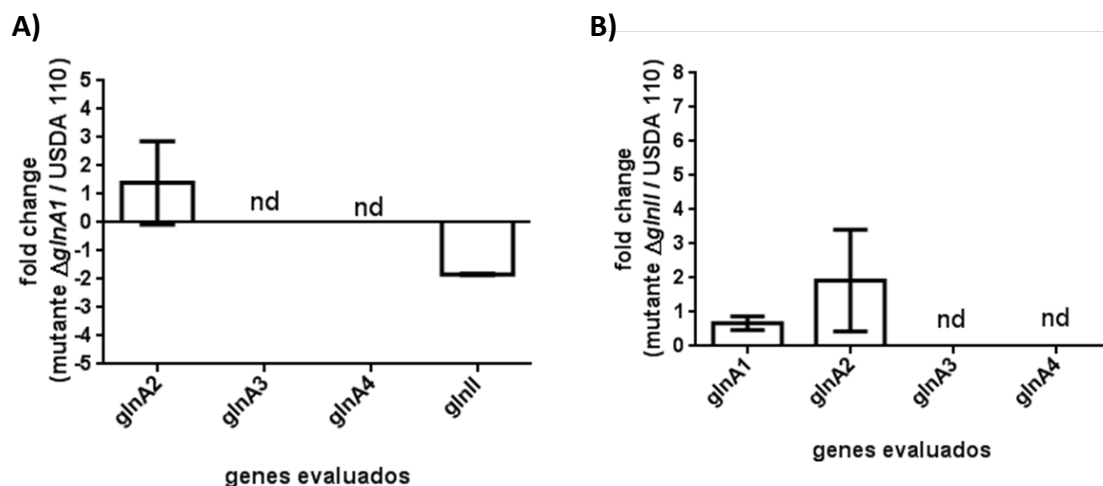


Figura V.6 Expresión relativa de los genes que codifican para las glutamino sintetasas: *glnA1*, *glnA2*, *glnA3*, *glnA4* y *glnII* para las cepas mutantes $\Delta glnA1$ (**A**) y $\Delta glnII$ (**B**) en relación a la cepa *B. diazoefficiens* USDA 110 cultivadas en el medio Evans NH_4^+ durante 5 días. El *fold change* representa la diferencia de expresión entre un determinado gen en la cepa mutante en relación a la cepa salvaje y se define como el r_q ($r_q = 2^{\Delta\Delta Ct}$) cuando el r_q es mayor a 1 y como $-1/r_q$ cuando el r_q es menor a 1. Se consideran como sobreexpresados aquellos genes que presentan un *fold change* mayor a 2, mientras que consideramos reprimidos aquellos cuyo *fold change* sea menor a -2. Los datos que se muestran corresponden al promedio de al menos dos réplicas biológicas evaluadas en triplicado y su desviación estándar. (nd) indica que no fue posible detectar transcritos.

Es decir, la ausencia de *glnA1* no genera modificaciones en los niveles de expresión de los genes que codifican para las demás GS, y probablemente tampoco este induciendo un aumento de la activación de alguna de las otras enzimas presentes, por lo que es esperable la disminución de la actividad GS total observada. Sin embargo, esta menor actividad GS le permite a esta cepa mutante crecer al igual que lo hace la cepa salvaje (**Figura V.2**).

Por otra parte, cuando analizamos la cepa $\Delta glnII$ detectamos que no se observan cambios significativos en los niveles relativos de expresión ni de *glnA1* ni de *glnA2* (**Figura V. 6 - Panel B**). Estos resultados, en principio, no se correlacionarían con las determinaciones de actividad enzimática en las que no se observaron diferencias significativas de la actividad GlnA1 (**Figura V.3 – Panel A**) ni de GS total (**Figura V.5 – Panel A**) en esta cepa mutante en relación a la salvaje. Sin embargo, el pequeño aumento de actividad GlnA1 observado podría corresponder a una mayor activación (deadenilación) de la enzima y no a un aumento de los niveles de transcritos.

Finalmente, no fue posible detectar por este método de cuantificación relativa, transcritos de las copias *glnA3* y *glnA4* ni en la mutante $\Delta glnA1$ (**Panel A**) ni en la mutante $\Delta glnII$ (**Panel B**), indicando que estas copias, en caso de estar involucradas en el metabolismo de N, no serían relevantes en condiciones de limitación de NH_4^+ .

Para completar estos estudios, evaluamos la expresión relativa de los genes mencionados anteriormente para las cepas $\Delta glnII$ y $\Delta glnA1$ cultivadas en el medio Evans Glutamato. En la **Figura V.7 – Panel A** podemos observar que en la mutante $\Delta glnA1$ los niveles relativos de transcritos del gen *glnII* presentaron un marcado aumento de su expresión. Esto nos conduce a pensar que la ausencia de la copia *glnA1*, en presencia de glutamato, podría estar siendo reemplazada por la isoforma GSII, en lugar de alguna de las otras copias de GlnA. Sin embargo, un aumento en los niveles de transcritos de dicho gen no necesariamente debería verse reflejado en un incremento de la actividad enzimática, ya que, como describimos previamente, la actividad enzimática GS en la mutante $\Delta glnA1$ se ve disminuida con respecto a la cepa salvaje (**Figura V.5 – Panel B**). Dado que hasta el momento no se han reportado regulaciones postranscripcionales para GSII de *B diazoefficiens*, entonces un aumento de niveles de transcritos de *glnII* debería llevar finalmente a un aumento de la enzima GSII. Sin embargo, pareciera que la actividad específica de GSII no se modificó con respecto a la medida en la cepa salvaje, y sólo observamos la disminución de la actividad total GS debido a la ausencia de la copia *glnA1* (**Figura V.5- Panel B**).

Cuando analizamos los niveles de transcritos en la cepa $\Delta glnII$, ninguno de los genes medidos: *glnA1*, *glnA2*, *glnA3* ni *glnA4*, presentaron una expresión diferencial con respecto a la cepa parental (**Figura V.7 - Panel B**). A pesar de que estos resultados se correlacionan con las determinaciones de actividad enzimática (**Figura V.3 y Figura V.5**),

resultaron particularmente llamativos debido a la importancia de GSII en condiciones limitantes de N. Nuevamente, esto podría explicarse mediante la existencia de sistemas de regulación postraduccional de las copias de GlnA, que conduzcan a una mayor deadenilación y, por ende, activación de las mismas. Si esto es así podría explicar por qué los niveles de actividad específica de GS de la cepa mutante resultaron del mismo orden que para la cepa salvaje. Para confirmar esta hipótesis, sería muy interesante poder evaluar la cantidad de subunidades deadeniladas de GSI las cuales mediante las técnicas utilizadas en este trabajo no fue posible determinar.

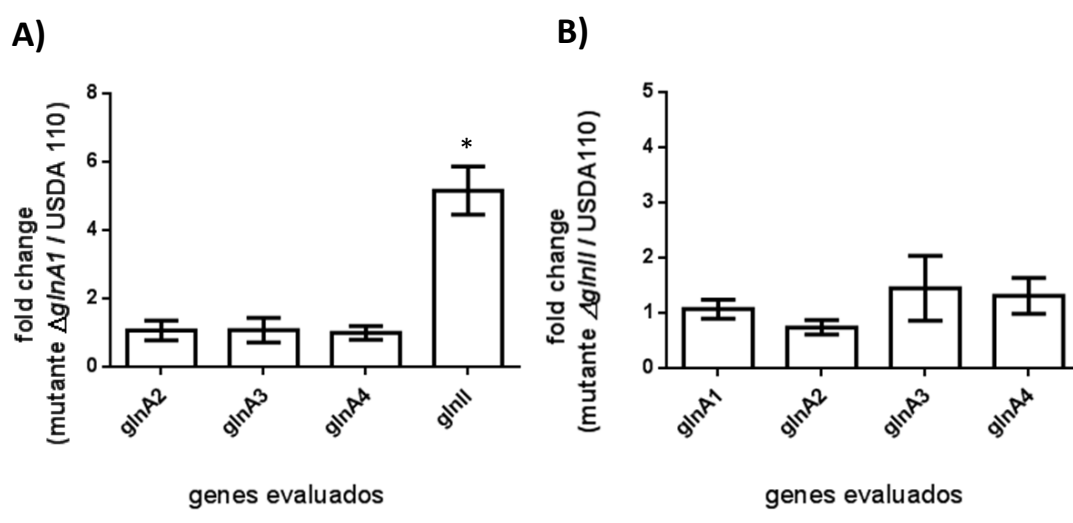


Figura V.7 Expresión relativa de los genes que codifican para las glutamino sintetasas: *glnA1*, *glnA2*, *glnA3*, *glnA4* y *glnII* para las cepas mutantes $\Delta glnA1$ (A) y $\Delta glnII$ (B) en relación a la cepa *B. diazoefficiens* USDA 110 cultivadas en medio Evans Glutamato durante 5 días. El *fold change* representa la diferencia de expresión entre un determinado gen en la cepa mutante en relación a la cepa salvaje. Los datos que se muestran corresponden al promedio de al menos dos réplicas biológicas evaluadas en triplicado y su desviación estándar. Se consideran como sobreexpresados aquellos genes que presentan un *fold change* mayor a 2, mientras que consideramos reprimidos aquellos cuyo *fold change* sea menor a -2. (*) representa una diferencia significativa.

V.3 Análisis de las glutamino sintetasas en medios con cantidades suficientes de N

V.3.1. Evaluación de la actividad enzimática GS

Para analizar el comportamiento de las cepas mutantes en las distintas glutamino sintetasas en un medio con exceso de N, donde la NSR se encuentra mayoritariamente apagada, se utilizó el medio Evans NG que posee NH_4^+ y glutamato como fuentes

nitrogenadas. El estudio de la actividad enzimática se llevó a cabo de la misma manera que se describió previamente para los medios limitados en N. En primer lugar, se determinó la actividad enzimática GS por el método γ -glutamyltransferasa. Para ello, las cepas mutantes y la cepa salvaje se cultivaron durante 5 días a 28°C y a 180 rpm en el medio Evans NG y se obtuvieron los extractos bacterianos como se describe en el **Capítulo II.5**.

En la **Figura V.8 - Panel A** se muestran los resultados obtenidos donde nuevamente encontramos que, al igual que en los medios limitados en NH_4^+ , en aquellas cepas donde el gen *glnA1* se encuentra deletado no es posible detectar actividad enzimática. Además, pudimos observar que la delección del gen *glnA2* produce una disminución en la actividad de la copia *GlnA1*, mientras que la falta de las copias *glnA3* o *glnII* no producen cambios estadísticamente significativos.

Por otra parte, y a diferencia de lo observado en los medios limitados en N, la determinación de la actividad enzimática mediante el método biosintético no arrojó diferencias significativas en ninguna de las cepas mutantes evaluadas al compararlas con la cepa parental (**Figura V.8 - Panel B**).

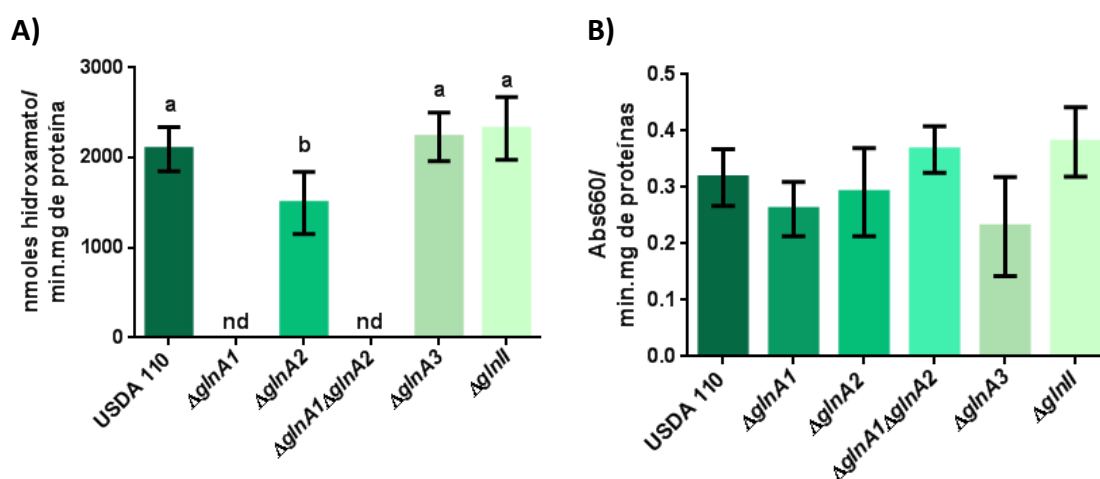


Figura V.8 Medida de la actividad glutamino sintetasa de las cepas Δ *glnA1*, Δ *glnA2*, Δ *glnA1* Δ *glnA2* y Δ *glnII* en comparación con la cepa salvaje *B. diazoefficiens* USDA 110 cultivadas en medio Evans NG. La determinación se llevó a cabo a partir de cultivos de 5 días de crecimiento por el método γ -glutamyltransferasa (**A**) y el método biosintético (**B**). Las columnas representan el promedio y las barras la desviación estándar de 3 ensayos biológicos independientes realizados con 3 réplicas técnicas cada uno. (nd) indica que no fue posible detectar actividad enzimática. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas y la ausencia de letras sobre las barras del Panel B indican que no hay diferencias significativas entre ninguna de las cepas evaluadas con $p < 0,01$ en un análisis de varianza utilizando el test de Tukey.

Si analizamos los resultados de ambos ensayos para la mutante $\Delta glnA2$ en Evans NG podemos observar que la actividad GlnA1 es menor pero la actividad GS total es igual que la observada en la cepa salvaje USDA 110 indicando que en estas condiciones la actividad GS total está compuesta por GlnA1 y por alguna de las otras copias/isoformas de GS.

Estos resultados nos indican que, en una condición de exceso de N, como es el medio Evans NG, la delección de las copias de GS no afecta la actividad enzimática total, probablemente debido a que la presencia de las demás copias sea suficiente para metabolizar el NH_4^+ necesario para que la bacteria pueda crecer de igual manera que lo hace la cepa salvaje (**Figura V.1 - Panel A y B**).

V.3.2 Análisis de expresión de las distintas copias de GS

Para finalizar los ensayos de caracterización fenotípica de estas cepas mutantes evaluamos la expresión relativa de las glutamino sintetetasas para las cepas $\Delta glnA1$ y $\Delta glnII$ en el medio Evans NG. Como mencionamos anteriormente, las cepas mutantes y la salvaje USDA 110 se crecieron durante 5 días a 28°C y a 180 rpm en el medio anteriormente mencionado.

En la **Figura V.9 - Panel A** se pueden observar los resultados obtenidos al evaluar la expresión relativa de las glutamino sintetetasas en la cepa $\Delta glnA1$. Llamativamente, a pesar de encontrarnos en una situación de exceso de N, vemos que la ausencia de $glnA1$ genera una sobreexpresión de 40 veces del gen que codifica para la isoforma GSII ($glnII$), mientras que la expresión del resto de las copias de la isoforma GSI ($glnA2$, $glnA3$ y $glnA4$) no se ven modificadas en relación a la cepa salvaje. Estos resultados sugieren que la copia GlnA1 juega un rol fundamental en presencia de grandes cantidades de NH_4^+ . Además, el marcado aumento de los niveles de transcripto de $glnII$ nos conduce a pensar que en su ausencia su función podría ser reemplazada por la isoforma GSII, y no por ninguna de las otras copias de GSI. En este caso, podemos correlacionar un aumento de transcripto con un aumento de actividad enzimática. Sería deseable obtener los niveles de proteína GSII en el mutante $glnA1$ en estas condiciones para afirmar nuestra hipótesis.

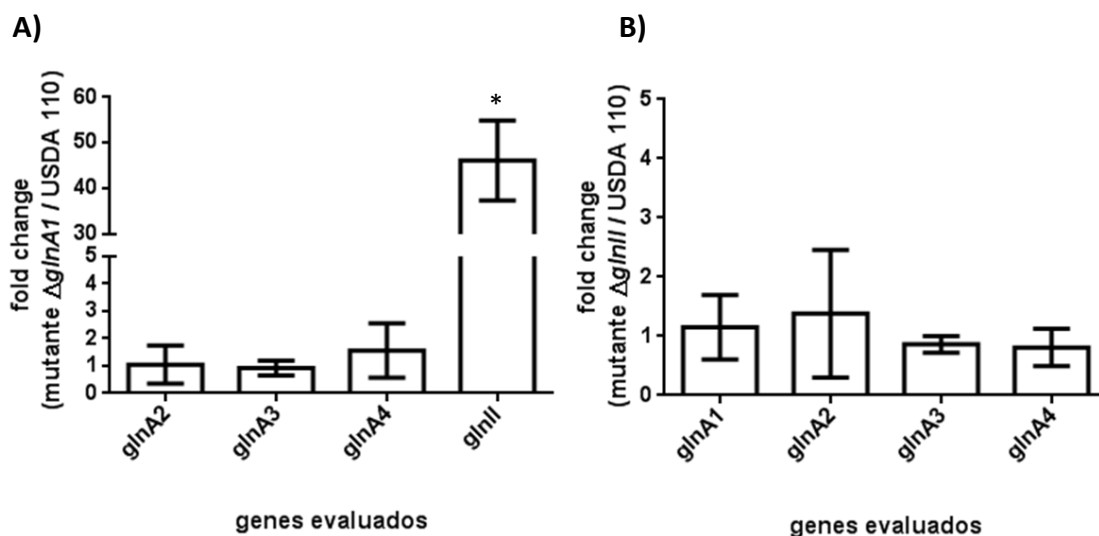


Figura V.9 Expresión relativa de los genes que codifican para las glutamino sintetasas: *glnA1*, *glnA2*, *glnA3*, *glnA4* y *glnII* para las cepas mutantes $\Delta glnA1$ (A) y $\Delta glnII$ (B) en relación a la cepa *B. diazoefficiens* USDA 110 cultivadas en medio Evans NG durante 5 días. El *fold change* representa la diferencia de expresión entre un determinado gen en la cepa mutante en relación a la cepa salvaje. Los datos que se muestran corresponden al promedio de al menos dos réplicas biológicas evaluadas en triplicado y su desviación estándar. Se consideran como sobreexpresados aquellos genes que presentan un *fold change* mayor a 2, mientras que consideramos reprimidos aquellos cuyo *fold change* sea menor a -2. (*) representa una diferencia significativa.

Por otra parte, al evaluar los niveles relativos de transcritos en la mutante $\Delta glnII$ vemos que ninguna de las copias de la isoforma GSI se ve modificada en relación a la cepa salvaje (**Figura V.9 - Panel B**). Estos datos se correlacionan con aquellos obtenidos mediante la medida de la actividad enzimática de GlnA1 y GS total donde el mutante $\Delta glnII$ cultivado en Evans NG no presentó diferencias significativas (**Figura V.8**). Estos resultados podrían indicar que, la ausencia de esta isoforma en condiciones de exceso de N no afecta el metabolismo de la bacteria, lo que concuerda con los datos bibliográficos (Darrow, 1980; Fuchs *et al.*, 1980; Carlson *et al.*, 1987; Martin *et al.*, 1988), o bien que el nivel de activación (deadenilación) de GSI es mayor, logrando una actividad específica total igual que la cepa salvaje. Nuevamente, en este caso, sería fundamental evaluar la cantidad de subunidades deadeniladas de GSI para corroborar alguna de las hipótesis.

V.4 Obtención de un antisuero frente a la proteína GSII

Los ensayos descritos hasta el momento nos permitieron analizar los niveles de transcritos de las glutamino sintetasas, sin embargo, debido a los inconvenientes encontrados con el ensayo γ -glutamyl transferasa, sólo pudimos realizar el análisis a nivel funcional de la actividad enzimática para GlnA1 o la GS total mediante el método biosintético, quedando una gran incógnita sobre la isoforma GSII.

Además, como mencionamos en la introducción de este capítulo, una de las grandes diferencias entre GS I y GSII, tanto en *B. diazoefficiens* como en la mayoría de los microorganismos que poseen estas dos isoformas, es que GS I se encuentra regulada por adenilación reversible (Darrow y Knotts, 1977), mientras que para GSII aún no se ha descrito regulación postransduccional sino que la transcripción del gen que la codifica (*glnII*) se induce en respuesta a la limitación de la fuente nitrogenada (Darrow, 1980, Carlson *et al.*, 1986; Carlson *et al.*, 1987; Martin *et al.*, 1988). Sin embargo, como describimos en el **Capítulo I**, en bacterias como *Rhizobium leguminosarum* se ha reportado la existencia de un regulador postranscripcional de *glnII*, denominado GstI (Glutamine synthetase translational Inhibitor), una pequeña proteína (63 aminoácidos) que actúa a nivel del ARNm del gen *glnII* según la disponibilidad de N. Cuando el N se encuentra en exceso, *gstI* se expresa, y a pesar de que es posible encontrar transcritos de *glnII*, no se observa proteína GSII, y por ende, tampoco es posible detectar actividad enzimática GSII.

Cuando analizamos el entorno génico de *glnII* en *B. diazoefficiens* detectamos que río arriba de dicho gen se encuentra ubicado un gen homólogo al *gstI* de *R. leguminosarum*. Entonces, considerando que los niveles de transcritos de *glnII* podrían no correlacionarse con la presencia de la proteína GSII, sumado a la imposibilidad técnica de medir la actividad enzimática de dicha enzima, nos propusimos obtener un anticuerpo anti-GSII que nos permita, al menos, detectar la presencia/ausencia de dicha proteína en nuestras cepas de estudio.

V.4.1 Construcción del vector de expresión pET22b(+):glnII

Como primer paso para la obtención del anticuerpo frente a la proteína GSII, se procedió a la sobreexpresión de dicha proteína en cepas de *E. coli* BL21 DE3. Para ello, construimos el vector de expresión pET22b(+):glnII utilizando el vector comercial pET22b(+) (Novagen) en el cual se clonó el gen *glnII* completo y en marco. Los cebadores utilizados (Exp_glnII_Fw/ Exp_glnII_Rv ver secuencia en **Tabla II.3.1**) se diseñaron para amplificar el gen *glnII* a partir de su codón de inicio hasta el último codón antes del codón de terminación sin incluir este último ya que el vector pET22b(+) contiene río debajo de su sitio múltiple de clonado la secuencia para la etiqueta His-Tag que será necesaria en pasos posteriores para la purificación de nuestra proteína (**Figura V.10**).



Figura V.10 Esquema del fragmento de *glnII* ligado al vector de expresión pET22b(+). En celeste se muestra la secuencia de *glnII* amplificada utilizando los cebadores Exp_glnII_Fw/ Exp_glnII_Rv y en negro la secuencia correspondiente al vector de expresión río abajo al sitio de inserción del fragmento. Resaltado en amarillo encontramos el sitio de corte para la enzima *NdeI* (donde vemos la superposición del mismo con el codón de inicio del gen) y resaltado en azul el sitio de corte de la enzima *SalI*. La secuencia resaltada en gris se muestra la secuencia His-Tag seguida del codón de terminación resaltado en rojo.

Además, se adicionó al extremo 5' del cebador Exp_glnII_Fw el sitio de restricción para la enzima *NdeI* (CATATG) haciendo coincidir el ATG del sitio de restricción con el ATG de inicio del gen. Por otra parte, al cebador Exp_glnII_Rv se le adicionó en su extremo 5' el sitio de restricción para la enzima *SalI*. Ambos sitios de restricción se adicionaron para realizar un clonado direccionado del fragmento.

La estrategia de clonado utilizada para la construcción del vector pET22b(+):*glnII* se detalla en la **Figura V.11**. Brevemente, se amplificó mediante PCR un fragmento de 1047pb conteniendo el *glnII* utilizando los cebadores Exp_glnII_Fw/ Exp_glnII_Rv y la enzima PFU ADN polimerasa (**Figura V.11 - gel a**). Posteriormente, el vector pET22b(+) y el fragmento de *glnII* se digirieron con las enzimas *NdeI* y *SalI* (**Figura V.11- gel b**) y se ligaron para obtener el vector pET22b(+):*glnII*. La obtención de la construcción se confirmó en primer lugar mediante PCR utilizando los mismos cebadores de expresión Exp_glnII_Fw/ Exp_glnII_Rv (**Figura V.11 - gel c**) y, posteriormente mediante secuenciación.

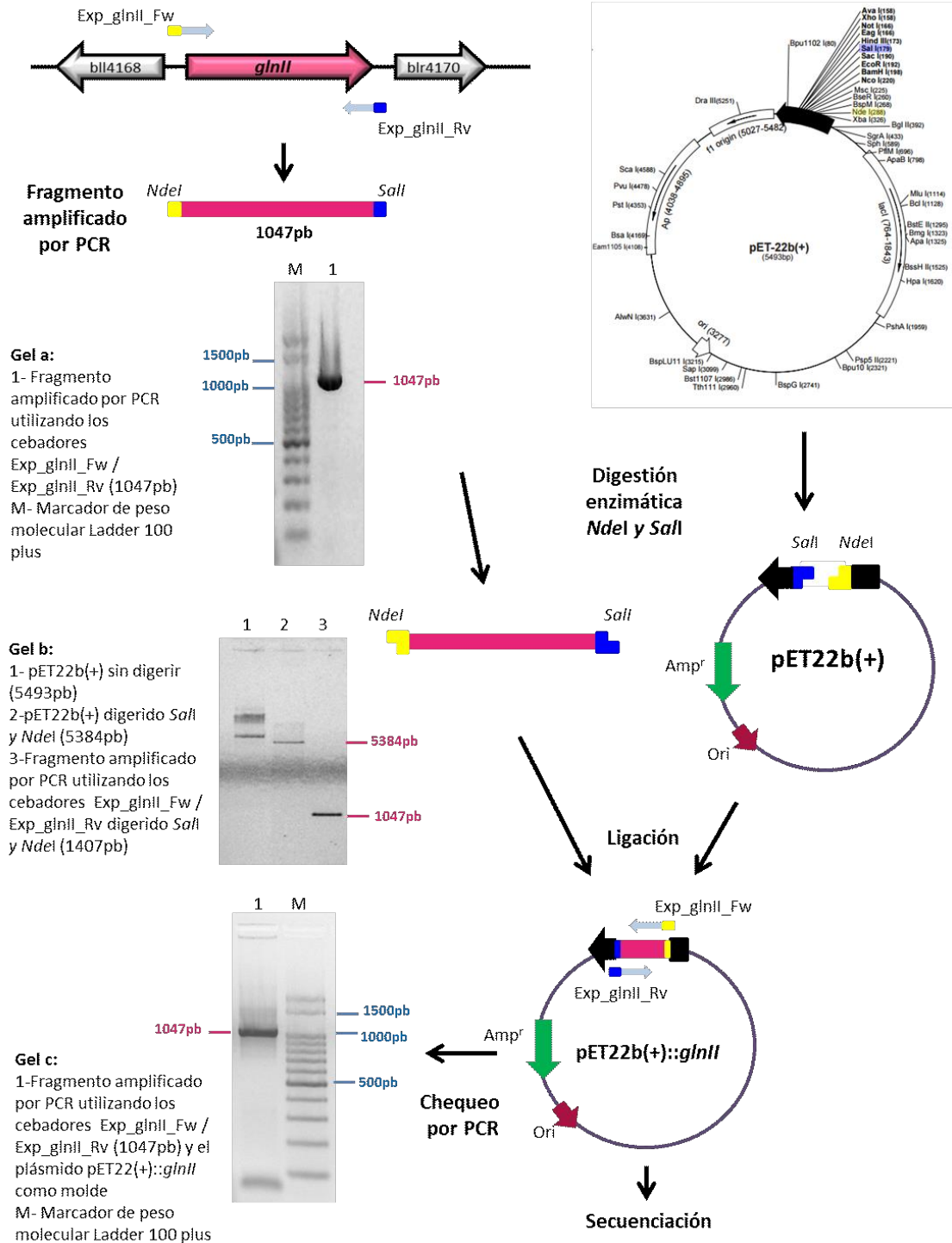


Figura V.11 Esquema de la estrategia general de clonado utilizada para la obtención del vector de expresión pET22b(+):glnII que contiene el gen glnII (blr4169) completo y en marco para su sobreexpresión. A los costados de los geles se indican los pesos moleculares de los fragmentos de interés (rosa) y del marcador de peso molecular (celeste).

V.4.2 Obtención de la proteína GSII

Una vez generada la construcción pET22b(+):*glnII* se procedió a realizar la inducción con IPTG para sobreexpresar el gen *glnII* y, por ende, expresar la proteína GSII en una cepa de *E. coli* BL21 DE3 como se describe detalladamente en el **Capítulo II.4.5**. Se recolectaron muestras a 2hs, 5hs y 24hs post inducción y se trataron como se describe en el **Capítulo II** para analizar la presencia/ausencia de nuestra proteína de interés tanto en la fracción soluble como en la insoluble.

Al observar las muestras obtenidas en un gel de poliacrilamida (**Figura V.12**) efectivamente pudimos confirmar que luego de 2hs de incubación con IPTG 0,3 mM encontramos una banda que coincide con el peso molecular aproximado esperado para la proteína GSII (36 kDa), y cuya cantidad aumenta al aumentar el tiempo de exposición a IPTG. Esta banda no se encuentra en la muestra sin inducir. Además, pudimos observar que la mayor parte de nuestra posible proteína de interés se encontraba en la fracción insoluble, es decir, dentro de cuerpos de inclusión de la bacteria.

Una vez que obtuvimos la proteína del peso molecular coincidente con la proteína GSII, se confirmó su identidad mediante Espectrometría de Masa MALDI-TOF (servicio brindado por el Centro de Estudios Químicos y Biológicos - UBA).

Finalmente, y considerando que nuestra proteína se encuentra ubicada dentro de cuerpos de inclusión, decidimos llevar a cabo la purificación de la proteína GSII mediante un cultivo en *batch* desnaturalizante con urea. La purificación de la misma se realizó gracias a la etiqueta His-Tag que fusionamos a GSII y la resina de afinidad Ni-NTA (Nikel-nitrilotriacetic acid – Invitrogen). Los protocolos utilizados se describen detalladamente en el **Capítulo II.4.7**.

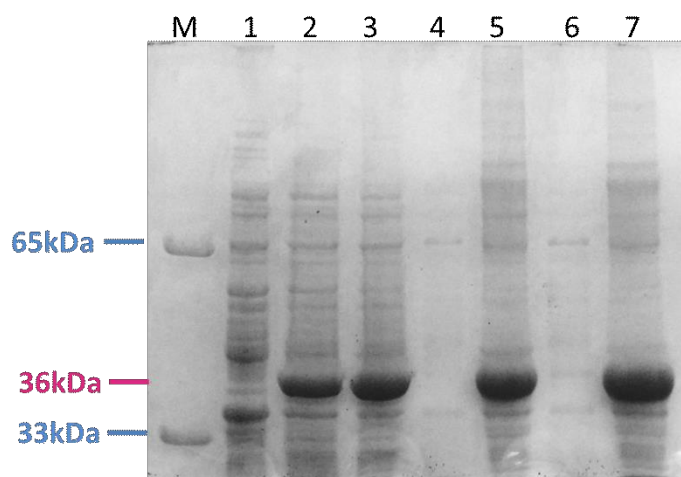


Figura V.12 Análisis mediante SDS-PAGE de la inducción de la expresión de la proteína GSII. En la figura se muestra un gel de 12,5% SDS-PAGE, en el que se indican las fracciones soluble e insoluble. Al costado del gel se muestran los pesos moleculares de la proteína GSII (rosa) y del marcador de peso molecular (celeste)

M- Utilizamos como marcador de peso molecular una muestra de flagelinas de *B. diazoefficiens* USDA 110 que poseen tamaños de 33 kDa y 65 kDa

- 1- Proteínas totales de *E. coli* BL21 -pET22b(+):*glnII* sin inducción
- 2- Proteínas totales de *E. coli* BL21 -pET22b(+):*glnII* 2hs post inducción
- 3- Proteínas totales de *E. coli* BL21 -pET22b(+):*glnII* 5hs post inducción
- 4- Fracción soluble de proteínas de *E. coli* BL21 -pET22b(+):*glnII* 2hs post inducción
- 5- Fracción insoluble de proteínas de *E. coli* BL21 -pET22b(+):*glnII* 2hs post inducción
- 6- Fracción soluble de proteínas de *E. coli* BL21 -pET22b(+):*glnII* 5hs post inducción
- 7- Fracción insoluble de proteínas de *E. coli* BL21 -pET22b(+):*glnII* 5hs post inducción

Para la elución de la proteína purificada se realizaron 3 lavados con Buffer de Lavado con concentraciones crecientes de Imidazol (Imidazol 5mM / 10mM / 20mM) y posteriormente con 3 lavados con Buffer de Elución Nativo con concentraciones de 50mM/ 100mM/ 250mM de Imidazol recolectando el sobrenadante en cada uno de ellos. Como control de la purificación se corrió en un gel de SDS-PAGE una muestra sin inducir, la proteína 2 horas post inducción y una muestra de las distintas fracciones de lavado y de elución. En la **Figura V.13** puede observarse que, efectivamente, la mayor parte de la proteína purificada se obtuvo en la última fracción eluída.

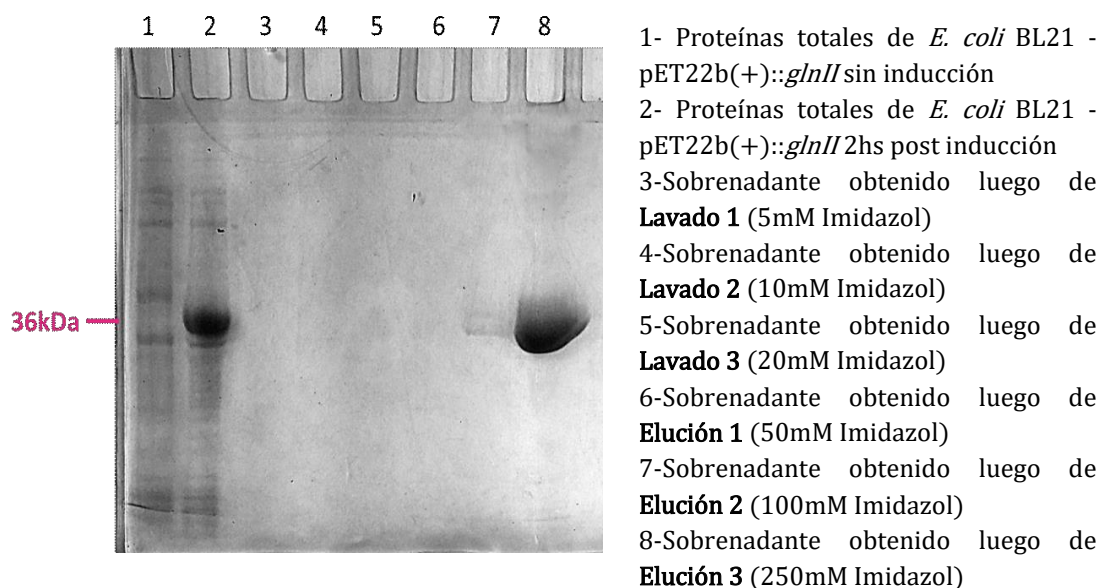


Figura V.13 Análisis mediante SDS-PAGE de la purificación de la proteína GSII. Se realizaron sucesivos lavados con Buffer de Lavado y Buffer de Elución, ambos con concentraciones crecientes de imidazol. Al costado del gel se muestra el peso molecular de la proteína GSII (rosa).

Por último, se llevó a cabo la diálisis contra PBS de la última fracción de elución utilizando una membrana de celulosa (MEMBRA-CEL MC18 X 100 CLR, Viskase Companies, USA). La muestra purificada y dializada fue la utilizada posteriormente para ser inyectada en ratones para producir el anticuerpo.

V.4.3 Ensayos de Western Blot utilizando el antisuero GSII

Una vez obtenido el suero de los ratones inmunizados con la proteína GSII, llevamos a cabo un ensayo preliminar de Western Blot a partir de muestras de proteínas totales de un cultivo de *B. diazoefficiens* USDA 110 crecido en el medio de Evans Glutamato. En particular, seleccionamos este medio de cultivo para realizar los primeros análisis de Western Blot porque como describimos anteriormente en el **Capítulo III**, en dicho medio *B. diazoefficiens* posee aumentado sus niveles de transcritos de *glnII* y posee una elevada actividad enzimática, indicando que se encuentra limitado en N y que probablemente los niveles de GSII sean elevados y fácilmente detectables.

Como se observa en la **Figura V.14** efectivamente el anticuerpo obtenido fue capaz de detectar la presencia de la proteína GSII en la muestra utilizada como control positivo perteneciente a una de las fracciones de elución obtenida mediante el proceso de purificación de la proteína (**calle 2**). Sin embargo, cuando se analizó la muestra de las proteínas totales de *B. diazoefficiens* USDA 110 observamos un gran bandeo inespecífico (**calle 1**). Por otra parte, en la región correspondiente al peso molecular donde esperamos encontrar a GSII (36kDa) pareciera observarse una banda más intensa, aunque debido a la gran inespecificidad del anticuerpo no podríamos asegurar que corresponda a nuestra proteína de interés.

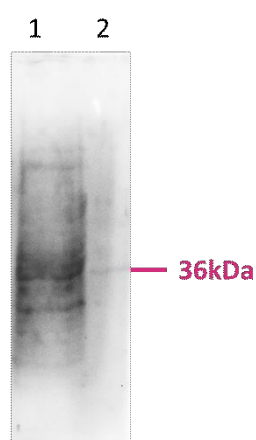


Figura V.14 Análisis por Western blot de las proteínas de *B. diazoefficiens* utilizando el anticuerpo anti-GSII

- 1- Proteínas totales de *B. diazoefficiens* USDA 110 cultivada en Evans Glutamato
- 2- Control positivo. Fracción eluída durante la purificación de la proteína GSII

Frente a este resultado decidimos obtener nuevamente proteínas totales de *B. diazoefficiens* USDA 110 cultivando la cepa en el medio de Evans y en las variantes Evans NG, Evans Glutamato y Evans NH_4^+ durante 5 días. De esta manera, esperábamos observar la detección de GSII en las muestras de proteínas obtenidas de cultivos en Evans Glutamato y Evans NH_4^+ , mientras que en las muestras de proteínas obtenidas de bacterias cultivadas en Evans y Evans NG no debería observarse la presencia de la proteína. En este caso, también incluimos como control negativo proteínas totales obtenidas de la cepa mutante $\Delta glnII$ cultivado en Evans Glutamato y Evans NH_4^+ . En todos los casos evaluados, las muestras de proteínas obtenidas del mutante $\Delta glnII$ no deberían mostrar detección de GSII.

Como se observa en la **Figura V.15**, nuevamente pudo detectarse, aunque de manera muy tenue, la proteína GSII a partir de la muestra obtenida durante el proceso de purificación (**calle 7**). En esta muestra también puede observarse un bandeo

inespecífico. Sin embargo, en el resto de las muestras analizadas (**calles 1 a 6**) sólo pudo detectarse este mismo bandeo inespecífico, incluso en las muestras pertenecientes al mutante $\Delta glnII$.

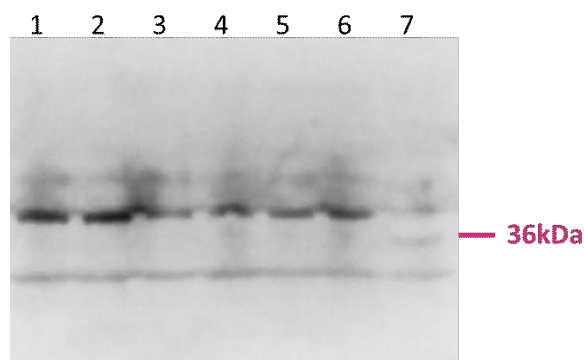


Figura V.15 Análisis por Western blot utilizando el anticuerpo anti-GSII sobre:

- 1- Proteínas totales de *B. diazoefficiens* USDA 110 cultivada en medio Evans
- 2- Proteínas totales de *B. diazoefficiens* USDA 110 cultivada en medio Evans NG
- 3- Proteínas totales de *B. diazoefficiens* USDA 110 cultivada en medio Evans NH_4^+
- 4- Proteínas totales de $\Delta glnII$ cultivada en medio Evans NH_4^+
- 5- Proteínas totales de *B. diazoefficiens* USDA 110 cultivada en medio Evans Glutamato
- 6- Proteínas totales de $\Delta glnII$ cultivada en medio Evans Glutamato
- 7- Fracción eluída durante la purificación de la proteína GSII (control positivo)

Lamentablemente, con este ensayo preliminar de Western blot no fue posible determinar la sobreexpresión de GSII en las muestras analizadas, quizás debido a la metodología utilizada para obtener las proteínas totales de los cultivos bacterianos, quedando como perspectiva de este trabajo continuar con la puesta a punto de esta técnica.

V.5 Resumen y discusión

A lo largo de este capítulo abordamos la caracterización fenotípica de las cepas mutantes en las distintas GS: $\Delta glnA1$, $\Delta glnA2$, $\Delta glnA3$, $\Delta glnII$ y la doble mutante $\Delta glnA1\Delta glnA2$, con el objetivo de identificar si todas las copias de *glnA* se encuentran involucradas en la asimilación del NH_4^+ en *B. diazoefficiens* y de ser así, el rol que cada una de ellas cumple en esta compleja vía metabólica.

El análisis de las cinéticas de crecimiento en *batch* demostró que las cepas mutantes no presentan un crecimiento diferencial en relación al comportamiento de la cepa parental, en ninguno de los medios evaluados independientemente de la relación C/N y de la fuente de N utilizada (**Figuras V.1 y Figura V.2**). Esto nos sugiere que ninguna de las enzimas GS es por sí sola esencial para el crecimiento de la bacteria en vida libre.

Considerando que la relación de las cantidades relativas de α -cetoglutarato y de glutamina dentro de la célula (relación C/N intracelular) son las que regulan la activación de GSI y la expresión de GSII (Darrow, 1980; Fuchs *et al.*, 1980; Carlson *et al.*, 1987; Martin *et al.*, 1988), esperábamos obtener diferencias al menos en aquellos medios limitados en N. Sin embargo, ninguna de las cepas mutantes individuales, ni la doble mutante $\Delta glnA1\Delta glnA2$, se vieron afectadas, indicando que las diferentes GS encontradas en *B. diazoefficiens* podrían estar reemplazándose unas a otras.

A partir de la determinación de la actividad GS por el método γ -glutamyltransferasa llamativamente sólo pudimos detectar la actividad de la isoforma GSI, en particular de GlnA1. Esto nos permitió sacar algunas conclusiones que se complementaron luego con las medidas obtenidas por el ensayo biosintético.

La caracterización fenotípica de las cepas mutantes mediante estos métodos nos brindó resultados sumamente interesantes. En primer lugar, mediante el método γ -glutamyltransferasa encontramos que, en los medios Evans NH_4^+ , Evans Bajo N y Evans NG, la falta de la copia *glnA2* siempre produce una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,01$) de la actividad de la copia GlnA1, indicando que probablemente GlnA2 cumple un rol determinado, aún desconocido, que influye en la función que lleva a cabo GlnA1 (**Figuras V.3 – Panel A, Figura V.4 y Figura V.8**). Este comportamiento sorpresivamente sólo se observó en medios que contenían NH_4^+ y no así en medios con glutamato como única fuente nitrogenada, indicando que la activación o la función de GlnA2 se lleva a cabo principalmente en presencia de NH_4^+ . Lamentablemente, los datos obtenidos en el presente trabajo no fueron suficientes para esclarecer este mecanismo de regulación.

Por otra parte, cuando analizamos el comportamiento de $\Delta glnII$ en Evans NH_4^+ y en Evans Glutamato encontramos que la actividad GS total es igual a la obtenida para la cepa salvaje (**Figura V.5**). Sin embargo, también observamos que la ausencia de la isoforma GSII podría estar generando un aumento en la actividad de GlnA1 en Evans

NH_4^+ (**Figura V.3 - Panel A**). En este sentido, al evaluar el comportamiento de esta cepa en una condición de extrema escasez de NH_4^+ , como sucede en un medio Evans Bajo N, efectivamente pudimos detectar que el aumento de la actividad de GlnA1 se vuelve estadísticamente significativo con respecto a la salvaje (**Figura V.4**), indicando que en estas condiciones GlnA1 se encontraría reemplazando la falta de GSII. Por el contrario, en el medio Evans Glutamato no detectamos diferencias significativas de la actividad de GlnA1 en la cepa $\Delta glnII$ con respecto a la cepa salvaje USDA 110 (**Figura V.3 - Panel B**). Estos resultados indican que, a pesar que los medios Evans NH_4^+ y Evans Glutamato poseen la misma relación C/N, la fuente nitrogenada utilizada tiene un efecto diferencial sobre la actividad de las distintas copias de enzimas GS, probablemente debido a que las rutas metabólicas y enzimas involucradas en la asimilación de glutamato son diferentes de aquellas involucradas en la asimilación de NH_4^+ .

Sin embargo, cualquiera sea la condición de cultivo, no pudimos correlacionar el aumento de actividad de GlnA1 en el mutante $\Delta glnII$ con un aumento de transcritos del gen *glnA1*, ni tampoco de las otras copias de *glnA* (**Figura V.6**, **Figura V.7** y **Figura V.9**). De alguna manera, parecería que la falta de la isoforma GSII es reemplazada por un aumento de activación de GlnA1 y/o GlnA2, y que la regulación de estas enzimas no sería a nivel de transcripción sino postraduccional (deadenilación).

En relación a las cepas mutantes $\Delta glnA1$ y $\Delta glnA1\Delta glnA2$, pudimos detectar por el método biosintético que cuando el medio se encuentra limitado en N, tanto en presencia de NH_4^+ (**Figura V.5 - Panel A**) como de glutamato (**Figura V.5 - Panel B**), presentan una menor actividad GS total en relación a la detectada para la cepa parental, e incluso, en el medio limitado en NH_4^+ , $\Delta glnA2$ también presenta el mismo fenotipo (**Figura V.5 - Panel A**). Este resultado nos indica que la copia *glnA2* de la isoforma GSI también es funcional y sería relevante en presencia de NH_4^+ , pero no así en presencia de glutamato. Asimismo, podríamos sugerir que la ausencia de GlnA1 o de GlnA2 en Evans NH_4^+ no sería reemplazada, en principio, por ninguna de las otras GS de *B. diazoefficiens* ya que la actividad total en las cepas en estas copias mutantes se ve disminuida en relación a la cepa salvaje (**Figura V.5 - Panel A**). Sin embargo, la actividad de las copias que estén activas en estos mutantes sería suficiente para metabolizar eficientemente el escaso NH_4^+ disponible (**Figura V.5**) y poder crecer al igual que la cepa salvaje (**Figura V.2**).

El análisis de expresión de transcritos de *glnA2*, *glnA3*, *glnA4* y *glnII* en la cepa mutante $\Delta glnA1$, nos resultó llamativo, ya que pudimos determinar que únicamente en el medio Evans Glutamato la ausencia de esta copia conduce a un aumento en los niveles de transcritos de *glnII* (**Figura V.9 – Panel A**), no ocurriendo lo mismo en el medio Evans NH_4^+ (**Figura V.7 – Panel A**). Sin embargo, este aumento en la expresión de *glnII* no fue suficiente para igualar la actividad específica de la enzima (**Figura V.5 – Panel B**). De todas maneras, este resultado indica que la ausencia de la copia GlnA1 podría ser reemplazada por la isoforma GSII en presencia de glutamato. En contraposición, los datos obtenidos al evaluar el mutante $\Delta glnA1$ en Evans NH_4^+ (**Figura V.6 – Panel A**) indican que las enzimas encargadas de la asimilación en dicha condición serían GlnA2 y GSII, ya que los transcritos de GlnA3 y GlnA4 no son detectados. Sin embargo, no sería necesario un aumento de transcritos de *glnA2* y *glnII*, sino que probablemente se encuentren reguladas de manera postraducciona. En este caso, la imposibilidad de detectar transcritos de *glnA3* y *glnA4* en el medio Evans NH_4^+ nos sugiere que dichas copias en esas condiciones no se encuentran expresadas o lo hacen en bajos niveles (**Figura V.6 – Panel A**). Nuevamente, parecería haber una regulación diferencial de la enzima GSII según la bacteria se encuentre bajo la limitación de NH_4^+ o de glutamato. Por último, en aquellos ensayos donde las cepas mutantes fueron cultivadas en un medio con exceso de N, como el medio Evans NG, sólo la delección de *glnA2* produjo una diferencia significativa en la actividad de GlnA1 (**Figura V.8 – Panel A**) indicando nuevamente la importancia de esta copia en presencia de NH_4^+ . Por otra parte, observamos que el resto de los mutantes evaluados mediante los dos métodos de detección enzimática utilizados, no presentaron diferencias significativas en relación a la cepa salvaje (**Figura V.8**). Sin embargo, un dato llamativo en este medio, fue el aumento de expresión del gen *glnII* en el mutante $\Delta glnA1$ aun cuando la bacteria se encuentra en medios con exceso de N, donde no debería encontrarse muy expresada (Carlson *et al.*, 1987). Posiblemente este aumento en los niveles de transcripto de *glnII* traiga aparejado un aumento en la actividad enzimática GS en el mutante $\Delta glnA1$ hasta alcanzar los niveles de la cepa salvaje.

Finalmente, al analizar el fenotipo de la cepa $\Delta glnA3$ encontramos que esta copia no genera diferencias significativas en la actividad enzimática de GlnA1 ni en la actividad GS total en ninguno de los medios limitados en N (**Figura V.3 y Figura V.5**). El mismo

fenotipo fue observado cuando el medio utilizado fue Evans NG (**Figura V.8**). En conjunto, estos datos sugieren que, al menos en las condiciones evaluadas, esta copia no sería relevante para la asimilación de NH_4^+ en *B. diazoefficiens*.

Los resultados en su conjunto obtenidos en este trabajo nos conducen a pensar que a pesar de la existencia de múltiples copias de la enzima GS, la asimilación de NH_4^+ en *B. diazoefficiens* se lleva a cabo principalmente por la acción catalítica de la copia GlnA1 y GlnA2 de la isoforma GSI y de la isoforma GSII. Sin embargo, aún faltan algunos ensayos para terminar de afirmar esta hipótesis, como por ejemplo la determinación de la cantidad de subunidades de GlnA1 adeniladas y la determinación de cantidad de proteína GSII.

Con respecto a esta última consideración, logramos sobreexpresar exitosamente la proteína GSII de *B. diazoefficiens* en cepas de *E. coli* (**Figura V.12**) para desarrollar un anticuerpo específico contra la misma con el objetivo de detectar al menos su presencia o ausencia. Por último, el suero anti – GSII obtenido se utilizó en ensayos preliminares de Western Blot, los cuales demostraron que efectivamente el anticuerpo es capaz de detectar la proteína GSII a partir de muestras puras de dicha proteína. Sin embargo, no fue posible detectar la proteína en muestras obtenidas a partir de cultivos de *B. diazoefficiens* (**Figura V.14 y Figura V.15**). Por lo tanto, nos queda como perspectiva de este trabajo poner a punto la metodología de obtención de dichas proteínas para luego evaluar la presencia/ausencia de esta proteína en las cepas mutantes obtenidas.

Capítulo VI

**Análisis genómico y
funcional de las proteínas de
señalización PII de
B. diazoefficiens USDA 110**



Introducción

Las proteínas PII son una familia de proteínas de transducción de señales que se dividen fundamentalmente en dos subfamilias denominadas GlnB (codificada por el gen *glnB*) y GlnK (codificada por el gen *glnK*). Estas dos proteínas son muy similares entre ellas y exhiben una versatilidad funcional muy llamativa, siendo capaces de reemplazarse para llevar a cabo algunas funciones (Arcondeguy *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001; Gosztolai *et al.*, 2017), pero a su vez, teniendo roles y propiedades completamente diferentes (Atkinson *et al.*, 1999; Arcondéguy *et al.*, 2001; Atkinson *et al.*, 2002; Blauwkamp *et al.*, 2002; Yurgel *et al.*, 2010).

En conjunto, las funciones que cumplen estas proteínas resultan esenciales en la coordinación de la regulación de diversos procesos. Principalmente, se encargan de integrar el metabolismo del N y C intracelular mediante la interacción con moléculas como la glutamina y el α -cetoglutarato, representantes de los niveles de N y C intracelulares respectivamente. Además, las proteínas PII son capaces de detectar el estado energético de la célula gracias a su unión a ATP o ADP. Por lo tanto, dependiendo de las moléculas con las que interaccionen (glutamina, α -cetoglutarato, ATP, ADP) y dependiendo de la conformación que adopten como consecuencia de estas uniones, las proteínas PII pueden interactuar con diversas proteínas blanco, las cuales en su mayoría intervienen en respuesta al estrés por N (NSR).

Como ya hemos mencionado en capítulos anteriores, las proteínas PII son las principales encargadas de transmitir las señales que permitirán la activación/inactivación de la GSI y la regulación de la expresión de *glnII* (GSII). Así, en los rizobos, cuando los niveles intracelulares de N son escasos las proteínas PII son uridiladas por el regulador maestro GlnD. En esta condición las PII son capaces de unirse a la proteína GlnE y activar su función adenilremovasa, la cual permite la deadenilación y por ende, la activación de la GSI. A su vez, PII uridilada induce la activación del sistema de dos componentes NtrBC, donde el regulador de respuesta NtrC es el principal encargado de regular la expresión de varios genes que intervienen en la asimilación de NH_4^+ , entre los que encontramos el gen *glnII*. Si GSII no posee regulaciones postranscripcionales como se ha descrito hasta el momento en *B. diazoefficiens*, entonces una vez formada la enzima GSII la misma será activa. Además de su rol en la activación de la NSR, las proteínas PII intervienen en la

regulación del ingreso de NH_4^+ a la célula. Se ha descrito para *E. coli* que esta regulación se produce mediante la unión directa de GlnK al transportador de NH_4^+ denominado AmtB (Javelle *et al.*, 2004; Conroy *et al.*, 2006). Se cree que debido a esta interacción física entre las proteínas GlnK-AmtB, los genes *glnK* y *amtB* (gen que codifica para el transportador de NH_4^+) suelen encontrarse ubicados de manera adyacente en los genomas y, salvo en escasas excepciones, se transcriben de manera conjunta (Thomas *et al.*, 2000a).

Por último, se ha descrito que en arqueas como *H. mediterranei* (Pedro-Roig *et al.*, 2011) o bacterias fototrópicas como *Rhodospseudomonas palustris* (Connelly *et al.*, 2006) y *Rhodospirillum rubrum* (Zhang *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2003) poseen en sus genomas una duplicación génica de *glnK*, cada una de las cuales está acompañada de una copia de *amtB*. Sorprendentemente, *B. diazoefficiens* también posee dos copias del par *glnK-amtB* en su genoma, las cuales no han sido descritas ni estudiadas hasta ahora. Incluso, esta duplicación génica no ha sido descrita en ningún otro rizobio, y en aquellos organismos donde se ha descrito, aún no se ha podido describir con certeza el rol específico que cumple cada una de las copias de GlnK.

Ante la ausencia de conocimiento sobre estas proteínas en *B. diazoefficiens* USDA 110 nos propusimos investigar si las dos copias de *glnK* se expresan, y si es así, determinar si son funcionales. El objetivo final de este análisis es intentar dilucidar el rol que cumple cada una de las GlnK, junto con GlnB, en la regulación del metabolismo de N de este rizobio.

En el presente capítulo abordaremos estas preguntas mediante la construcción de mutantes delecionesales en cada una de las copias de los genes que codifican para las proteínas PII (*glnB*, y ambas copias de *glnK*) y el análisis de los fenotipos obtenidos para cada cepa mutante en vida libre.

VI.1 Análisis bioinformáticos

VI.1.1 Análisis de secuencias de las proteínas PII

Al analizar el genoma de *B. diazoefficiens* USDA 110 (Kaneko *et al.*, 2002) encontramos una copia del gen *glnB* (ORF blr4948) de 339 nt que, como mencionamos en el **Capítulo**

IV, se encuentra ubicado río arriba de la copia *glnA1* (ORF blr4949) del gen que codifica para la GSI. Además, encontramos dos copias de *glnK* que hemos denominado *glnK1* (ORF blr0612) de 402 nt y *glnK2* (ORF blr0606) de 339 nt. La nomenclatura elegida en este trabajo no coincide con el orden en el que estos genes se ubican en el genoma, sino que ha sido designada arbitrariamente. De esta forma, denominamos *glnK1* a la copia que se encuentra río arriba del gen que codifica para el transportador de amonio AmtB (ORF blr0613 - que denominamos *amtB1*) y *glnK2* a la copia que se encuentra río arriba de una copia putativa de dicho transportador de NH₄⁺ conformada por dos genes consecutivos (ORF blr0607/ORF blr0608 – que llamamos *amtB2*) (**Figura VI.1- Panel A**).

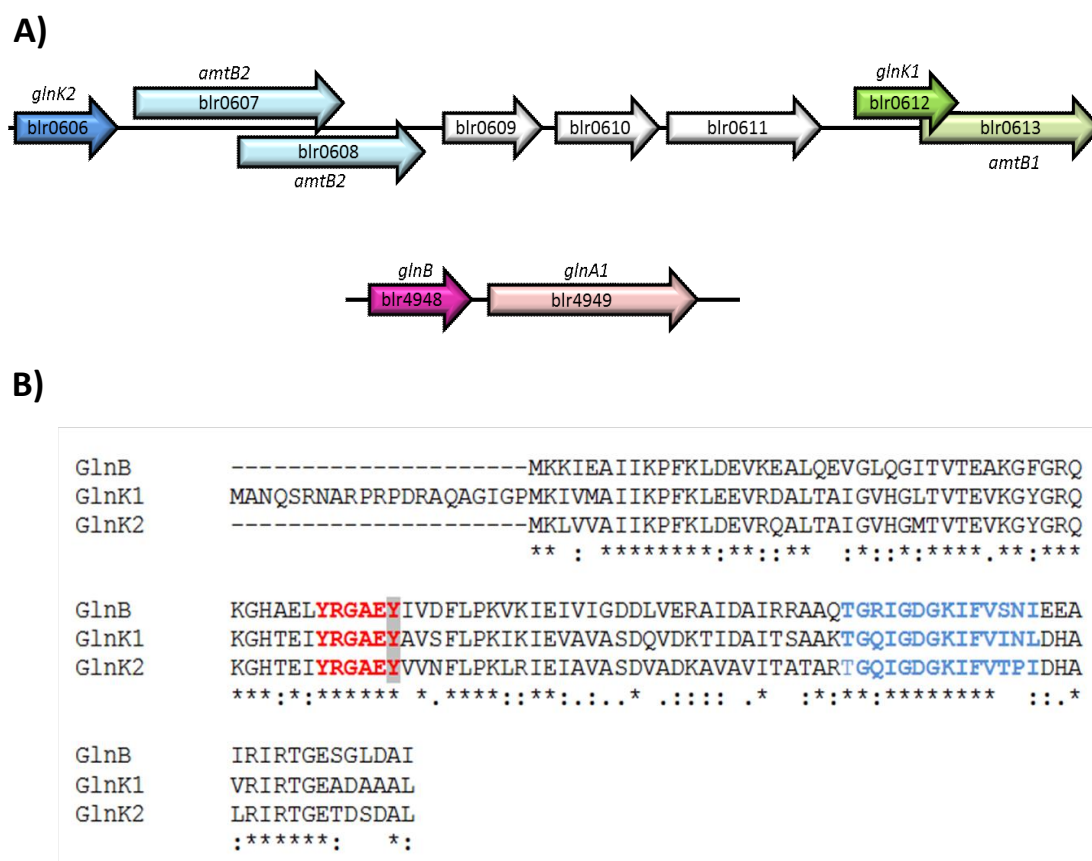


Figura VI.1 A) Organización genómica de los *clusters* que contienen los genes *glnB*, *glnK1-amtB1* y *glnK2-amtB2* en el genoma de *B. diazoefficiens* USDA 110. **B)** Comparación de las secuencias de las tres proteínas PII de *B. diazoefficiens* USDA 110. La región perteneciente al extremo C-terminal se muestra en celeste, el sitio de uridilación en rojo y el residuo Tyr51 se resalta en gris. El alineamiento se llevó a cabo utilizando el programa ClustalO (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo).

Mediante el análisis *in silico* de regiones características de las secuencias proteicas de las PII de *B. diazoefficiens*, detectamos en las tres secuencias analizadas la región correspondiente al sitio de uridilación que contiene el residuo Tyr51, el cual ha sido descrito en otros microorganismos como el residuo donde GlnD lleva a cabo la uridilación (Reitzer, 2003; Ninfa y Jiang, 2005). También fue posible detectar en las tres secuencias una región específica conservada en la familia de PII que se ubica en el extremo C-terminal (**Figura VI.1 – Panel B**).

Por otra parte, al alinear las secuencias proteicas de GlnB (112 aa), GlnK1 (133 aa) y GlnK2 (112 aa) de *B. diazoefficiens* encontramos que, llamativamente, GlnK1 posee 21 residuos más en su extremo N-terminal en relación a GlnB y a GlnK2. Esta secuencia adicional fue analizada mediante programas bioinformáticos y no se pudo asignar una función característica. Además, estos 21 aminoácidos no son detectados en secuencias de GlnK de otras especies. Estas observaciones, junto a la presencia de una segunda metionina (M) en la posición 22 (posición donde comienza la secuencia codificante de GlnB y GlnK2), nos conduce a pensar que probablemente la secuencia haya sido mal asignada en la base de datos. A pesar de esto, durante el trabajo realizado en esta tesis se consideraron estos 21 aminoácidos como parte de la secuencia de GlnK1.

Cuando comparamos las secuencias de las distintas PII de *B. diazoefficiens* entre ellas, encontramos que el porcentaje de identidad es del 77% para GlnK1 y GlnK2, de 63% para GlnK1 y GlnB y de un 61% para GlnK2 y GlnB. A pesar de tener un alto porcentaje de identidad, igualmente, si todas ellas fueran funcionales, cada una podría tener un rol diferente dentro de la regulación del metabolismo del N o en algún otro proceso aún no identificado.

Sorprendentemente, si comparamos las secuencias de las PII de *B. diazoefficiens* con secuencias homólogas de bacterias evolutivamente distantes como pueden ser *E. coli*, *Azospirillum brasilense* o *Pseudomonas aeruginosa*, también encontramos que el porcentaje de identidad es alrededor del 60 al 70%. Estos resultados son concordantes con la idea de que la familia de proteínas PII se encuentra ampliamente distribuida y conservada en la naturaleza.

VI.1.2 Análisis de secuencias de los transportadores de amonio (AmtB)

Los transportadores de amonio AmtB fueron originalmente descritos en *Saccharomyces cerevisiae* y *Arabidopsis thaliana* (Marini *et al.*, 1994; Ninnemann *et al.*, 1994). Sin embargo, se ha demostrado que esta familia de transportadores se encuentra representada en eubacterias, archeas, hongos y hasta en pequeños animales.

Como mencionamos anteriormente, en el genoma de *B. diazoefficiens* podemos encontrar 2 copias de genes para dicho transportador que denominamos *amtB1* (ORF blr0613) y *amtB2* (ORF blr0607 y ORF blr0608). Como se muestra en la **Figura VI.2**, según la base de datos NCBI, los ORF blr0607 y blr0608 se encuentran superpuestos en el genoma de *B. diazoefficiens* USDA 110. El ORF blr0607 se encuentra ubicado desde la posición 652.211 a la 653.227 (1017 nt) y el ORF blr0608 desde la posición 652.842 a la 653.513 (672 nt).

La presencia de dos copias de los genes *glnK-amtB* es poco frecuente. Incluso, como podemos observar en la **Figura VI.2**, en aquellos microorganismos donde ocurre dicha duplicación, la distribución de las copias en el genoma es muy poco conservada. En el caso de *B. diazoefficiens* USDA 110, los pares *glnK1-amtB1* y *glnK2-amtB2* se encuentran separados por tres genes, dos de ellos no están involucrados en el metabolismo de N y el otro codifica para una proteína hipotética. En cambio, en otras bacterias cercanas como *Bradyrhizobium sp.* BTAi1 se encuentran ubicados de manera adyacente mientras que en otras como *B. japonicum* USDA 6 o *B. elkanii* USDA 76 se encuentran mucho más distantes.

De todas formas, como se ha descrito en Thomas y col. (2000a), el par de genes *glnK* y *amtB* posee una disposición sumamente conservada y siempre se encuentran ubicados de manera contigua con el *glnK* río arriba del *amtB* (**Figura VI.2**).

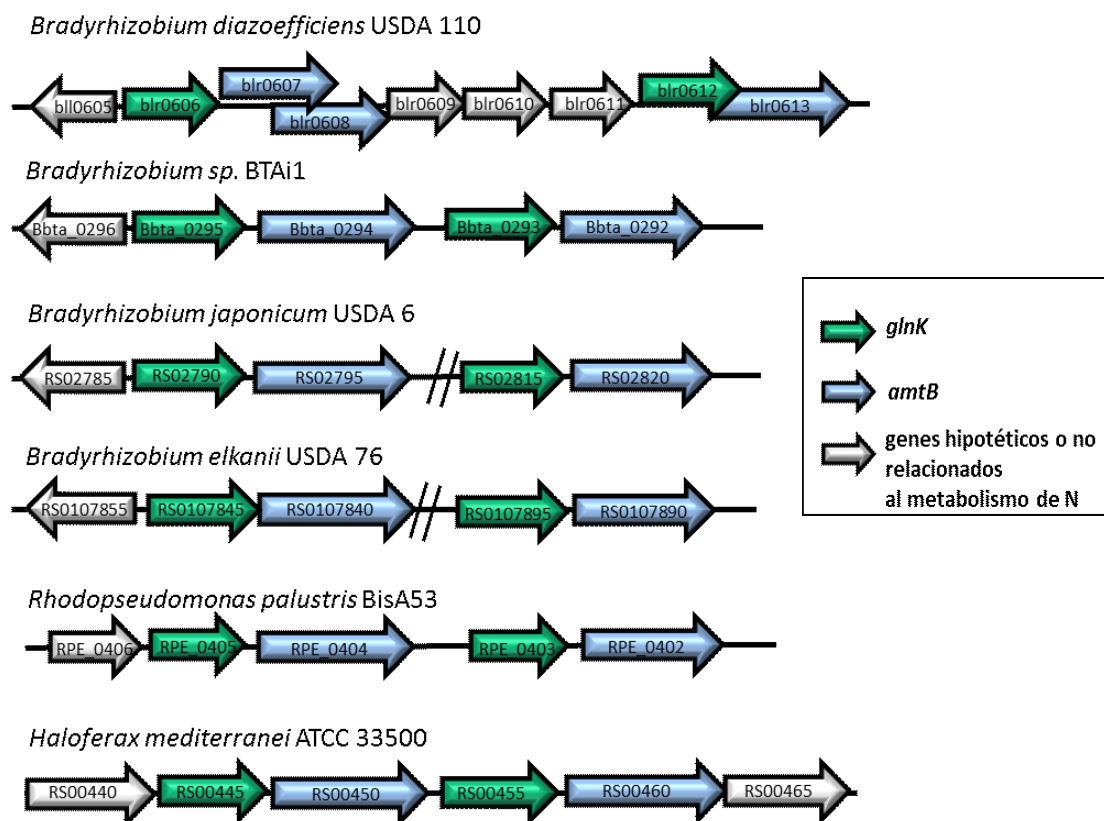


Figura VI.2 Comparación de la región genómica del ADN cromosomal de *B. diazoefficiens* USDA 110 y microorganismos que poseen duplicado el par *glnK-amtB*. Se puede ver que en todas las especies analizadas el gen *glnK* (flechas verdes) se encuentra ubicado río arriba del gen *amtB* (flechas azules). Las flechas en gris representan genes no relacionados con el metabolismo de N y las dos barras paralelas indican que en la imagen la región genómica se ha reducido para comparar exclusivamente los pares *glnK-amtB*.

Por otra parte, considerando la presencia de más de un ORF para el gen *amtB2* y además que todas las bacterias cercanas a *B. diazoefficiens* analizadas en este trabajo poseen un único ORF para cada copia de *amtB* (**Figura VI.2**), se llevó a cabo una comparación de secuencia de ADN mediante el programa *on line* ClustalO (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo). Para este análisis se utilizó la secuencia aminoacídica de *B. diazoefficiens* USDA 110 que se encuentra entre las posiciones 652.211 y 653.513 (compuesta por 1533 nt que abarcan desde el inicio del ORF blr0607 hasta el final del ORF blr0608) y se comparó con los *amtB* de las cepas *B. japonicum* USDA 6 y *Bradyrhizobium* sp. BTAi1 (dichas cepas fueron elegidas arbitrariamente). A partir de estos alineamientos (ver **Anexo 1.1**) pudimos observar que la secuencia de ADN

del *amtB2* de *B. diazoefficiens* USDA 110 es prácticamente igual a las secuencias de ADN de una de las dos copias de *amtB* de las otras cepas evaluadas. Es decir, el gen *amtB2* de *B. diazoefficiens* posee un 92 % de identidad con la secuencia del ORF BJ6T_RS02820 de *B. japonicum* USDA 6 y un 82 % de identidad con el ORF BBta_0294 de *Bradyrhizobium* sp. BTAi1. Incluso, al analizar en detalle estas tres secuencias pudimos detectar que el *amtB2* de *B. diazoefficiens* USDA 110 posee la presencia de una citosina adicional en la posición 652.826 (15 aminoácidos antes que el inicio del ORF blr0608) que no se encuentra en las secuencias de las otras bacterias analizadas (ver **Anexo 1.1**). Estos resultados sugieren que, probablemente, en algún momento de la evolución haya ocurrido una inserción en esa ubicación del genoma de *B. diazoefficiens* USDA 110. Sin embargo, también es posible que la secuencia de estos ORFs que forman el *amtB2* se encuentre mal asignada en la base de datos.

Para analizar con mayor profundidad los transportadores de NH_4^+ de *B. diazoefficiens* USDA 110, alineamos y comparamos las secuencias proteicas del AmtB1 y AmtB2 (considerando para éste último desde el inicio del blr0607 al final del blr0608) encontrando que estos dos transportadores tienen sólo un 39 % de identidad, indicando una escasa similitud entre ellos (los alineamientos realizados se detallan en el **Anexo 1.3**). Sin embargo, al comparar estas secuencias con los transportadores de NH_4^+ de otros microorganismos encontramos porcentajes de identidad más elevados. Tanto el AmtB1 como el AmtB2 de *B. diazoefficiens* USDA 110 posee alrededor de 80-90 % de identidad al compararlo con otros miembros de la familia Bradyrhizobiaceae como *Bradyrhizobium japonicum* USDA 6, *Bradyrhizobium elkanii* o *Bradyrhizobium* sp. Incluso, mantienen un 70-80 % de identidad con los transportadores de *R. palustris*. Es importante resaltar, que las bacterias mencionadas también poseen duplicados los genes *glnK* y *amtB*.

Para completar el análisis bioinformático de los transportadores de NH_4^+ , se llevó a cabo un análisis de dominios de las secuencias proteicas de los AmtB de *B. diazoefficiens* USDA 110 (ver secuencias en **Anexo 1.2**) mediante el programa Pfam. Como se puede observar en la **Figura VI.3** la secuencia proteica de AmtB1 (510 aa) nos arrojó un dominio único y completo correspondiente a la familia de transportadores de NH_4^+ que se ubica entre los aminoácidos 64 y 508.

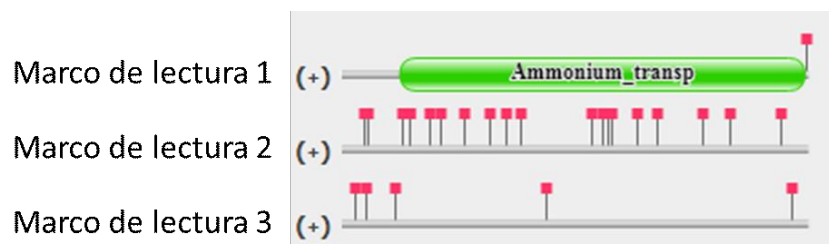


Figura VI.3 Análisis de dominios de la secuencia proteica del transportador de amonio AmtB1 (ORF blr0613). En verde se observa el dominio característico de los transportadores de NH₄⁺. Por su parte, los cuadrados en rojo indican la presencia de un codón de terminación. (+) representa la hebra codificante. El análisis se llevó a cabo utilizando el servidor *online* Pfam (<http://pfam.xfam.org/search/sequence>).

Por su parte, el análisis de las secuencias de AmtB2 resultó mucho más llamativo (**Figura VI.4**). En primer lugar, al analizar los dominios de los ORF blr0607 (338 aa) y blr0608 (223 aa) por separado encontramos que para cada uno de ellos fue posible predecir un dominio de transportador de NH₄⁺ incompleto. Incluso, para el ORF blr0607 la predicción se observa disociada en dos marcos de lectura de la hebra codificante (**Figura VI.4 - Panel A**). La predicción en el marco de lectura 1 abarca del residuo 38 al 205 y la segunda predicción en el marco de lectura 2 abarca del 205 al 336. Por el contrario, el análisis del ORF blr0608 muestra un dominio del transportador de NH₄⁺ trunco que abarca prácticamente toda la secuencia desde el residuo 1 al 220 (**Figura VI.4 - Panel B**).

Al analizar en detalle la fragmentación obtenida para el ORF blr0607, confirmamos que efectivamente ocurre debido a la presencia de la citosina adicional que mencionamos anteriormente. Incluso, si llevamos a cabo este análisis sobre la secuencia completa desde el inicio del ORF blr0607 al final del ORF 0608 se obtiene como resultado esta misma fragmentación (**Figura VI.4 - Panel C**). Sin embargo, si eliminamos esta citosina de la secuencia, la predicción de dominios nos arroja como resultado un dominio único y completo de la familia de los transportadores de NH₄⁺, como ocurría al analizar la secuencia del AmtB1 (**Figura VI.4 - Panel D**).

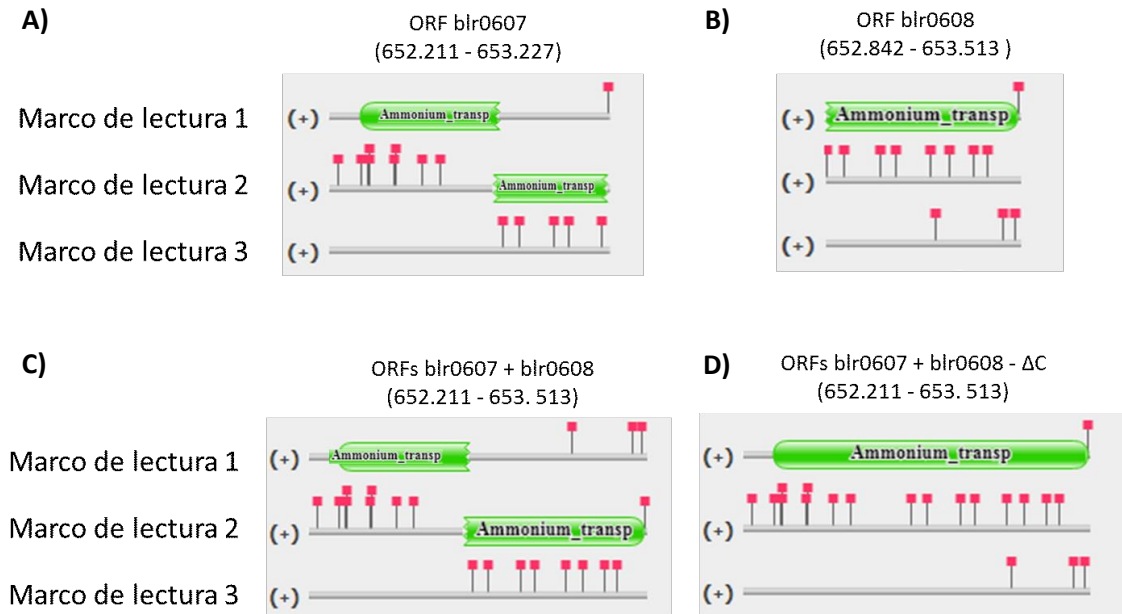


Figura VI.4 Análisis de dominios de la secuencia proteica del transportador de amonio AmtB2. **A)** Análisis del ORF blr0607. **B)** Análisis del ORF blr0608. **C)** Análisis de la secuencia obtenida de la unión de los ORFs blr0607 y blr0608. **D)** Se muestra el resultado que se obtiene de la unión de los ORFs blr0607 y blr0608 si se elimina la citosina (ΔC) adicional que posee *B. diazoefficiens* USDA 110. En verde se observan las regiones pertenecientes al dominio característico de los transportadores de NH_4^+ mientras que los cuadrados en rojo indican la presencia de un codón de terminación. (+) representa la hebra codificante. Los números entre paréntesis indican la ubicación en el genoma de *B. diazoefficiens* USDA 110 de la secuencia analizada. El análisis se llevó a cabo utilizando el servidor online Pfam (<http://pfam.xfam.org/search/sequence>).

Estos resultados tomados en conjunto nos llevan a pensar que esta copia del transportador de amonio AmtB2 podría estar mal asignada en la base de datos NCBI o puede haber sufrido una inserción en algún momento de la evolución que haya provocado un corrimiento del marco de lectura. De ser así, podría ocurrir que esa inserción afecte el plegamiento del AmtB2 y como consecuencia éste no pueda ser funcional. Sin embargo, en este trabajo de Tesis sólo llevaremos a cabo ensayos que involucran a los transportadores de NH_4^+ a nivel de ARN y no a nivel funcional, quedando como perspectiva realizar un análisis que nos permita dilucidar esta incógnita.

VI.2 Estudio de transcritos de las proteínas PII y de los transportadores AmtB

Una propiedad característica de *glnB* y *glnK* es su expresión diferencial. En *E. coli*, por ejemplo, *glnK* se expresa sólo en presencia de una fuente rica en N, mientras que *glnB* se expresa de manera constitutiva (van Heeswijk *et al.*, 1993; van Heeswijk *et al.*, 1996; Atkinson y Ninfa, 1998). En el caso del arquea *H. mediterranei* se ha descrito que, mientras que *glnB* se expresa constitutivamente, *glnK* únicamente lo hace cuando el medio de cultivo contiene nitrato y su expresión es inhibida por la presencia de NH_4^+ (Pedro-Roig *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta estos antecedentes nos propusimos evaluar la expresión de transcritos en *B. diazoefficiens* USDA 110. Como aclaramos en el **Capítulo III**, los problemas que nos condujeron a reformular nuestros medios de cultivo, comenzaron una vez que ya habíamos avanzado en gran medida en nuestro estudio de las proteínas de señalización PII. Debido a ello, en el presente capítulo describiremos la caracterización de estas proteínas principalmente en el medio de Evans sin modificaciones.

De esta manera, se cultivó la cepa salvaje en el medio de Evans durante 5 días y se obtuvo el ARN como se describe en el **Capítulo II.3.5**. Una vez obtenido el ADN complementario (ADNc) se amplificaron por RT-PCR fragmentos internos pertenecientes a los genes *glnB*, *glnK1*, *glnK2*, *amtB1* y *amtB2* utilizando los siguientes pares de cebadores: *glnB_RT_Fw/ glnB_RT_Rv*, *glnK1_RT_Fw/ glnK1_RT_Rv*, *glnK2_RT_Fw/ glnK2_RT_Rv*, *amtB1_RT_Fw/ amtB1_RT_Rv* y *amtB2_RT_Fw/ amtB2_RT_Rv* respectivamente (las secuencias de los cebadores se detallan en la **Tabla II.3.2** y las regiones amplificadas en la **Figura VI.5 – Panel A**). También se utilizó como control interno cebadores específicos para amplificar el gen *sigA* (*bll7349*) cuya transcripción ha sido propuesta como constitutiva (Hauser *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos muestran que en *B. diazoefficiens*, cultivada en medio Evans con una cantidad suficiente de NH_4^+ (20 mM de NH_4Cl), es posible detectar transcritos de *glnB*, *glnK1* y *glnK2* indicando que *glnB* y las dos copias de *glnK* no presentan una expresión diferencial (**Figura VI.5 – Panel B**). Estos datos se contradicen con lo observado en *H. mediterranei* donde 5 mM de NH_4Cl son suficientes para inhibir la expresión tanto de su *glnK1* como

de *glnK2* (Pedro-Roig *et al.*, 2013). Por su parte, también fue posible detectar en estas condiciones transcritos de *amtB1* y *amtB2* (en particular del ORF blr0607).

Una vez confirmada la expresión de las dos subfamilias de PII (*GlnB* y *GlnK*) y de los transportadores de NH_4^+ , nos propusimos evaluar la expresión de los genes *glnK-amtB* para determinar si efectivamente, como ocurre en la mayoría de los microorganismos estudiados, estos genes se expresan de manera conjunta en forma de operón (Thomas *et al.*, 2000a).

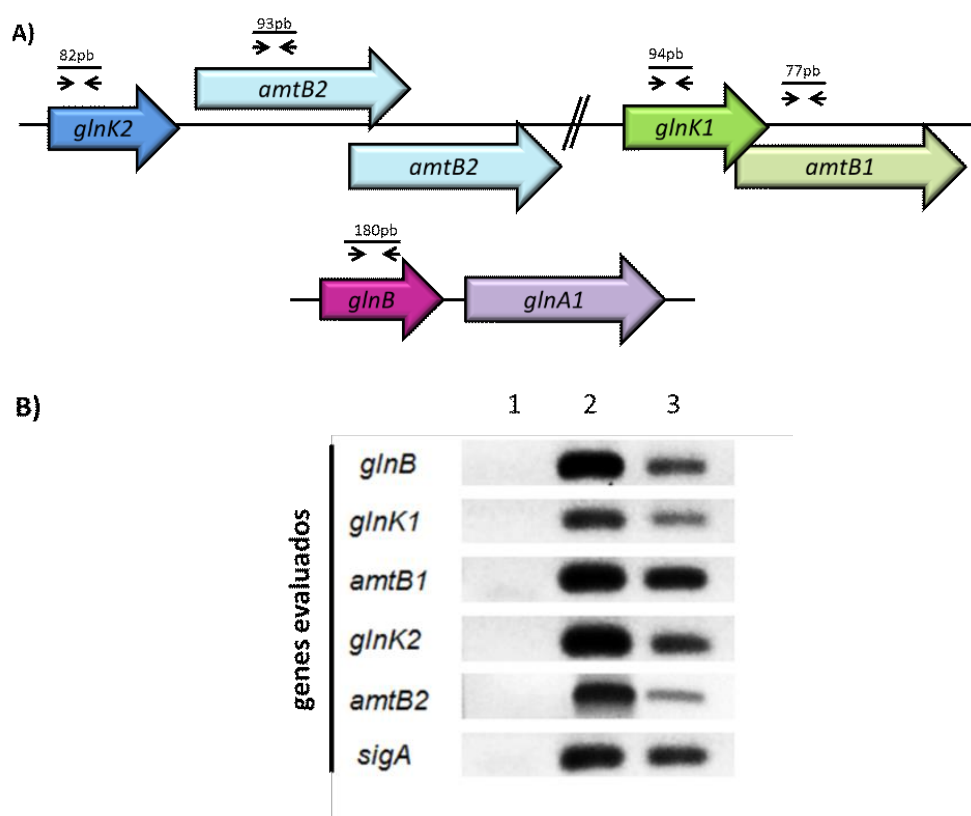


Figura VI.5 Análisis de expresión de transcritos de las proteínas PII y los transportadores de amonio AmtB. **A)** Esquema representativo de las regiones de hibridación de los pares de cebadores *glnB_RT_Fw/ glnB_RT_Rv*, *glnK1_RT_Fw/ glnK1_RT_Rv*, *glnK2_RT_Fw/ glnK2_RT_Rv*, *amtB1_RT_Fw/ amtB1_RT_Rv* y *amtB2_RT_Fw/ amtB2_RT_Rv* para la amplificación de fragmentos internos pertenecientes a los genes *glnB*, *glnK1*, *glnK2*, *amtB1* y *amtB2* respectivamente. Las secuencias de los cebadores se detallan en la **Tabla II.3.2**. **B)** Fragmentos obtenidos mediante la amplificación por RT-PCR correspondientes a los genes *glnB*, *glnK1*, *amtB1*, *glnK2*, *amtB2* y el control interno de expresión constitutiva *sigA* utilizando como molde ADN genómico (calle 2) y ADNc (calle 3) de la cepa salvaje *B. diazoefficiens* USDA 110. El ADNc fue obtenido a partir de un cultivo de 5 días en medio Evans (20mM de NH_4Cl). La calle 1 muestra el control negativo de las PCRs utilizando agua como molde.

Como mostramos al inicio de este capítulo, los pares *glnK-amtB* en *B. diazoefficiens* se encuentran en ORFs consecutivos (**Figura VI.1**): *glnK1* (ORF blr0612)-*amtB1* (ORF blr0613) y *glnK2* (ORF blr0606)-*amtB2* (ORF blr0607/blr0608). En particular, la secuencia de *glnK1* se superpone con la secuencia de *amtB1*, mientras que *glnK2* se encuentra río arriba de *amtB2* separado por una región intergénica de 72 bases.

Para comprobar la coexpresión de estos genes se utilizó como molde ADNc obtenido de la cepa salvaje cultivada en medio Evans durante 5 días como se describió previamente. Los cebadores utilizados hibridan sobre la región 3' del gen *glnK1* y sobre la región 5' del *amtB1* (*glnK1_RT_Fw/ amtB1_RT_Rv* - ver secuencia en **Tabla II.3.2**). En caso de que estos genes se encuentren formando parte de un operón como producto de PCR esperamos obtener un fragmento de 525pb (**Figura VI.6**).

Por su parte, para evaluar el par *glnK2-amtB2* se utilizaron dos pares de cebadores. El primer par utilizado hibrida sobre el extremo 3' de *glnK2* y sobre el extremo 5' del *amtB2* (*glnK1_RT_Fw/ amtB2_RT_Rv* - **Tabla II.3.2**). Debido a que el fragmento amplificado con este par de cebadores es relativamente largo para evaluar transcritos (931pb), decidimos confirmar el resultado utilizando un segundo par de cebadores. Dichos cebadores hibridan en la región intergénica del par *glnK2-amtB2* y en el extremo 5' del *amtB2* (*glnK2 3'Fw/ glnK2 3'Rv* - **Tabla II.3.1**) (**Figura VI.6 – Panel A**) dando como resultado, en caso de observar expresión conjunta, un fragmento de 493 pb.

En la **Figura VI.6 – Panel B** se muestran los resultados obtenidos donde podemos observar que el par *glnK1-amtB1* se expresa como un operón como ocurre en la mayoría de los microorganismos estudiados. Sin embargo, no fue posible detectar la presencia de transcripto cuando se utilizaron los pares de cebadores para *glnK2* y *amtB2*, por lo que este resultado nos sugiere que *glnK2* y *amtB2* se expresarían de manera independiente en la condición evaluada.

Hasta el momento, esta expresión diferencial únicamente se había descrito en *Methanococcus jannaschii* (Thomas *et al.*, 2000a), un archa que también posee en su genoma dos copias del par *glnK-amtB*, uno de los cuales se expresa formando parte de un operón (ORF MJ1344/ORF MJ1343) y el otro se expresa de manera divergente (ORF MJ0058/ORF MJ0059) (Thomas *et al.*, 2000a).

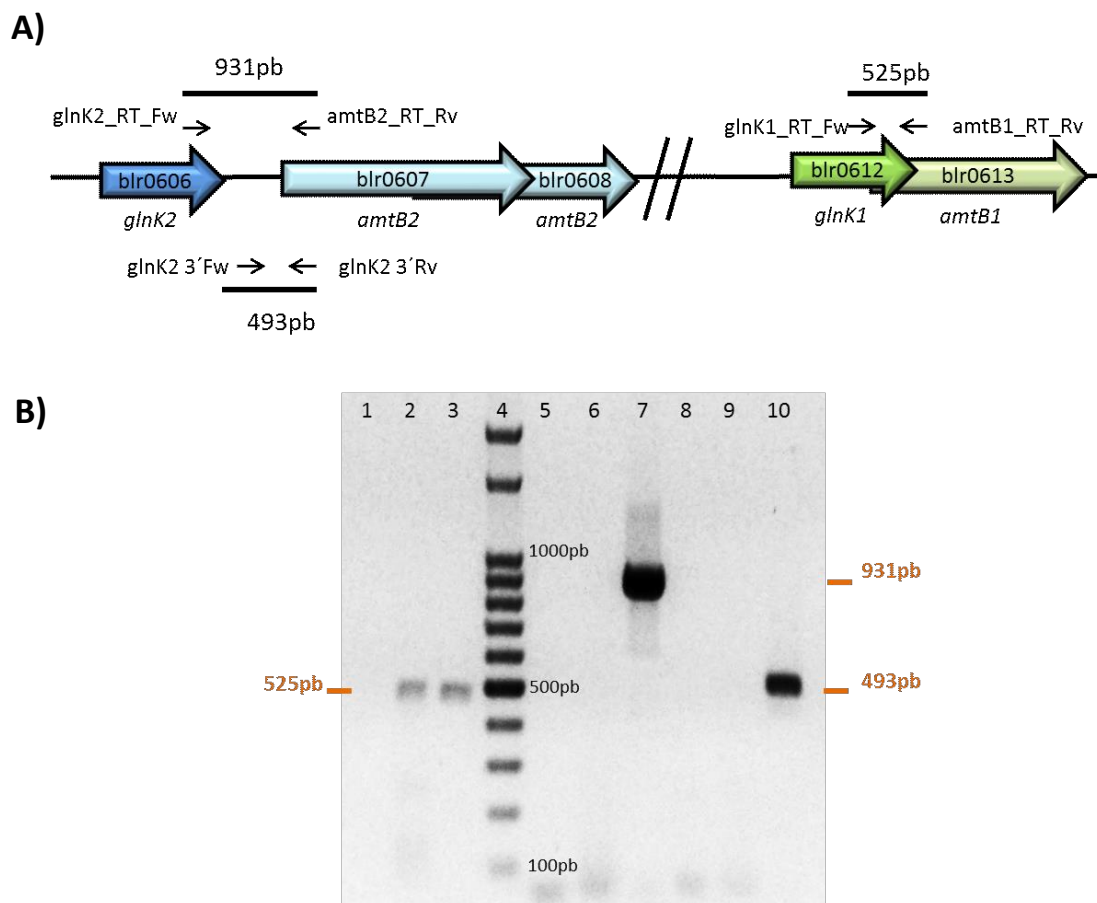


Figura VI.6 Análisis de coexpresión de los genes *glnK-amtB*. **A)** Esquema de la región genómica *glnK1-amtB1* y *glnK2-amtB2* y del sitio de hibridación de los cebadores utilizados para llevar a cabo el análisis de coexpresión. **B)** Expresión de los pares génicos *glnK-amtB* mediante RT-PCR. Las calles 1, 2 y 3 corresponden a la PCR realizada utilizando los cebadores *glnK1_RT_Fw/amtB1_RT_Rv*; las calles 5, 6 y 7 el par *glnK2_RT_Fw/amtB2_RT_Rv*; y las calles 8, 9 y 10 el par *glnK2 3'Fw/glnK2 3'Rv*. Para todos los pares de cebadores los moldes utilizados fueron agua como control negativo de la PCR (calles 1, 5 y 8), ADNc de *B. diazoefficiens* USDA 110 (calles 2, 6 y 9) y ADN genómico de *B. diazoefficiens* USDA 110 como control positivo (calles 3, 7 y 10).

VI.3 Construcción de cepas mutantes en los genes *glnB*, *glnK1* y *glnK2*

Con el objetivo de intentar dilucidar la función de cada una de las copias de las proteínas PII que encontramos en *B. diazoefficiens*, decidimos generar cepas mutantes de cada uno de los genes *glnB*, *glnK1* o *glnK2* y un doble mutante en *glnK1* y *glnK2* y caracterizarlos fenotípicamente.

Para la construcción de todos los mutantes se eligió nuevamente la estrategia de doble recombinación homóloga descrita por Sukdeo y Charles (2003) (ver estrategia general

en **Capítulo II.3.12**) que permite deletar el gen de interés sin provocar cambios en el marco de lectura, lo que nos permite evaluar el fenotipo específico del gen deletado sin afectar la expresión de aquellos genes que se encuentren en operón con nuestro gen de interés.

La estrategia de clonado utilizada para llevar a cabo la delección del gen *glnB* (blr4948) se muestra en la **Figura VI.7 - Panel A**. Brevemente, utilizando los cebadores *glnB* 5'Fw/*glnB* 5'Rv (ver secuencias en **Tabla II.3.1.**) amplificamos un fragmento de 444 pb río arriba del gen *glnB* (**PCR1**) y utilizamos el par de cebadores *glnB* 3'Fw/*glnB* 3'Rv (ver secuencias en **Tabla II.3.1.**) para amplificar 392 pb río abajo (**PCR2**) (**Figura VI.7 - gel a**). Una vez obtenidos los productos de las PCR1 y PCR2, los mismos se utilizaron como ADN molde en iguales cantidades para llevar a cabo la tercer PCR (**PCR3**) utilizando la combinación de cebadores *glnB* 5'Fw/*glnB* 3'Rv y la enzima Pfu ADN polimerasa para obtener un producto de extremos romos de 815 pb (**Figura VI.7 - gel b**). Finalmente, dicho fragmento se clonó en el vector pK18mobSacB (Schafer *et al.*, 1994), que previamente había sido digerido con la enzima de restricción *SmaI* (**Figura VI.7 - gel c**). Una vez obtenida la construcción, la misma se chequeó por digestión con la enzima *EcoRI* donde efectivamente se observó la liberación de un fragmento de 540 pb (**Figura VI.7 - gel d**) y finalmente se secuenció corroborando que el plásmido obtenido poseía el fragmento deseado. La construcción obtenida se denominó pFL4948.

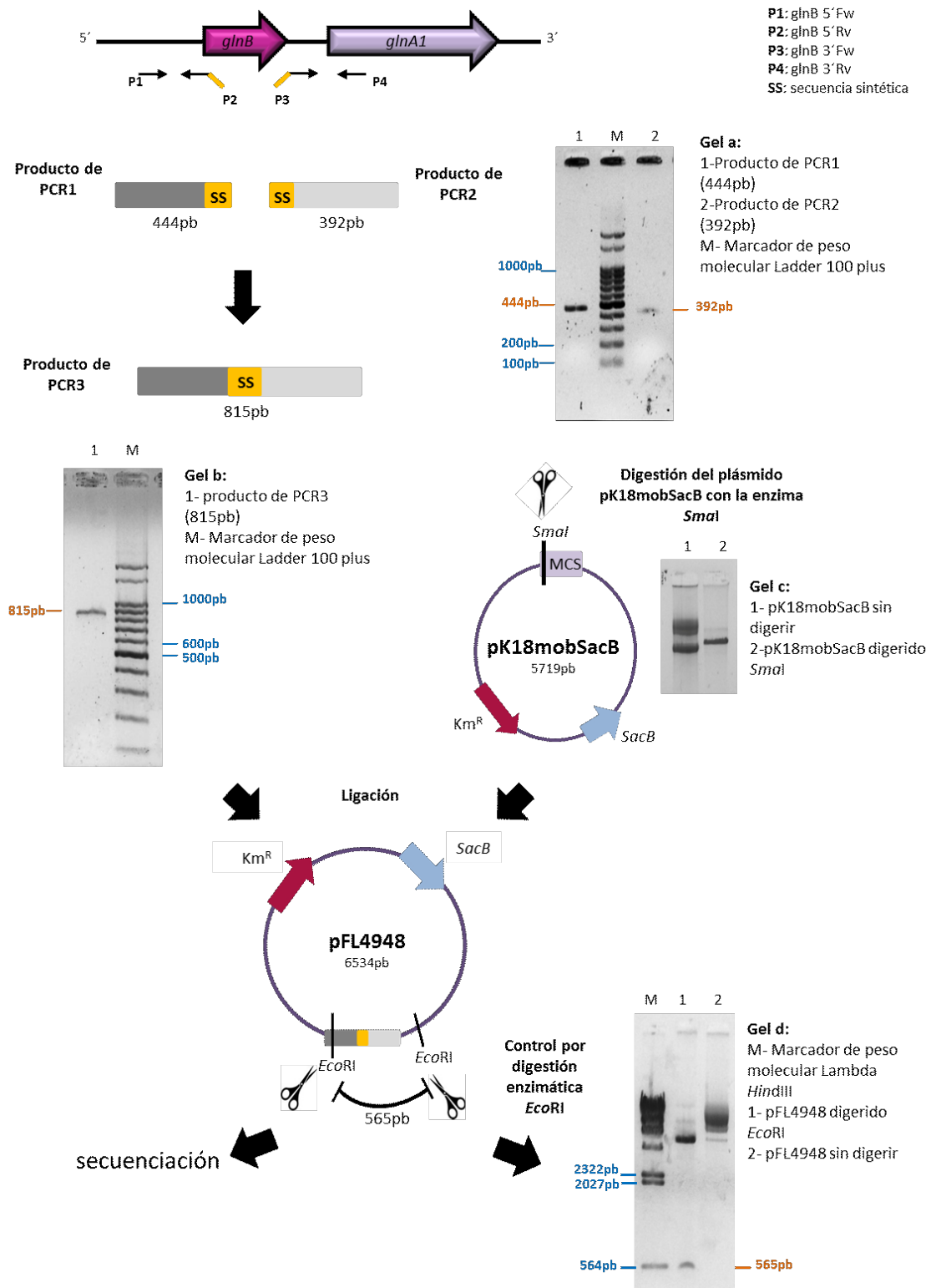


Figura VI.7 Esquema de la estrategia de clonado utilizada para la construcción del vector pFL4948 empleado para realizar la delección de *glnB* (blr4948) en *B. diazoefficiens* USDA 110 y chequeo de la construcción obtenida. A los lados de los geles se indican los pesos moleculares de los fragmentos de interés (naranja) y del marcador de peso molecular (celeste).

Una vez obtenida y secuenciada la construcción pFL4948 (conteniendo el gen *glnB* truncado), la misma se introdujo mediante transformación en una cepa electrocompetente *E. coli* S17-1 (Simon *et al.*, 1983) y finalmente se movilizó a *B. diazoefficiens* USDA 110 mediante una conjugación biparental. En primer lugar, se seleccionaron los transconjugantes Km^r y se realizó la segunda selección en YEM-sacarosa 10% (con el objetivo de inducir la segunda recombinación homóloga). De las colonias capaces de crecer en YEM-sacarosa 10% se seleccionaron aquellas Km^s-Cm^r y se corroboró la delección de nuestro gen de interés mediante una PCR con cebadores externos a los sitios de recombinación: Check_ *glnB*_Fw/ Check_ *glnB*_Rv (**Figura VI.8**).

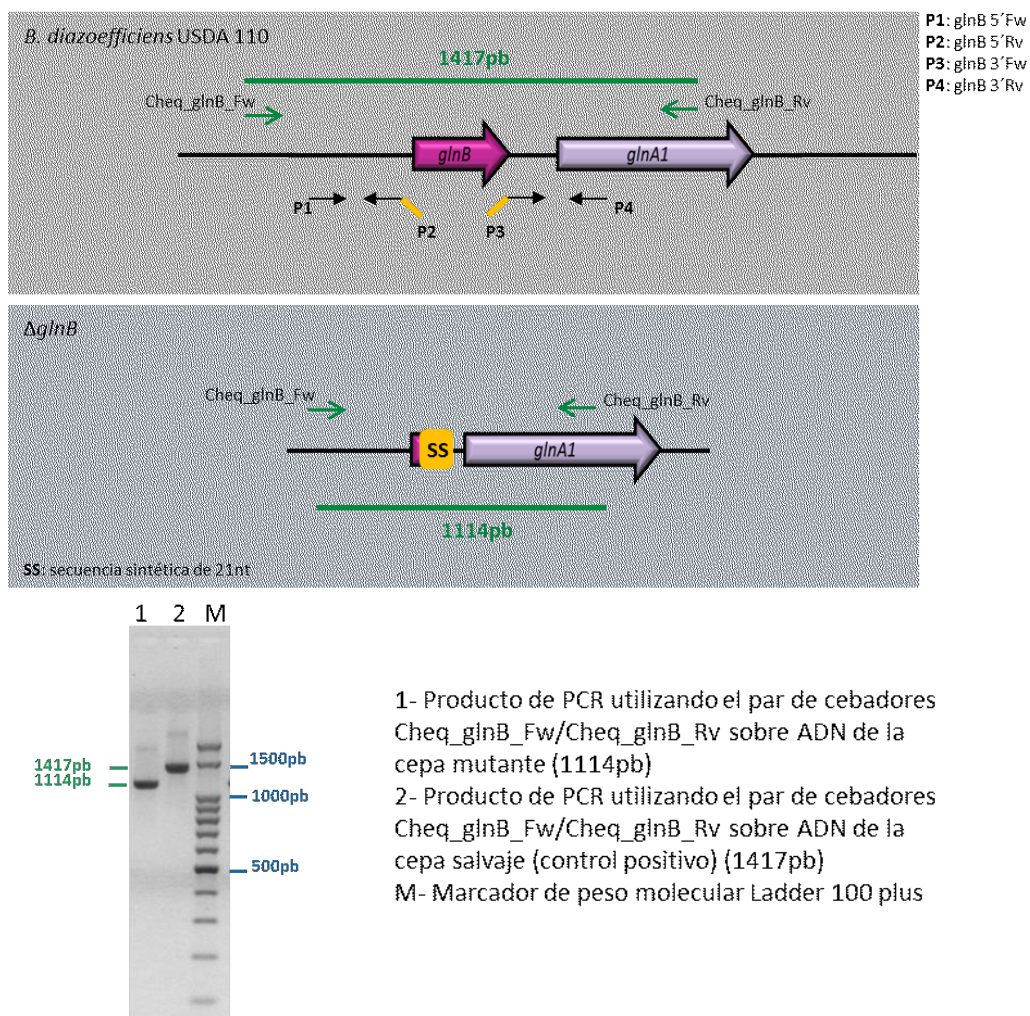


Figura VI.8 Mapa esquemático del gen *glnB* (blr4948) en la cepa salvaje y en la cepa mutante, y confirmación mediante PCR de la obtención del mutante Δ *glnB*. En la parte superior de la imagen se observa un esquema del sitio de hibridación de los cebadores Cheq_ *glnB*_Fw/ Cheq_ *glnB*_Rv en la cepa salvaje *B. diazoefficiens* USDA 110 (recuadro gris) y en la cepa mutante en *glnB* (recuadro celeste). En la parte inferior se observa la amplificación que confirma la obtención de la cepa mutante mediante PCR con los cebadores mencionados anteriormente. También se incluye como control la amplificación obtenida para la cepa salvaje. A los lados del gel se indican los pesos moleculares de los fragmentos de interés (verde) y del marcador de peso molecular (celeste).

Para los mutantes delecionales en *glnK1* (blr0612) y en *glnK2* (blr0606) se utilizó la misma estrategia descrita que para el mutante $\Delta glnB$ con algunas modificaciones.

En primer lugar, se amplificó la región río arriba del gen *glnK1* (**PCR1**) utilizando los cebadores *glnK1* 5'Fw/ *glnK1* 5'Rv y se obtuvo un producto de 393 pb. La región río abajo (**PCR2**) del mismo gen se amplificó con los cebadores *glnK1* 3'Fw/ *glnK1* 3'Rv y el fragmento obtenido fue de 368 pb (**Figura VI.9 - gel a**). El par *glnK1* 5'Fw y *glnK1* 3'Rv fue utilizado para llevar a cabo la **PCR3** obteniéndose un fragmento de amplificación de 761 pb (**Figura VI.9 - gel b**). Este último fragmento se digirió con las enzimas de restricción *PstI* y *SphI*, y luego se ligó con el vector pK18mobSacB digerido con las mismas enzimas (**Figura VI.9 - gel c**). La construcción obtenida se confirmó en primer lugar mediante una digestión con la enzima *BamHI* donde se pudo observar la liberación de un fragmento de 392 pb (**Figura VI.9 - gel d**), y posteriormente se secuenció corroborándose la obtención del plásmido con el fragmento *glnK1* truncado que se denominó pFL0612.

Para la construcción del vector que dio origen al mutante en *glnK2* se utilizaron los cebadores *glnK2* 5'Fw/ *glnK2* 5'Rv para la **PCR1** (obteniendo un producto de 376 pb) y los cebadores *glnK2* 3'Fw/ *glnK2* 3'Rv para la **PCR2** (obteniendo un producto de 525 pb) (**Figura VI.10 - gel a**). Luego, utilizando como molde los fragmentos obtenidos se llevó a cabo la **PCR3** con la combinación de cebadores *glnK2* 5'Fw/ *glnK2* 3'Rv generando un fragmento de 892 pb (**Figura VI.10 - gel b**). El producto resultante de la PCR3 y el plásmido pK18mobSacB se digirieron con las enzimas de restricción *HindIII* y *PstI* (**Figura VI.10 - gel c**) y posteriormente se llevó a cabo la ligación. La construcción obtenida se confirmó por digestión enzimática utilizando *SmaI* donde se observó la liberación de un fragmento 362 pb, y con *BamHI* donde se liberó un fragmento de 385 pb (**Figura VI.10 - gel d**). La obtención del plásmido conteniendo el gen *glnK2* truncado se confirmó por secuenciación y se denominó pFL0606.

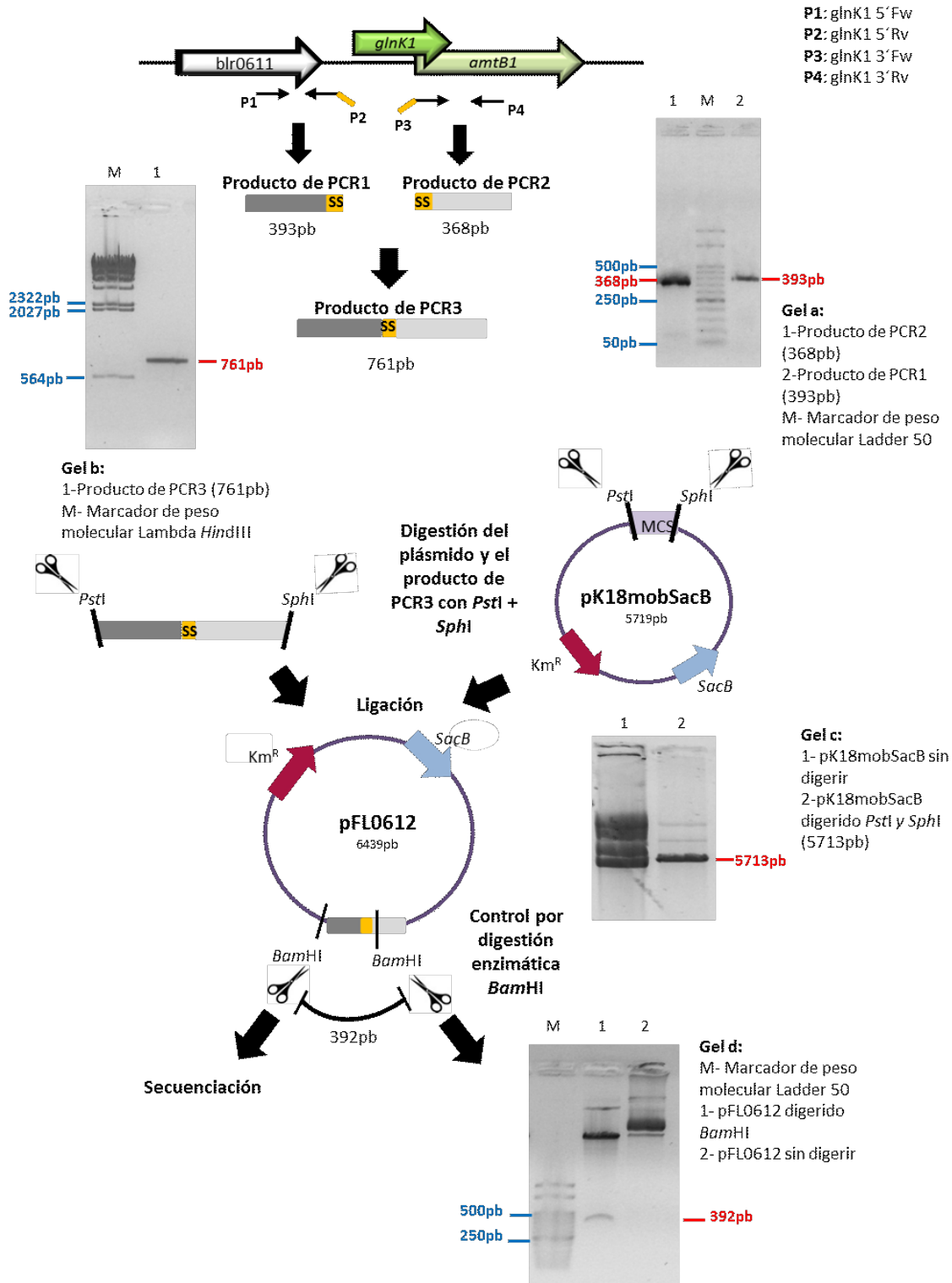


Figura VI.9 Esquema general de la estrategia de clonado utilizada para la construcción del vector pFL0612 empleado para realizar la delección de *glnK1* (*blr0612*) en *B. diazoefficiens* USDA 110 y chequeo de la construcción obtenida. A los lados de los gels se indican los pesos moleculares de los fragmentos de interés (verde) y del marcador de peso molecular (rojo).

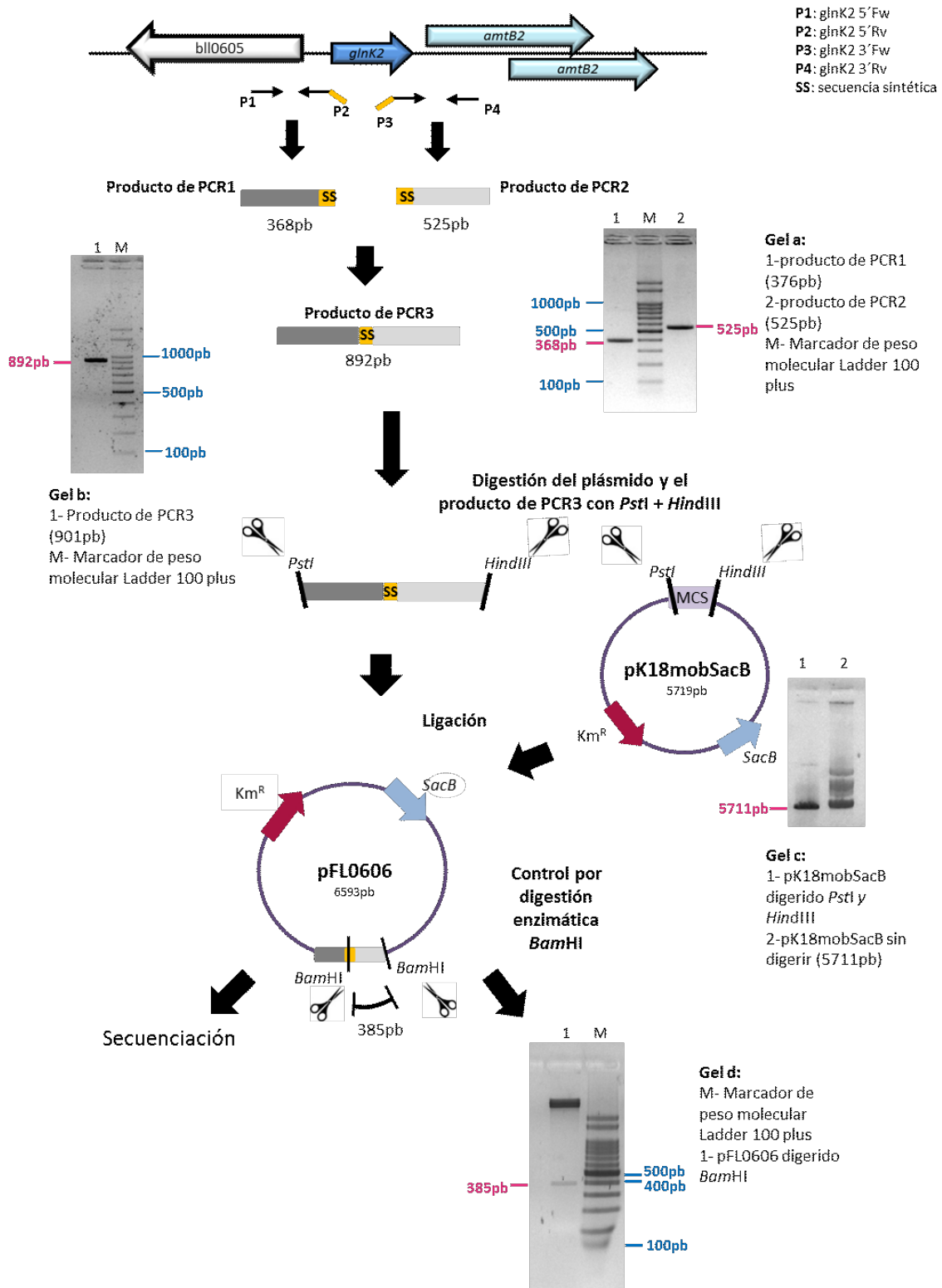


Figura VI.10 Estrategia de clonado para la construcción del vector pFLO606 empleado para realizar la delección de *glnK2* (*blr0606*) en *B. diazoefficiens* USDA 110 y chequeo de la construcción obtenida. A los lados de los geles se indican los pesos moleculares de los fragmentos de interés (rosa) y del marcador de peso molecular (celeste).

Una vez obtenidas y corroboradas por secuenciación las construcciones pFL0612 (conteniendo el gen *glnK1* truncado) y pFL0606 (conteniendo el gen *glnK2* truncado), las mismas se introdujeron en la cepa *E. coli* S17-1 y se movilizaron a *B. diazoefficiens* USDA 110 mediante una conjugación biparental. La selección de los mutantes se llevó a cabo como se describió anteriormente para el mutante $\Delta glnB$. La delección de los genes de interés se confirmó mediante una PCR con cebadores externos a los sitios de recombinación: Check_glnK1_Fw/ Check_glnK1_Rv (**Figura VI.11**), y Check_glnK2_Fw/ Check_glnK2_Rv (**Figura VI.12- Panel B**).

Para la construcción del doble mutante $\Delta glnK1\Delta glnK2$ se utilizó la cepa de *E. coli* S17-1 que contiene el plásmido pFL0606 y se llevó a cabo una conjugación biparental con la cepa mutante $\Delta glnK1$. El procedimiento para la obtención y chequeo de la cepa mutante doble se realizó de la misma manera descrita previamente para obtener la cepa mutante $\Delta glnK2$ (**Figura VI.12- Panel C**).

Una vez obtenidos los clones mutantes, se secuenciaron y se utilizaron para realizar los ensayos de caracterización que se describen en este capítulo.

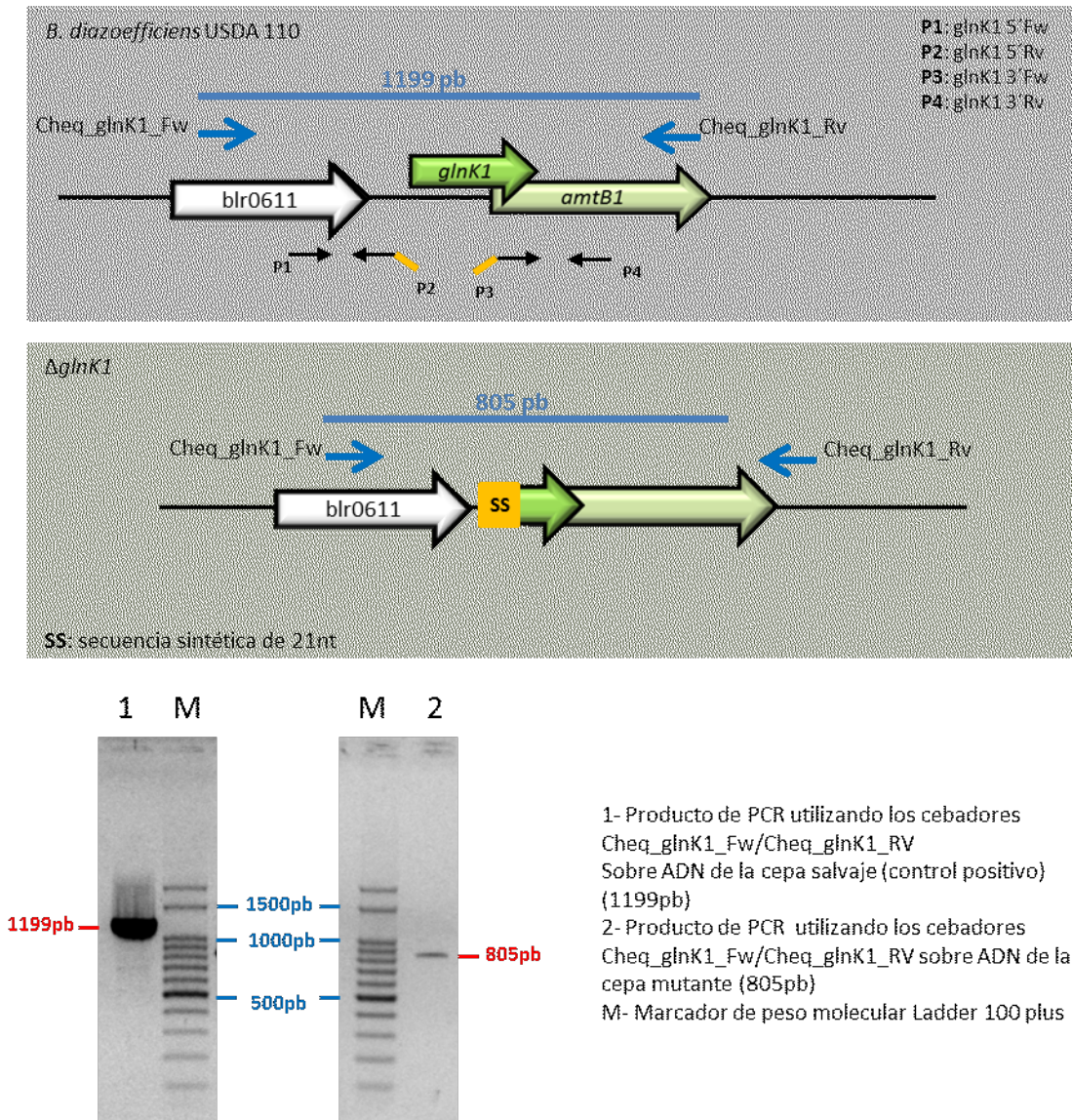


Figura VI.11 Mapa esquemático del gen *glnK1* (blr 0612) en la cepa salvaje y en la mutante, y confirmación mediante PCR de la obtención del mutante Δ *glnK1*. En la parte superior de la imagen se observa un esquema del sitio de hibridación de los cebadores Cheq_glnK1_Fw/ Cheq_glnK1_RV en la cepa salvaje *B. diazoefficiens* USDA 110 (recuadro gris) y en la cepa mutante en *glnK1* (recuadro verde). En la parte inferior se observa la amplificación que confirma la obtención de la de la cepa mutante mediante PCR en comparación con el genotipo de la cepa salvaje utilizando los cebadores Cheq_glnK1_Fw/ Cheq_glnK1_RV. A los lados de los geles se indican los pesos moleculares de los fragmentos de interés (rojo) y del marcador de peso molecular (celeste).

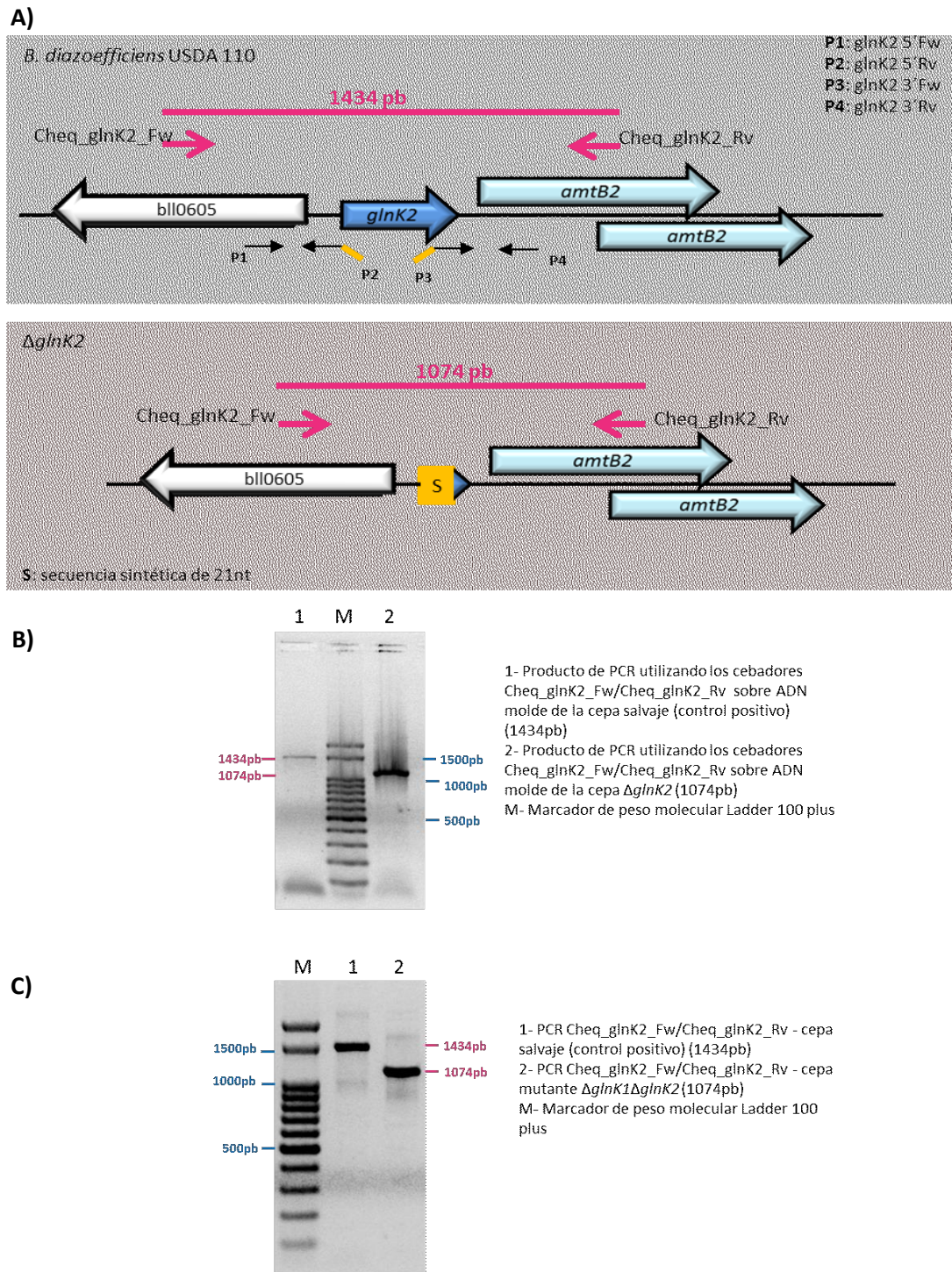


Figura VI.12 Mapa esquemático del gen *glnK2* (blr0606) y confirmación mediante PCR de la obtención del mutante Δ *glnK2* y del doble mutante Δ *glnK1* Δ *glnK2*. **A)** Esquema del sitio de hibridación de los cebadores Cheq_glnK2_Fw/ Cheq_glnK2_RV en la cepa salvaje *B. diazoefficiens* USDA 110 (recuadro gris) y en la cepa mutante en *glnK2* (recuadro rosa). **B)** Amplificación que confirma la obtención de la cepa mutante Δ *glnK2* mediante PCR en comparación con el genotipo de la cepa salvaje utilizando los cebadores Cheq_glnK2_Fw/ Cheq_glnK2_RV. **C)** Confirmación de la obtención del mutante Δ *glnK1* Δ *glnK2* con el par de cebadores Cheq_glnK2_Fw/ Cheq_glnK2_RV. A los lados de los gels se indican los pesos moleculares de los fragmentos de interés (rosa) y del marcador de peso molecular (celeste).

Como hemos mencionado en el **Capítulo I**, las proteínas PII son modificadas postranscripcionalmente por el regulador maestro GlnD, el cual responde a los niveles de glutamina intracelular. En rizobios, como *E. meliloti*, se ha descrito que esta proteína GlnD es de suma importancia no sólo para la regulación del metabolismo del N en la bacteria, sino para una amplia variedad de procesos tales como adaptación a estreses, quimiotaxis y movilidad, transporte y metabolismo de metales, metabolismo del C, entre otros (Yurgel *et al.*, 2013). Dada la relevancia que este regulador maestro ha demostrado poseer en otros microorganismos, emprendimos de manera simultánea a la obtención de las cepas mutantes en las proteínas PII, la búsqueda de un mutante delecional en el gen *glnD* (ORF bll0916), que codifica para GlnD en *B. diazoefficiens* USDA 110.

Desafortunadamente, y debido a que la deleción de este gen probablemente sea letal para la bacteria como se ha descrito en otros microorganismos (Colnaghi *et al.*, 2001; Rudnick *et al.*, 2001), no fue posible obtener la cepa mutante en esta proteína. Los pasos detallados de la obtención de la construcción necesaria para llevar a cabo la doble recombinación homóloga y los inconvenientes encontrados en dicho proceso se detallan en el **Anexo 2**.

VI.4 Caracterización fenotípica de las cepas mutantes en PII

VI.4.1 Rol de las proteínas PII en el crecimiento bacteriano

Para comenzar nuestros estudios fenotípicos decidimos caracterizar las cinéticas de crecimiento de las cepas mutantes $\Delta glnB$, $\Delta glnK1$, $\Delta glnK2$ y $\Delta glnK1\Delta glnK2$. En primer lugar, evaluamos el crecimiento en el medio de Evans que, como hemos descrito anteriormente, posee cantidades balanceadas de N y de C. Además, considerando que las proteínas PII son las principales proteínas de señalización dentro de la cascada de respuesta al estrés por N, decidimos también evaluar el comportamiento de las cepas mutantes en un medio con limitación de dicho nutriente. Para ello utilizamos el medio Evans Bajo N que describimos anteriormente en el **Capítulo III**. En este punto es importante señalar nuevamente que nuestros estudios sobre las proteínas PII comenzaron antes de emprender la búsqueda de las formulaciones descritas en el

Capítulo III, razón por la cual evaluamos el comportamiento de las cepas mutantes en el medio Evans Bajo N, que posee una limitación extrema de NH_4^+ , y no en el medio Evans NH_4^+ donde la limitación es menos severa.

Así, se cultivaron las cuatro cepas mutantes y la cepa parental *B. diazoefficiens* USDA 110 en los dos medios mencionados: Evans y Evans Bajo N. Estos cultivos se mantuvieron a 28°C y a 180 rpm y diariamente se determinó su biomasa total por la medida de la densidad óptica a 500 nm (DO_{500}) y el número de células viables por recuento en placa de las unidades formadoras de colonias ($\text{UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$). En la **Figura VI.13 - Panel A y B** se puede observar que sólo la ausencia del gen *glnB* afecta el crecimiento de la bacteria cuando la misma se cultiva en medio Evans balanceado. En particular, en este medio, la cepa mutante ΔglnB muestra una marcada disminución de la velocidad de crecimiento, aunque, finalmente, es capaz de alcanzar una biomasa final equivalente a la alcanzada por la cepa salvaje.

Llamativamente, al evaluar el crecimiento en el medio Evans Bajo N (**Figura VI.13 – Paneles C y D**), donde la función de cualquiera de estas proteínas PII debería ser fundamental para la bacteria, no se observaron diferencias significativas con respecto a la cepa salvaje en ninguna de las cepas mutantes en *glnK*. Sin embargo, nuevamente la falta de *glnB* genera una diferencia en el crecimiento en relación a la cepa salvaje, aunque mucho menos marcada que la observada en el medio Evans. En este caso, la mutante ΔglnB muestra una menor biomasa en relación a *B. diazoefficiens* USDA 110 en cada uno de los puntos medidos hasta el día 9 donde alcanza valores similares a la cepa salvaje (**Figura VI.13 – Paneles C y D**).

Esta característica de la cepa ΔglnB observada tanto en medio de Evans como en Evans Bajo N nos conduce a pensar que la función que lleva a cabo la proteína GlnB podría ser sustituida finalmente por alguna de las otras proteínas PII que encontramos en *B. diazoefficiens*.

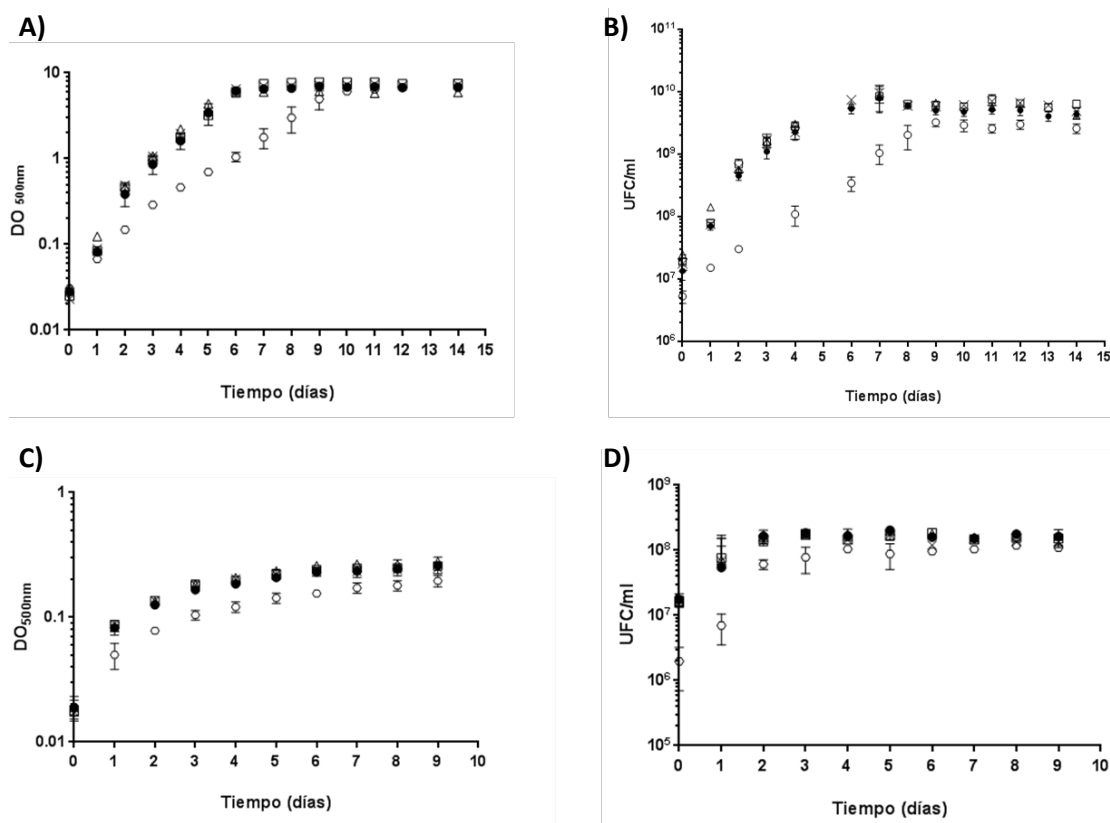


Figura VI.13 Cinéticas de crecimiento de las cepas mutantes (○) $\Delta glnB$, (△) $\Delta glnK1$, (□) $\Delta glnK2$, (x) $\Delta glnK1\Delta glnK2$ en comparación con la cepa parental USDA 110 (●) en los medios Evans (**A y B**) y Evans Bajo N (**C y D**). Las cepas se cultivaron a 28°C con agitación a 180 rpm durante 9 días. En los **Paneles A y C** se muestra la biomasa estimada por densidad óptica (DO_{500nm}) y en los **Paneles B y D** la estimación de células viables por recuento en placa de las unidades formadoras de colonias por ml de cultivo (UFC.ml⁻¹). Los datos corresponden al promedio y la desviación estándar de dos réplicas biológicas independientes. La ausencia de barras de error indica que la desviación fue menor que el tamaño del símbolo utilizado. Para una mejor visualización de los resultados el eje Y se presenta en escala logarítmica.

A partir de los datos obtenidos de DO₅₀₀ en las curvas de crecimiento se realizó el cálculo de la velocidad específica de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación de las bacterias (g) (**Tabla VI.1**).

Cuando evaluamos el crecimiento en medio Evans, solamente $\Delta glnB$ presentó diferencias significativas en la velocidad de crecimiento obteniéndose una μ de 0,0243 horas⁻¹ con respecto a la cepa parental que presentó una μ de 0,0370 horas⁻¹. De igual manera, pudo evidenciarse que sólo $\Delta glnB$ aumentó significativamente el tiempo de duplicación (g=28.59 hs) en relación al tiempo de duplicación de la cepa salvaje (g=18,69 hs) y al de las restantes cepas mutantes (**Tabla VI.1**).

Tabla VI.1 Velocidad de crecimiento μ (horas⁻¹) y tiempo de duplicación g (horas) de la cepa salvaje *B. diazoefficiens* USDA 110 y las cepas mutantes $\Delta glnB$, $\Delta glnK1$, $\Delta glnK2$ y $\Delta glnK1\Delta glnK2$ cultivadas en medio de Evans y Evans Bajo N. Los valores fueron calculados a partir de los datos obtenidos para las cinéticas de crecimiento (DO_{500nm}) que se muestran en la **Figura VI.13** y representan el promedio y la desviación estándar de los resultados de dos ensayos biológicos independientes.

	Velocidad de crecimiento (horas ⁻¹)		Tiempo de duplicación (horas)	
	Evans	Evans Bajo N	Evans	Evans Bajo N
USDA 110	0,0370 ± 0,0014	0,0146 ± 0,0004	18,77 ± 0,70	47,60 ± 1,16
$\Delta glnB$	0,0243 ± 0,0010	0,0137 ± 0,0007	28,59 ± 1,22	50,60 ± 2,75
$\Delta glnK1$	0,0362 ± 0,0005	0,0164 ± 0,0022	19,13 ± 0,26	42,72 ± 5,79
$\Delta glnK2$	0,0360 ± 0,0001	0,0150 ± 0,0003	19,25 ± 0,08	46,13 ± 1,02
$\Delta glnK1\Delta glnK2$	0,0369 ± 0,0006	0,0167 ± 0,0014	18,80 ± 0,30	41,71 ± 3,46

Por otra parte, cuando las bacterias fueron cultivadas en medio Evans Bajo N, a pesar que en los gráficos de DO y UFC.ml⁻¹ sólo se observan diferencias para la cepa $\Delta glnB$ (**Figura VI.13**), ninguna de las cepas mutantes simples mostró diferencias significativas en la velocidad de crecimiento con respecto a la obtenida para la cepa salvaje (**Tabla VI.1**). En cambio, la doble delección de $glnK1$ y $glnK2$ condujo a un leve, pero significativo aumento de la velocidad de crecimiento. Debido a esto, cuando calculamos el tiempo de duplicación (g), observamos que la doble mutante $\Delta glnK1\Delta glnK2$ mostró un tiempo de duplicación menor ($g= 41,71$ horas) que la cepa salvaje ($g=47,60$ horas) (**Tabla VI.1**). En este punto queremos destacar que los valores de μ y de g fueron calculados a partir de los valores de DO_{500nm} , lo que puede tener alguna diferencia con la cinética obtenida a partir de los recuentos de viables.

Estos resultados en conjunto indican que todas las proteínas PII de *B. diazoefficiens* son importantes tanto en presencia de cantidades suficientes como en cantidades limitantes de NH_4^+ . Además, los datos indican que GlnB es de suma importancia para la asimilación de NH_4^+ en condiciones no limitadas en dicho nutriente.

Teniendo en cuenta que el glutamato es una fuente pobre en N donde la velocidad de crecimiento de las bacterias como la biomasa total alcanzada se ven disminuidas en medios que lo poseen, decidimos caracterizar el crecimiento de las cepas mutantes

obtenidas en este trabajo en el medio Evans Glutamato formulado anteriormente (Ver composición en el **Capítulo III**). En la **Figura VI.14 – Panel A** se puede observar que en este medio ninguna de las cepas mutantes pareciera presentar diferencias significativas con respecto a la cepa salvaje, ni en la velocidad de crecimiento ni en la biomasa final alcanzada (DO_{500nm}). Sin embargo, al analizar la **Figura VI.14 – Panel B** se observa que durante los primeros 3 días de crecimiento, la mutante $\Delta glnB$ posee un recuento menor de bacterias viables que el resto de las cepas evaluadas, indicando nuevamente que el rol de GlnB es de gran importancia para la detección inicial de las cantidades de N y C intracelulares y la regulación del metabolismo del N.

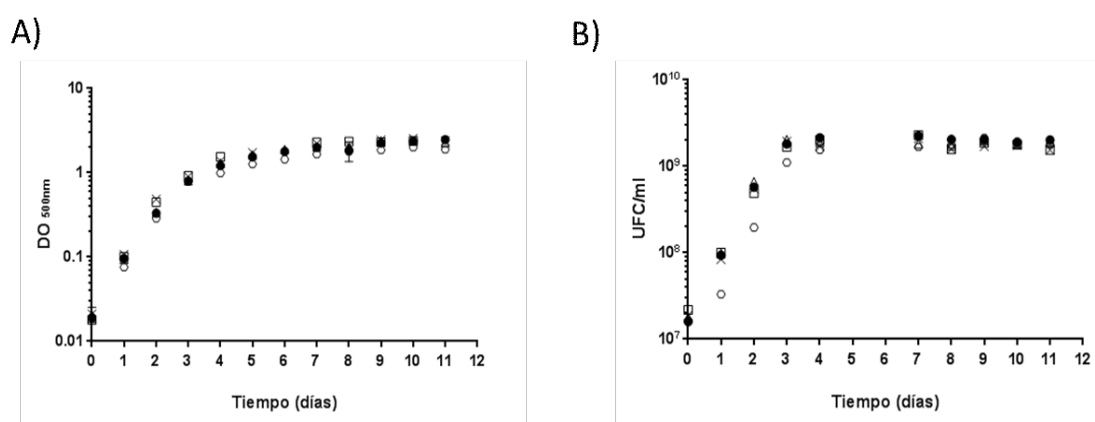


Figura VI.14 Cinéticas de crecimiento de las cepas mutantes (○) $\Delta glnB$, (△) $\Delta glnK1$, (□) $\Delta glnK2$, (x) $\Delta glnK1\Delta glnK2$ en comparación con la cepa parental USDA 110 (●) en el medio Evans Glutamato. Las bacterias se cultivaron a 28°C con agitación a 180 rpm. En el **Panel A** se muestra la biomasa estimada por densidad óptica (DO_{500nm}) y en el **Panel B** la estimación de células viables por recuento en placa de las unidades formadoras de colonias por ml de cultivo (UFC.ml⁻¹). Los datos corresponden al promedio y la desviación estándar de dos réplicas biológicas independientes. La ausencia de barras de error indica que la desviación fue menor que el tamaño del símbolo utilizado. Para una mejor visualización de los resultados el eje Y se presenta en escala logarítmica.

No obstante, cuando calculamos los parámetros g y μ a partir de los valores de DO_{500nm} , determinamos que la mutante $\Delta glnB$ presentó un leve aumento de la velocidad de crecimiento y una consecuente disminución de su tiempo de duplicación con respecto a la cepa salvaje (**Tabla VI.2**). La diferencia observada entre las medidas de Absorbancia y el recuento de viables, puede ser debida a que en esta condición de cultivo las bacterias crecen pocas generaciones lo que puede traer aparejados errores en el cálculo de los parámetros cinéticos. Otra posible explicación de esta diferencia, es que notamos que en los recuentos de bacterias viables de la cepa $\Delta glnB$ durante los

primeros días de crecimiento, se observan dos morfotipos de colonias de diferente tamaño, lo que puede dar un leve aumento de la DO. Cabe aclarar que estas colonias corresponden a la cepa mutante, ya que todas fueron chequeadas por PCR.

Teniendo en cuenta los fenotipos observados mediante la determinación de las cinéticas de crecimiento en los distintos medios y sobretodo la marcada diferencia observada en el crecimiento de la cepa $\Delta glnB$ en relación a la salvaje en el medio Evans, decidimos seleccionar este medio para continuar con el resto de los ensayos de caracterización.

Tabla VI.2 Velocidad de crecimiento μ (horas⁻¹) y tiempo de duplicación g (horas) de la cepa salvaje *B. diazoefficiens* USDA 110 y las cepas mutantes $\Delta glnB$, $\Delta glnK1$, $\Delta glnK2$ y $\Delta glnK1\Delta glnK2$ cultivadas en medio de Evans Glutamato. Los valores fueron calculados a partir de los datos obtenidos para las curvas de crecimiento (DO_{500nm}) que se muestran en la **Figura VI.14**.

	Velocidad de crecimiento (horas ⁻¹)	Tiempo de duplicación (horas)
	Evans Glutamato	Evans Glutamato
USDA 110	0,0441 ± 0,0016	15,71 ± 0,57
$\Delta glnB$	0,0487 ± 0,0019	14,26 ± 0,55
$\Delta glnK1$	0,0444 ± 0,0003	15,59 ± 0,10
$\Delta glnK2$	0,0448 ± 0,0003	15,48 ± 0,11
$\Delta glnK1\Delta glnK2$	0,0440 ± 0,0029	15,80 ± 1,04

VI.4.2 Análisis de la expresión de los genes *glnB*, *glnK1* y *glnK2* en las cepas mutantes en las proteínas PII

En algunas bacterias se ha reportado que las proteínas PII pueden, directa o indirectamente, regular su propia expresión o la expresión de sus homólogos formando complejas redes metabólicas (Ninfa *et al.*, 2000). Además, se ha sugerido en bacterias como *E. coli* o *E. meliloti* (van Heedwijk *et al.*, 1996; Atkinson *et al.*, 1999; Yurgel *et al.*, 2010), que cepas mutantes donde falta una de las proteínas PII (*GlnB* o *GlnK*) algunas funciones pueden ser reemplazadas por la proteína que ha quedado intacta. En base a estos datos, y con el fin de observar el efecto de la delección de cada una de las proteínas

PII en la expresión del resto de los genes que codifican para sus homólogos, decidimos realizar un análisis relativo de transcritos mediante PCR cuantitativa (qRT-PCR).

En particular, para este ensayo decidimos evaluar los transcritos luego de 2 días de crecimiento. Esto se debe a que, como mencionamos anteriormente, las proteínas PII son proteínas de señalización que activan el metabolismo del N en respuesta a los niveles de α -cetoglutarato y glutamina intracelulares y consideramos que, a 2 días de cultivo, las bacterias se encuentran en una etapa de crecimiento exponencial temprano suficiente para haber generado cambios a nivel de transcritos en respuesta a las nuevas concentraciones de N y C provenientes del medio donde han sido inoculadas. Teniendo en cuenta estas consideraciones, se cultivaron las cepas $\Delta glnB$, $\Delta glnK1$, $\Delta glnK2$, $\Delta glnK1\Delta glnK2$ y *B. diazoefficiens* USDA 110 durante 2 días en medio Evans a 28°C y a 180 rpm, y a partir de estos cultivos, se extrajo el ARN total y se obtuvo el ADN complementario de cada cepa como se describe en el **Capítulo II**. Para la reacción de PCR cuantitativa se diseñaron cebadores específicos para amplificar una región de los genes *glnB* (blr4948), *glnK1* (blr0612) y *glnK2* (blr0606) (Ver cebadores en la **Tabla II.3.2**). Los resultados obtenidos se detallan en la **Tabla VI.3**, y nos muestran que tanto la ausencia de *glnK1*, de *glnK2* o la delección de ambos genes, no tiene efectos significativos sobre la expresión de *glnB*. En el caso de los mutantes simples la falta de una de las copias de *glnK* no afecta la expresión de la otra copia no delecionada. Por su parte, la falta de *glnB*, produce un gran aumento en la expresión de *glnK1*, sin afectar los niveles de expresión de *glnK2*, indicando que probablemente la ausencia de GlnB pueda estar siendo suplida por GlnK1.

Tabla VI.3 Expresión relativa de los genes que codifican para las proteínas PII (*glnB*, *glnK1* y *glnK2*) en las cepas $\Delta glnB$, $\Delta glnK1$, $\Delta glnK2$, $\Delta glnK1\Delta glnK2$ a 2 días de cultivo en medio Evans. Los datos que se muestran corresponden al promedio de dos réplicas biológicas evaluadas en triplicado y su desviación estándar. (-) indica que el gen evaluado se encuentra ausente en esa cepa. El fold change representa la diferencia de expresión entre un determinado gen en la cepa mutante en relación a la cepa salvaje *B. diazoefficiens* USDA 110. Se consideran como sobreexpresados aquellos genes que presentan un *fold change* mayor a 2, mientras que consideramos reprimidos aquellos cuyo *fold change* sea menor a -2. El *fold change* se define como el rq ($rq=2^{\Delta\Delta Ct}$) cuando el rq es mayor a 1 y como $-1/rq$ cuando el rq es menor a 1.

	<i>Fold change</i>		
	<i>glnB</i>	<i>glnK1</i>	<i>glnK2</i>
$\Delta glnB/USDA\ 110$	-	16,25±2,48	-2,12±1,15
$\Delta glnK1/USDA\ 110$	-1,20±0,25	-	-1,05±0,1
$\Delta glnK2/USDA\ 110$	1,03±0,43	-2,34±0,73	-
$\Delta glnK1\Delta glnK2/USDA\ 110$	-2,01±0,54	-	-

VI.4.3 Expresión de los genes que codifican para las glutamino sintetasas GSI y GSII

Como mencionamos en los **Capítulos I y IV**, en *B. diazoefficiens* podemos encontrar dos isoformas de la enzima GS: GSI y GSII (Carlson *et al.*, 1987). Además, también describimos que en la mayoría de los microorganismos donde se ha estudiado el rol de las proteínas PII se ha observado que éstas son las encargadas de deadenilar (activar) la GSI mediante su interacción con la proteína GlnE (GS adeniltransferasa/adenilremovasa), y además de transmitir la señal mediante el sistema de dos componentes NtrBC, donde el aumento de los niveles de NtrC fosforilado (NtrC-P) tiene como objetivo final inducir la expresión de *glnII* (GSII).

Algunos estudios han demostrado que la ausencia de ambas PII (GlnB y GlnK) en *E. coli* produce un defecto en el crecimiento de la bacteria cuando ésta crece en medios ricos en N, sugiriendo que dicho efecto podría deberse a la expresión atípica de los genes dependientes del sistema Ntr (regulón Ntr). En este sentido, la ausencia de las proteínas de señalización PII, probablemente conduzca a que la bacteria no sea capaz de detectar los niveles de glutamina y α -cetoglutarato intracelulares y por lo tanto, la asimilación de NH_4^+ no se lleve a cabo en la medida que es requerida, probablemente porque GSI no

es activada y porque la expresión de GSII no es inducida, provocando en conjunto una disminución en el crecimiento de la bacteria, aún cuando la cantidad de fuente de N no sea limitante (Atkinson y Ninfa , 1998).

En base a estos antecedentes bibliográficos y a los resultados obtenidos al analizar el crecimiento de nuestras cepas mutantes, decidimos evaluar la expresión de las principales glutamino sintetasas de *B. diazoefficiens*: GSI (*glnA1-blr4949*) y GSII (*glnII-blr4169*).

Para llevar a cabo esta determinación, las cepas mutantes y la cepa salvaje se cultivaron durante 5 días en medio Evans a 28 °C y 180 rpm. El tiempo de cultivo utilizado en este caso se debe a que a los 5 días de crecimiento los rizobios se encuentran en una fase exponencial tardía donde ya transcurrieron suficientes generaciones desde la dilución del cultivo iniciador como para que los niveles de C y N intracelulares se hayan manifestado plenamente y puedan observarse los cambios en la expresión de los genes. Una vez obtenidas las muestras de ADNc, se midieron de manera relativa la expresión de los genes *glnA1* y *glnII* utilizando la técnica de qRT-PCR. Los cebadores utilizados se detallan en la **Tabla II.3.2**, y son los mismos que utilizamos en el **Capítulo V** para medir los transcritos de las distintas GS en los mutantes obtenidos en estas proteínas.

En la **Tabla VI.4** se puede observar que la ausencia de cualquiera de las copias de PII afecta los niveles de expresión de las glutamino sintetasas. Por un lado, la delección del gen *glnK1* genera una disminución en la expresión de *glnA1* sin modificar la expresión de *glnII*. Mientras que la delección de *glnK2* no modifica los niveles de transcritos de *glnA1* y produce un aumento en la expresión de *glnII*. Es importante aclarar que consideramos que en este último mutante *glnII* se encuentra sobreexpresado, ya que en las dos réplicas biológicas independientes donde fue evaluado se encontró significativamente aumentado en relación a la cepa salvaje. Sin embargo, el valor de r_q en ambos casos fue lo suficientemente distante para obtener una desviación estándar grande que nos da como resultado un valor de *fold change* menor a 2.

Tabla VI.4 Expresión relativa de los genes que codifican para las proteínas GSI y GSII (*glnA1* y *glnII*) en las distintas cepas mutantes en las proteínas PII a 5 días de cultivo en medio Evans. Los datos que se muestran corresponden al promedio de dos réplicas biológicas evaluadas en triplicado y su desviación estándar. El fold change representa la diferencia de expresión entre un determinado gen en la cepa mutante en relación a la cepa salvaje *B. diazoefficiens* USDA 110. Se consideran como sobreexpresados aquellos genes que presentan un *fold change* mayor a 2, mientras que consideramos reprimidos aquellos cuyo *fold change* sea menor a -2.

	Fold change	
	<i>glnA</i>	<i>glnII</i>
$\Delta glnB$/USDA 110	-2,68±0,30	19,28±7,79
$\Delta glnK1$/USDA 110	-3,43±0,39	1,08±0,19
$\Delta glnK2$/USDA 110	1,02±0,54	3,10±1,34
$\Delta glnK1\Delta glnK2$/USDA 110	-1,36±0,37	-2,69±0,22

Los resultados obtenidos al evaluar las cepas mutantes en GlnK nos sugieren que GlnK1 y GlnK2 no estarían cumpliendo la misma función dentro de la regulación de la expresión de las glutamino sintetasas. Incluso, GlnK1 parecería afectar la regulación de *glnA1* mientras que GlnK2 estaría involucrada en la regulación de *glnII*. Sin embargo, cuando analizamos el mutante $\Delta glnK1\Delta glnK2$ detectamos que los niveles de *glnA1* son similares a los de la cepa salvaje y los niveles de *glnII* se ven disminuidos. Estas medidas resultaron muy llamativas dado que no se correlacionan con las obtenidas para los mutantes simples. De todas maneras, con los datos obtenidos hasta el momento no es posible determinar detalladamente la vía mediante la cual las GlnK influirían en la regulación de las glutamino sintetasas.

Finalmente, cuando analizamos la cepa $\Delta glnB$ llamativamente encontramos una disminución de los niveles de transcripto de *glnA1* y un gran aumento de la expresión de *glnII*, semejante a lo que hemos observado que ocurre en la cepa salvaje cuando se enfrenta a una condición de escasez de N (**Capítulo III**; Martin *et al.*, 1989). Estos datos nos conducen a pensar que probablemente GlnB sea la proteína sensora de los niveles de N intracelular y en su ausencia el sistema no sea capaz de detectar la presencia de NH_4^+ y responda activando la NSR como si se enfrentara a una situación de inanición de dicho nutriente.

Tomados en conjunto estos resultados muestran un indicio de que todas las copias de PII (GlnB, GlnK1 y GlnK2) son funcionales en *B. diazoefficiens* y que cada una de ellas pareciera cumplir un rol diferente en la regulación de la expresión de las diferentes isoformas de las glutamino sintetasas. Incluso, los datos obtenidos nos llevan a pensar que las funciones que cumplen cada una de las proteínas PII se complementan para llevar a cabo de manera eficiente el proceso de asimilación de NH_4^+ de la bacteria en vida libre.

VI.4.4 Medida de la actividad de glutamino sintetasa I (GSI) en los mutantes ΔglnK1 , ΔglnK2 , ΔglnB y $\Delta\text{glnK1}\Delta\text{glnK2}$

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos a partir de la cuantificación de los transcritos que codifican para las GS, decidimos evaluar el efecto de las mutaciones de las PII sobre la actividad de dicha enzima.

La actividad GS fue medida por la reacción γ -glutamyl-transferasa (Bender *et al.*, 1976), en células de las cepas mutantes ΔglnK1 , ΔglnK2 , ΔglnB y $\Delta\text{glnK1}\Delta\text{glnK2}$ que previamente fueron cultivadas durante 5 días en medio de Evans. Como mencionamos en el **Capítulo V**, las condiciones ensayadas en este trabajo únicamente nos permiten determinar la actividad enzimática de la isoforma GSI, en particular de aquella codificada por el gen *glnA1* (blr4949).

Podemos observar en la **Figura VI.15** que la actividad GSI, en cualquiera de las cepas mutantes en *glnK*, ya sea ΔglnK1 , ΔglnK2 o $\Delta\text{glnK1}\Delta\text{glnK2}$, resultó significativamente mayor en comparación a la obtenida para la cepa salvaje. En particular, ΔglnK1 presentó mayor actividad GSI que el resto de las mutantes, incluso más que $\Delta\text{glnK1}\Delta\text{glnK2}$. Por su parte, si comparamos el aumento de actividad de la cepa ΔglnK2 con el de $\Delta\text{glnK1}\Delta\text{glnK2}$ no se observaron diferencias significativas. Estos resultados nos llevan a pensar en primer lugar, que las proteínas GlnK en la cepa salvaje tienen un efecto atenuante sobre la actividad de la enzima GSI y que GlnB no podría reemplazar esta función. Además, si fuera cierta esta hipótesis, y teniendo en cuenta la diferencia en la medida de actividad observada entre ΔglnK1 y ΔglnK2 , pareciera que la eficiencia con que llevan a cabo esta función atenuante no es igual para GlnK1 que para GlnK2.

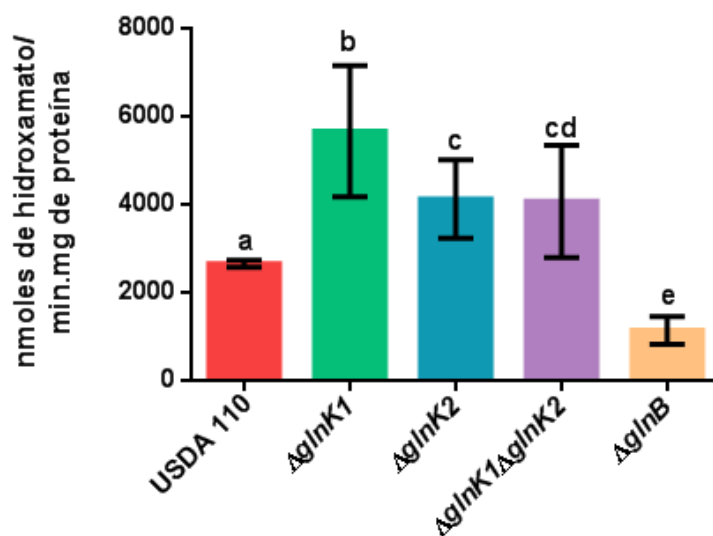


Figura VI.15 Medida de la actividad específica de la enzima GSI por la reacción γ -glutamyltransferasa en las cepas $\Delta glnB$, $\Delta glnK1$, $\Delta glnK2$, $\Delta glnK1\Delta glnK2$ a 5 días de cultivo en medio Evans. Los valores se expresan como nmoles de hidroxamato formado. $\text{min}^{-1}.\text{mg}$ de proteínas totales $^{-1}$. Las columnas representan el promedio y las barras la desviación estándar de 3 ensayos biológicos independientes realizados con 3 réplicas técnicas cada uno. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas con $p < 0,01$ en un análisis de varianza utilizando el test de Tukey.

Por otra parte, los resultados obtenidos para el mutante $\Delta glnK1\Delta glnK2$ nos resultaron llamativos ya que, a pesar de tener una actividad aumentada en relación a la cepa salvaje, ésta no resultó tan marcada como la detectada en el mutante $\Delta glnK1$, lo que nos sugiere que ante la ausencia de ambas GlnK debe estar actuando otro mecanismo de regulación que no permita la asimilación excesiva de NH_4^+ .

Por último, al analizar las medidas obtenidas para el mutante $\Delta glnB$ observamos el efecto contrario al observado para las cepas mutantes en los genes *glnK*. La ausencia de GlnB produce una disminución significativa de la actividad GSI, lo que indicaría que la presencia de GlnB tiene un efecto positivo sobre la actividad de esta enzima.

Estos resultados coinciden con el modelo propuesto por van Heeswijk y colaboradores (1996) para *E. coli*, donde GlnK cumpliría el rol de atenuar y GlnB de exacerbar el sistema de señalización en respuesta a las concentraciones de C y N intracelular.

VI.4.5 Cuantificación de amonio residual en sobrenadantes y análisis de los transcriptos amtB

Como describimos en el **Capítulo I**, el ingreso de NH_4^+ al interior celular es facilitado por los transportadores de amonio AmtB. Se ha demostrado en bacterias y arqueas que estas proteínas de transmembrana son capaces de interactuar físicamente con las proteínas GlnK (Strosser *et al.*, 2004; Heinrich *et al.*, 2006; Conroy *et al.*, 2007; Gruswitz *et al.*, 2007; Tremblay *et al.*, 2007; Yildiz *et al.*, 2007) de manera que dicha interacción bloquea la entrada de NH_4^+ cuando los niveles de N son suficientes en la célula.

Sin embargo, en bacterias como *R. rubrum*, que contiene 3 homólogos de PII, dos proteínas pertenecientes a la familia de GlnK, denominados GlnJ y GlnK, y una perteneciente a la familia GlnB, se ha descrito que *in vivo* todos pueden interactuar con los transportadores de amonio AmtB (Wolfe *et al.*, 2007). Además, esta misma bacteria, como hemos descrito al inicio de este capítulo, posee dos copias del par génico *glnK-amtB* que se denominaron GlnJ-AmtB1 y GlnK-AmtB2. Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la unión de GlnJ con AmtB1 es más estable que la unión de las otras PII a dicho transportador (Wolfe *et al.*, 2007). Así, a pesar de que las tres PII homólogas pueden unirse al AmtB1, la afinidad de éstos homólogos por dicho transportador es significativamente diferente, siendo GlnJ la que mayor afinidad presenta (Wolfe *et al.*, 2007) en este microorganismo.

Teniendo en cuenta estos datos, y con el objetivo de intentar diferenciar el rol que cumple cada una de las PII de *B. diazoefficiens*, decidimos evaluar el ingreso de NH_4^+ al interior celular de las diferentes cepas mutantes. Así, para llevar a cabo la cuantificación de este compuesto, se cultivaron durante 2, 5 o 10 días la cepa salvaje y las cepas ΔglnK1 , ΔglnK2 , ΔglnB y $\Delta\text{glnK1}\Delta\text{glnK2}$ en medio Evans. Transcurrido el tiempo deseado, se centrifugaron los cultivos y se conservó el sobrenadante de los mismos. La cantidad de NH_4^+ residual en dichos sobrenadantes se determinó mediante el método colorimétrico del Indofenol (Solorzano, 1969) y se relativizó el valor obtenido de μmoles de NH_4Cl según la cantidad de proteínas totales de cada cepa. Los resultados obtenidos se detallan en la **Tabla VI.5**.

Tabla VI.5 Cuantificación de NH_4^+ residual en sobrenadantes de cultivos de las cepas ΔglnK1 , ΔglnK2 , ΔglnB y $\Delta\text{glnK1}\Delta\text{glnK2}$ en comparación con la cepa salvaje *B. diazoefficiens* USDA 110. El método utilizado para la detección del NH_4^+ fue el método colorimétrico del Indofenol. Los cultivos de la cepa salvaje y las mutantes se crecieron durante 2, 5 o 10 días en medio Evans. Los datos que se muestran corresponden a los promedios y las desviaciones estándar de 3 ensayos biológicos cada uno con 3 réplicas técnicas. Las siglas NM indican que no fueron realizadas las medidas para esa cepa en esa condición.

	umoles de NH_4Cl / mg de proteínas totales		
	2 días	5 días	10 días
USDA 110	820,49 ± 95,62	38,56 ± 2,80	17,29 ± 0,94
ΔglnK1	828,28 ± 162,71	36,76 ± 5,98	NM
ΔglnK2	764,46 ± 22,84	39,77 ± 0,93	NM
$\Delta\text{glnK1}\Delta\text{glnK2}$	787,41 ± 174,95	39,84 ± 4,10	NM
ΔglnB	18860,47 ± 11998,39	289,98 ± 11,58	26,28 ± 2,15

En primer lugar, al analizar los sobrenadantes de la cepa salvaje, podemos corroborar que efectivamente la cantidad de NH_4^+ proveniente del medio de cultivo fue disminuyendo a medida que aumentó la cantidad de días de crecimiento, y por ende, el metabolismo bacteriano. Observamos el cambio más trascendental entre los días 2 y 5 que corresponden a la fase de crecimiento exponencial donde la cantidad de NH_4^+ en sobrenadante se redujo un 95%. Mientras que el cambio observado entre los días 5 y 10 resultó mucho más moderado debido a que las bacterias se encuentran en una fase estacionaria de su crecimiento. En este caso, al día 10 la cantidad de NH_4^+ en el sobrenadante se redujo un 55% en base a la cantidad obtenida para el día 5. Sin embargo, esto implicó sólo un 3% más en relación a la cantidad medida al día 2, alcanzando una reducción total desde el día 2 al día 10 del 98%.

Al comparar la cepa salvaje con las cepas mutantes encontramos una drástica disminución del ingreso de NH_4^+ en la cepa ΔglnB . Sin embargo, si analizamos el comportamiento de esta cepa a lo largo de los días podemos observar que lentamente la cantidad de NH_4^+ residual va disminuyendo hasta alcanzar, a los 10 días, una cantidad semejante a la detectada para la cepa salvaje. Estos resultados claramente nos indican que la asimilación de NH_4^+ en esta cepa mutante es mucho lenta que en la cepa parental. A pesar de esto, cuando ΔglnB se duplica y alcanza la misma biomasa final que la cepa parental, la cantidad de NH_4^+ en sobrenadantes de esta cepa mutante es prácticamente

igual que la que encontramos en los sobrenadantes de la cepa salvaje. Estos datos son coincidentes con la disminución en la actividad de la GS (ver **Figura VI.16**) y la disminución en la velocidad de crecimiento (ver **Tabla VI.1**), así como también con la biomasa final a la cual llegan (ver **Figura VI.13**), tanto la cepa mutante como la salvaje, una vez transcurridos 10 días de cultivo.

Como ya hemos mencionado anteriormente en este capítulo, aunque los distintos homólogos de PII pueden interactuar con el transportador de amonio AmtB, en general se ha visto que AmtB interacciona específicamente con las proteínas de la familia GlnK (Thomas *et al.*, 2000a; Conroy *et al.*, 2006). En nuestro caso, si analizamos en detalle el fenotipo obtenido para la cepa $\Delta glnB$, no sólo podemos observar que el ingreso de NH_4^+ al interior celular se reduce drásticamente, sino que también tenemos un gran aumento de la expresión de *glnK1* (**Tabla VI.3**). Estos resultados nos conducen a preguntarnos ¿GlnK1 tiene mayor afinidad por el AmtB que el resto de sus homólogos en este rizobio? Si la función de GlnK1 es actuar como tapón de los transportadores, entonces, el ingreso de NH_4^+ en $\Delta glnB$ podría estar siendo restringido por un aumento en la cantidad de esta proteína. Sin embargo, llamativamente cuando analizamos el fenotipo de las cepas mutantes en *glnK*, ni $\Delta glnK1$, ni $\Delta glnK2$ ni la doble mutante $\Delta glnK1\Delta glnK2$ mostraron diferencias significativas en comparación con la cepa parental. Este resultado podría deberse a que el medio Evans utilizado para llevar a cabo los ensayos, posee una cantidad balanceada de N y C (20 mM de NH_4Cl y 50 mM de manitol con una relación C/N= 14), y probablemente la bacteria no sensa el shock de NH_4^+ necesario para responder mediante el bloqueo de canales. En *E. coli* se ha reportado que para que esta interacción ocurra los niveles de NH_4^+ extracelular deben ser mayores a 50 μM de (Javelle *et al.*, 2004).

En base a estos últimos resultados, se llevó a cabo la cuantificación de NH_4^+ en un medio limitado en C como es el **Evans Bajo C** (con una formulación que posee una relación C/N=1,4, 20 mM de NH_4Cl y 5, 5 mM de manitol). Los datos obtenidos de este ensayo parecieran indicar que la falta de cualquiera de las proteínas GlnK (GlnK1 o GlnK2) favorece el ingreso de NH_4^+ al interior celular, mientras que la ausencia de GlnB, nuevamente, genera una restricción del ingreso de NH_4^+ (**Figura VI.16**). Considerando los resultados obtenidos hasta el momento podríamos pensar que las proteínas GlnK estarían cumpliendo el rol de tapones interaccionando con los transportadores AmtB

regulando el ingreso de NH_4^+ . No obstante, los datos mostrados en este último ensayo son medidas preliminares y es necesario repetir los experimentos para obtener al menos 3 réplicas biológicas independientes que nos permitan llegar a conclusiones más certeras.

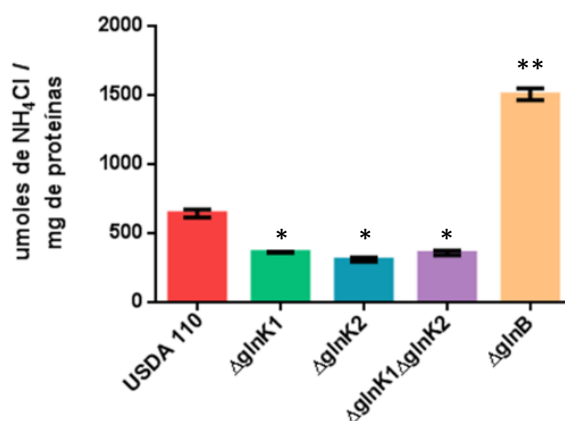


Figura VI.16 Cuantificación de NH_4^+ residual en sobrenadantes de cultivos de la cepa salvaje y las cepas mutantes en medio Evans Bajo C (con una formulación que permite un exceso de NH_4^+ extracelular). Las cepas se crecieron durante 5 días y la cuantificación de NH_4^+ se llevó a cabo a través del método colorimétrico del Indofenol. Los datos que se muestran corresponden a los promedios y las desviaciones estándar de 3 réplicas técnicas de una única réplica biológica. Los símbolos diferentes (* y **) representan diferencias significativas.

Para analizar un poco más en profundidad la dinámica de la regulación del ingreso y la asimilación de NH_4^+ en *B. diazoefficiens*, decidimos evaluar el efecto de las mutaciones en las proteínas PII sobre la transcripción de los genes que codifican los transportadores AmtB. En particular, los resultados obtenidos al evaluar el ingreso de NH_4^+ al interior celular en medio Evans nos llevaron a pensar que la expresión de dichos transportadores podría verse afectada por la falta de alguna de las PII. En este sentido, la delección de los genes *glnK* podría conducir a una menor disponibilidad de tapones para regular el ingreso de NH_4^+ , y en consecuencia la bacteria podría estar regulando la expresión de los genes *amtB* para controlar de esta forma el ingreso de NH_4^+ al interior celular.

Para llevar a cabo este análisis, las cepas se cultivaron durante 2 días en medio Evans y se obtuvo el ARN total y el ADNc como se describió previamente en el **Capítulo II**. Los

niveles relativos de transcritos *amtB1* y *amtB2* se determinaron mediante qRT-PCR utilizando los cebadores que se detallan en la **Tabla II.3.2**.

La **Tabla VI.6** nos muestra que la expresión de *amtB1* en las cepas $\Delta glnB$ y $\Delta glnK2$ aumentó significativamente en relación a la cepa salvaje. Mientras que al evaluar la doble mutante $\Delta glnK1\Delta glnK2$ la expresión de *amtB1* se ve levemente disminuida.

Tabla VI.6 Expresión relativa de los genes que codifican para los posibles transportadores de amonio (*amtB1* y *amtB2*) en las cepas $\Delta glnK1$, $\Delta glnK2$, $\Delta glnB$ y $\Delta glnK1\Delta glnK2$ en comparación con la cepa salvaje *B. diazoefficiens* USDA 110 cultivadas 2 días en medio Evans. El fold change representa la diferencia de expresión entre un determinado gen en la cepa mutante en relación a la cepa salvaje. Se consideran como sobreexpresados aquellos genes que presentan un *fold change* mayor a 2, mientras que consideramos reprimidos aquellos cuyo *fold change* sea menor a -2. Los datos que se muestran corresponden al promedio de dos réplicas biológicas evaluadas en triplicado y su desviación estándar.

	<i>Fold change</i>	
	<i>amtB1</i>	<i>amtB2</i>
$\Delta glnB$ /USDA 110	29,27±3,65	-2,19±0,71
$\Delta glnK1$ /USDA 110	-1,76±0,01	-1,52±0,36
$\Delta glnK2$ /USDA 110	67,56±4,41	1,93±0,26
$\Delta glnK1\Delta glnK2$ /USDA 110	-3,16±0,96	1,20±0,53

Por otra parte, los niveles de transcritos de *amtB2* no se ven modificados por la delección de ninguna de las PII.

Estos resultados nos resultaron particularmente interesantes. En el comienzo de este capítulo demostramos que *glnK1* y *amtB1* se expresan de manera conjunta, lo cual podemos observar que sucede cuando analizamos las expresiones relativas en la cepa $\Delta glnB$, donde se observa un aumento de *glnK1* (ver **Tabla VI.3**) que se correlaciona con un aumento similar de *amtB1*. Sin embargo, la mutante $\Delta glnK2$ muestra un aumento en los niveles de transcritos de *amtB1* pero no se modifican los niveles de *glnK1* (ver **Tabla VI.3**). En este punto, es importante señalar que esta comparación se puede realizar ya que las medidas de niveles relativos de transcritos de las diferentes PII (**Tabla VI.3**) y de los transportadores de NH_4^+ (**Tabla VI.6**) se realizaron en simultáneo en una misma corrida utilizando un mismo ADNc.

Esto nos lleva a pensar que, probablemente, el transportador de amonio *amtB1* posee un segundo promotor con una vía de regulación independiente que se activa bajo ciertas condiciones. Con respecto a esto, Čuklina y colaboradores (2016) realizaron estudios transcriptómicos sobre *B. diazoefficiens* en vida libre y dentro de nódulos de soja, los cuales aportan indicios acerca de la regulación de la expresión de estos *clusters* duplicados. Este tipo de regulaciones múltiples, donde encontramos que algunos genes pueden expresarse de manera conjunta en ciertas condiciones y de manera individual en otras debido a la presencia de un promotor interno, ya ha sido descrita para otros genes de *B. diazoefficiens* (Martin *et al.*, 1989; Mongiardini *et al.*, 2017).

Si analizamos todos estos datos en conjunto, los mismos nos llevan a hipotetizar que las proteínas GlnK serían las responsables de taponar los transportadores de NH_4^+ y que, GlnK1 podría tener mayor afinidad que GlnK2 por el transportador.

Por otra parte, cuando *glnK1* y *glnK2* están ausentes ($\Delta\text{glnK1}\Delta\text{glnK2}$), la expresión de *amtB1* disminuye, probablemente porque sólo hay trímeros de GlnB que no son capaces de llevar a cabo la función de tapón que cumple GlnK y, por lo tanto, la manera de regular la entrada de NH_4^+ sería reduciendo la cantidad de transportadores AmtB (sin considerar que el ingreso de NH_3 al interior celular se produce por difusión). Por otra parte, cuando GlnK1 está ausente (ΔglnK1) no se necesitarían menos AmtB porque probablemente GlnK2 pueda reemplazarla.

En el caso de la cepa ΔglnK2 , podemos encontrar trímeros de GlnB o GlnK1, y suponiendo que GlnK1 tiene mayor afinidad por los transportadores que GlnK2, entonces la bacteria necesitaría aumentar la cantidad de AmtB para permitir el ingreso de NH_4^+ .

Finalmente, cuando la bacteria no tiene GlnB, el aumento de la cantidad de transcritos de *glnK1* podría deberse a que GlnK1 intentaría suplir ciertas funciones que en una cepa salvaje serían llevadas a cabo por GlnB. Pero ese aumento de *glnK1* también desencadenaría el aumento en los transportadores, o por estar en operón o por necesitar más AmtB libre que no sean bloqueados por GlnK1.

VI.5 Resumen y Discusión

En este capítulo analizamos los tres genes que codifican para las proteínas PII de *B. diazoefficiens*, una copia del gen *glnB* (blr4948) y dos copias de *glnK* cada una de ellas ubicadas de manera adyacente a un transportador de NH_4^+ *amtB*, que hemos denominado arbitrariamente *glnK1* (blr0612)-*amtB1* (blr0613) y *glnK2* (blr0606)-*amtB2* (blr0607 y blr0608).

El análisis *in silico* de las secuencias de las proteínas PII nos permitió detectar los sitios de uridilación que contienen el residuo Tyr51 característico para esta familia de proteínas, así como también determinar los altos niveles de homología entre ellas (**Figura VI.1**). En cuanto al análisis de las secuencias proteicas de los transportadores de NH_4^+ , nos permitió observar la escasa similitud entre ellos y nos llevó a pensar que la copia AmtB2 podría haber sufrido una inserción en su secuencia (**Figura VI.4; Anexo 1.1**) en algún momento de la evolución y podría no ser funcional.

El análisis de los transcritos de los genes que codifican para las proteínas PII y para los AmtB nos indicó que, en las condiciones ensayadas (una condición sin limitación de N ni de C como es el medio Evans), todos los genes evaluados se expresan (**Figura VI.5**), indicando que *glnB* y las *glnK* de *B. diazoefficiens* no poseen una expresión diferencial como ocurre en otros microorganismos.

Otro dato interesante que observamos fue que el par *glnK1-amtB1* se encuentra formando parte de un operón (**Figura VI.6**), aunque bajo ciertas circunstancias la expresión de *amtB1* parecería responder a un segundo promotor de manera independiente (**Tabla VI.3** y **Tabla VI.6**). Por su parte, la expresión de *glnK2* y *amtB2* resultó ser una de las excepciones a los sistemas *glnK-amtB* descritos comúnmente ya que no se expresan conjuntamente (**Figura VI.6**). Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos por Jelena Čuklina *et al.* (2016), donde fue posible detectar un inicio de transcripción que se activa en vida libre ubicado en la posición 652147 del genoma de *B. diazoefficiens*, que se encuentra justamente localizado entre los genes *glnK2* (651801..652139) y *amtB2* (652211..653227).

La caracterización fenotípica de las cepas mutantes $\Delta glnK1$, $\Delta glnK2$, $\Delta glnB$ y $\Delta glnK1\Delta glnK2$ indicó que ninguna de las tres PII es esencial por sí sola para el crecimiento de las bacterias en medios limitados en N (**Figura VI.13-Paneles C y D**;

Figura VI.14 – Paneles A y B). Sin embargo, al analizar un medio con cantidad suficiente de N como es el medio Evans, encontramos que la ausencia de *glnB* hace que la cepa mutante posea una velocidad de crecimiento menor que la salvaje (**Tabla VI.1**), aunque finalmente es capaz de alcanzar una biomasa final igual a la cepa parental (**Figura VI.13-Panel A y B**). Estos datos nos llevan a pensar que GlnB es de gran importancia para sensor inicialmente las cantidades de glutamina y α -cetoglutarato intracelulares y para la puesta en marcha de la regulación del metabolismo del NH_4^+ , en particular en una condición donde este nutriente se encuentra en exceso. Además, la capacidad de la cepa ΔglnB para adaptarse y alcanzar una biomasa final equivalente a la de la cepa salvaje cuando se cultiva en medio Evans (**Figura VI.13-Paneles A y B**) nos indica que la función que lleva a cabo GlnB puede ser sustituida finalmente por alguna de las otras proteínas PII que encontramos en *B. diazoefficiens*. Estos resultados se correlacionan con el aumento de transcriptos de *glnK1* durante los primeros días de crecimiento de la cepa mutante ΔglnB (**Tabla VI.3**), lo que estaría indicando que la falta de GlnB podría ser reemplazada por GlnK1.

Asimismo, pudimos observar que la velocidad de crecimiento de la cepa mutante $\Delta\text{glnK1}\Delta\text{glnK2}$ se ve alterada en relación a la velocidad de crecimiento de *B. diazoefficiens* cuando dichas cepas se cultivan en extrema escasez de NH_4^+ (Evans Bajo N) (**Tabla VI.1**). En cambio, cuando el medio de cultivo posee glutamato como única fuente nitrogenada o NH_4^+ en condiciones no limitantes, no se observan diferencias en la velocidad de crecimiento de la doble mutante con respecto a la cepa salvaje (**Tabla VI.1 y Tabla VI.2**), indicando que probablemente la función que cumplen las GlnK sea relevante principalmente en condiciones de inanición extrema de NH_4^+ .

Por otra parte, pudimos observar que, dependiendo de cuál de las PII delecionemos, el patrón de expresión de *glnII* y *glnA1* cambia, indicando que todos los homólogos de PII son funcionales y que afectan de alguna manera, directa o indirecta, a la regulación de la expresión de las glutamino sintetasas (**Tabla VI.4**).

Adicionalmente, también detectamos que GlnK y GlnB poseen un efecto contrario sobre la actividad de la isoforma GSI: las proteínas GlnK (tanto GlnK1 como GlnK2) parecerían tener un efecto atenuante sobre la actividad de la enzima GSI, mientras que GlnB no sólo no puede reemplazar esta función, sino que pareciera tener un efecto positivo sobre la actividad de esta enzima (**Figura VI.15**).

Los resultados obtenidos se correlacionan con los datos registrados al cuantificar el NH_4^+ residual de los sobrenadantes de cultivos de las cepas mutantes. En la cepa ΔglnB la asimilación de NH_4^+ resultó mucho lenta que en la cepa parental aunque, con el pasar del tiempo, ΔglnB es capaz de metabolizar casi la misma cantidad de NH_4^+ que la cepa salvaje (**Tabla VI.5**). Esto explicaría la disminución en la actividad de la GSI (**Figura VI.15**) y la disminución en la velocidad de crecimiento (**Tabla VI.1**), así como también la similitud en la biomasa final alcanzada cuando entran en fase estacionaria tanto la cepa mutante como la salvaje (**Figura VI.13**).

Por otra parte, cuando analizamos la expresión relativa de los transportadores de AmtB pudimos observar que los niveles de transcritos de *amtB2* no se ven modificados por la delección de ninguna de las PII (**Tabla VI.6**). Este resultado nos indica que la expresión de este gen no depende de la cascada de regulación donde intervienen estas proteínas. Contrariamente, al evaluar la expresión del transportador *amtB1* observamos que la misma se encuentra relacionada con la presencia o ausencia de las PII (**Tabla VI.6**), aunque con los datos obtenidos hasta el momento no es posible esclarecer la vía de su regulación. Los resultados obtenidos al analizar la expresión de este gen en las distintas cepas mutantes en relación a la cepa salvaje nos conducen a pensar que las GlnK serían las responsables de taponar los transportadores de NH_4^+ y que, GlnK1 podría tener mayor afinidad por dichos transportadores que GlnK2.

Todos estos resultados tomados en conjunto sugieren en primer lugar, que todas las copias de PII: GlnB, GlnK1 y GlnK2 estarían cumpliendo un rol en la regulación del metabolismo de N en *B. diazoefficiens* en vida libre y, además, el rol que cumple cada una de ellas es diferente, aunque algunas funciones podrían superponerse. Sin embargo, es necesario el accionar de las tres proteínas en conjunto para el correcto proceso de asimilación de NH_4^+ indicando que, a pesar de la aparente redundancia de tener varias proteínas de señalización, cada una de ellas sería parte fundamental de una regulación fina de la activación de la NSR.

Capítulo VII

Interacción con plantas de soja: rol de las proteínas PII de *B. diazoefficiens* en la simbiosis fijadora de N₂



Introducción

La interacción rizobio-leguminosa constituye una proto-cooperación en la que ambos individuos pueden vivir de forma independiente, pero, cuando se asocian, sacan provecho uno del otro. Por un lado, la planta le brinda protección a los rizobios frente a las condiciones adversas del suelo y les suministra fuentes de C y energía para que éstos puedan vivir dentro de los nódulos. Por su parte, los rizobios reducen el N₂ atmosférico a NH₄⁺, y se lo brindan a la planta en forma de este compuesto, de aminoácidos o de ureídos según la especie de rizobio (Pate *et al.*, 1980, Lodwig y Poole, 2003). De este modo, la planta dispone de compuestos nitrogenados fácilmente asimilables para sus requerimientos metabólicos y para adaptarse a suelos pobres en este nutriente, mejorando así su crecimiento.

Un aspecto importante a resaltar de la fijación biológica de N₂ es que este proceso es independiente del metabolismo de N de la bacteria en vida libre (Patriarca *et al.*, 2002). La desregulación de los genes estructurales y regulatorios de la asimilación de NH₄⁺ es un paso clave y necesario para que la diferenciación del simbiosoma sea eficiente y por ende, que el desarrollo del nódulo sea efectivo (Patriarca *et al.*, 2004). Incluso, se ha demostrado que, en bacteroides con fenotipo Fix⁺ (que fijan eficientemente N), la asimilación de NH₄⁺ se encuentra reducida a muy bajos niveles ya que el NH₄⁺ obtenido a partir de la fijación simbiótica del N₂ atmosférico es transferido prácticamente en su totalidad a la planta (Howitt *et al.*, 1986; de Bruijn *et al.*, 1989; Shatter y Kahn 1993; Lodwig y Poole, 2003).

Además, cepas de rizobios mutantes en genes involucrados en la asimilación de NH₄⁺ (genes que codifican para las enzimas GS y GOGAT) y en la regulación del metabolismo del N en vida libre (que codifican para las proteínas PII o el sistema de regulación NtrBC), demostraron ser capaces de formar nódulos y fijar N₂ (Howitt *et al.*, 1986; Carlson *et al.*, 1987; de Bruijn *et al.*, 1989; Udvardi *et al.*, 1992; Shatters y Kahn 1993; Yurgel *et al.*, 2008; Yurgel *et al.*, 2010). Estos resultados indicarían que las proteínas involucradas en la asimilación de NH₄⁺ no serían necesarias para llevar a cabo una simbiosis eficiente (Kahn, 1985; Udvardi, 1993).

Sin embargo, en *E. meliloti* 2011 se ha demostrado que el metabolismo del N de la bacteria en vida libre se encuentra acoplado a los procesos de infección y formación de

los nódulos y, en particular, esta conexión involucra a la proteína de señalización PII: GlnB (Arcondéguy *et al.*, 1997). Los nódulos obtenidos a partir de la inoculación de plantas de alfalfa con cepas mutantes en *glnB* de este rizobio resultaron en su mayoría pseudonódulos con una alta actividad nitrogenasa. A pesar de esto, las plantas inoculadas con estas cepas tuvieron un menor desarrollo de su parte aérea, la cual se observó de color amarillenta indicando la ausencia de la fijación de N₂ (Arcondéguy *et al.*, 1997).

En otros casos, como *Azorhizobium caulinodans* ORS571 (simbionte de la leguminosa tropical *Sesbania rostrata*), la delección de *glnB* también afecta la fijación de N₂ en simbiosis. En este caso, la cepa mutante fue capaz de formar nódulos como la cepa salvaje, sin embargo, no posee actividad nitrogenasa y las plantas inoculadas con ella poseen un desarrollo escaso (Michel-Reydellet *et al.*, 1997). Esta regulación también se ha observado en bacterias fijadoras de N₂ en vida libre como por ejemplo *Rhodospirillum rubrum*. En esta bacteria se ha demostrado que sólo GlnB en su forma uridilada es capaz de inducir la expresión de los genes *nif* para expresar el complejo de la nitrogenasa y llevar a cabo la fijación biológica de N₂ (Zhang *et al.*, 2000). Por el contrario, en *Herbaspirillum seropedicae*, una β -proteobacteria fijadora de N, GlnK es la principal responsable de la expresión de los genes *nif* (Noindorf *et al.*, 2011). Como se puede apreciar, la regulación de los genes *nif* (necesarios para la síntesis de la nitrogenasa) y *fix* depende del microorganismo en estudio.

En base a los antecedentes expuestos y dado que la función de las diferentes PII en *B. diazoefficiens* en simbiosis aún no ha sido descrita, nos propusimos evaluar el fenotipo de cada una de las cepas mutantes en su interacción simbiótica con las plantas de soja.

VII.1 Rol de las proteínas PII en la nodulación y en la fijación biológica de N₂

Para evaluar la capacidad de nodulación y fijación de N₂ en plantas de soja de las cepas mutantes en las proteínas PII, se procedió como se describe en el **Capítulo II.6.3** y en la **Figura VII.1**. Brevemente, las cepas utilizadas *B. diazoefficiens* USDA 110, Δ *glnK1*, Δ *glnK2* y Δ *glnB*, se cultivaron durante 6 días (hasta fase estacionaria) en Evans Bajo N. En particular, optamos por utilizar este medio de cultivo debido a que, como ya hemos

mencionado, estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado una influencia positiva de las condiciones de inanición de N sobre los procesos tempranos de interacción entre *B. diazoefficiens* y las plantas de soja (López-García *et al.*, 2001; López-García, 2004). En particular, en este trabajo de Tesis hemos demostrado que Evans Bajo N es un medio con escasez extrema de NH_4^+ .

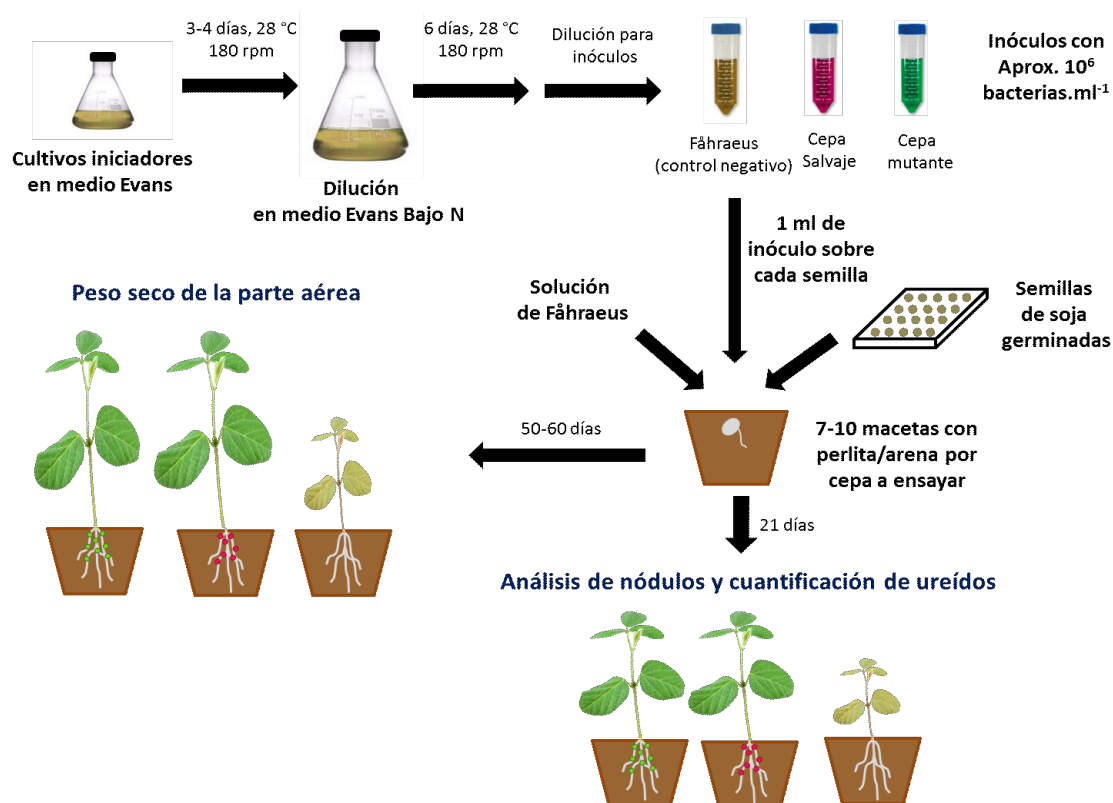


Figura VII. 1 Esquema experimental para los ensayos de interacción con plantas de soja.

A partir de estos cultivos realizamos diluciones hasta obtener una concentración de aproximadamente 10^6 UFC. ml^{-1} . 1 ml de cada uno de estos cultivos diluidos se utilizaron para inocular entre 7 y 10 plantas por cepa a evaluar. Además, se dejó el mismo número de plantas sin inocular como controles negativos. El tiempo de cultivo de las plantas varió entre 21 y 60 días según el ensayo a realizar, como describiremos a continuación. En primer lugar, evaluamos la nodulación y la fijación de N_2 en plantas cultivadas durante 21 días en cámara de plantas. Para ello, se obtuvieron los nódulos de cada una de ellas, se registró el número total de nódulos por planta y posteriormente se secaron

durante 20 días para determinar su biomasa total. Este mismo procedimiento de secado se llevó a cabo con la parte aérea de cada planta ensayada (**Tabla VII.1**).

Tabla VII.1 Evaluación de la nodulación y la fijación biológica de N₂ de las cepas mutantes en las proteínas PII y la cepa salvaje *B. diazoefficiens* USDA 110. Los datos de la cuantificación de ureídos (medidos como mM de alantoína/g de planta), el número de nódulos por planta y el peso seco de los mismos corresponden a las plantas cultivadas durante 21 días en cámara de plantas. Mientras que los datos del peso seco de la parte aérea se obtuvieron a partir de plantas cultivadas durante aprox. 60 días en invernáculo. Los resultados muestran el promedio y la desviación estándar de dos ensayos biológicos independientes. Los datos se analizaron en un análisis de varianza con $p < 0,01$ utilizando el test de Tukey.

Cepa a evaluar	N° de nódulos/ planta	Peso seco de nódulo (mg) / planta	mM alantoína/ g de planta	Peso seco parte aérea (g)
USDA 110	14.3 ± 4.2	37.7 ± 13.0	20.2 ± 2.9	1.0 ± 0.1
<i>ΔglnK1</i>	11.9 ± 4.5	31.5 ± 8.3	15.5 ± 2.7	1.0 ± 0.1
<i>ΔglnK2</i>	21.5 ± 6.2	29.7 ± 10.0	16.6 ± 4.8	1.2 ± 0.1
<i>ΔglnB</i>	3.83 ± 2.2	16.3 ± 6.2	11.6 ± 3.7	0.6 ± 0.2
Control sin inocular	-	-	12.7 ± 2.4	0.6 ± 0.1

Al analizar los resultados obtenidos para las plantas inoculadas con la cepa *ΔglnB* observamos que presentaban una menor cantidad de nódulos. Incluso, éstos eran más pequeños que los obtenidos de las plantas inoculadas con la cepa salvaje y de color blanquecino en su interior (pseudonódulos). Estas características se vieron reflejadas en el peso seco de los nódulos donde también se determinó una disminución del mismo (**Tabla VII.1**).

Por su parte, las plantas inoculadas con las cepas *ΔglnK1* y *ΔglnK2* generaron similar cantidad de nódulos y con una biomasa final también similar a aquellas inoculadas con la cepa parental (**Tabla VII.1**). Asimismo, los nódulos obtenidos al inocular con estas cepas mutantes se vieron, a simple vista, morfológicamente similares a los obtenidos al inocular con *B. diazoefficiens* USDA 110, con ornamentas externas y en su interior un color rojizo característico nódulos fijadores de N.

A partir de las muestras secas de la parte aérea llevamos a cabo la cuantificación de ureídos en hojas (que representa una medida indirecta de la fijación biológica de N₂)

como se describe en el **Capítulo II.6.4**. Mediante esta técnica se pudo observar que en aquellas plantas inoculadas con el mutante $\Delta glnB$ la concentración de ureídos resultó menor que el valor que se obtuvo para la cepa salvaje USDA 110, pero similar a la medida obtenida para los controles no inoculados, indicando que la fijación biológica de N_2 está reducida en la cepa $\Delta glnB$. Por su parte, las plantas inoculadas con las cepas mutantes $\Delta glnK1$ y $\Delta glnK2$ no mostraron diferencias significativas en la cantidad de ureídos en hoja en relación a la cepa salvaje (**Tabla VII.1**), lo que podríamos suponer que las proteínas GlnK de *B. diazoefficiens* no son necesarias para llevar a cabo la fijación de N_2 . Para confirmar el fenotipo observado mediante la cuantificación de ureídos en hoja, llevamos a cabo otro ensayo de nodulación como se describió anteriormente, pero esta vez las plantas inoculadas se cultivaron durante aproximadamente 60 días en invernáculo. La capacidad de fijar N_2 en este caso se evaluó mediante la medida del peso seco de la parte aérea. Es importante señalar que esta medida también fue evaluada en el ensayo de plantas de 21 días anteriormente descrito, pero en esa instancia no se observaron diferencias significativas, debido probablemente al poco tiempo de desarrollo de las plantas que aún no habían llegado a expresar su deficiencia en N. En este ensayo, al evaluar la biomasa de las plantas cultivadas durante 60 días pudimos observar que aquellas que habían sido inoculadas con la mutante $\Delta glnB$ mostraron una disminución significativa en el peso seco de la parte aérea semejante al obtenido para las plantas sin inocular (**Tabla VII.1**). Asimismo, macroscópicamente estas plantas se presentaban amarillentas y más pequeñas a partir de los 28 días post inoculación, indicando una menor fijación de N_2 que la cepa parental (**Figura VII.2 – Panel A**).



Figura VII.2 Aspecto macroscópico de las plantas, raíces y nódulos a los 28 días post inoculación. **A)** Fotografía de las plantas de soja (*G. Max*) inoculadas con suspensiones bacterianas (del orden de 10^6 UFC.ml⁻¹.planta⁻¹) de las cepas *B. diazoefficiens* USDA 110, $\Delta glnK1$, $\Delta glnK2$ y $\Delta glnB$ o con solución de Fähræus (control sin inocular). **B)** Fotografía de las raíces y los nódulos obtenidos de las plantas mencionadas en el inciso A. El control negativo no presentó nódulos en sus raíces.

Además, las plantas inoculadas por la cepa *ΔglnB* nuevamente presentaron escasa cantidad de nódulos, de un tamaño pequeño y de color blanquecino (pseudonódulos), indicando la ausencia de bacteroides fijadores de N₂ (**Figura VII.2 - Panel B**). Todas estas características describen un fenotipo defectivo en la fijación simbiótica de N₂ (Fix⁻) de esta cepa.

Por otra parte, las plantas inoculadas con las cepas *ΔglnK1* y *ΔglnK2* mostraron un fenotipo macroscópico similar al de la cepa salvaje, de color verde oscuro y de mayor tamaño que los controles sin inocular (**Figura VII.2 – Panel A**).

A pesar que a los 28 días de crecimiento las plantas inoculadas con las cepas *ΔglnK1* parecían tener un menor desarrollo que la cepa salvaje, al evaluar su biomasa a 60 días no se observaron diferencias significativas en relación a la biomasa obtenida para las plantas inoculadas con *B. diazoefficiens* USDA 110 (**Tabla VII.1**). Incluso, como se puede ver en la **Figura VII.2 - Panel B** los nódulos obtenidos a partir de las plantas inoculadas con las cepas *ΔglnK1* y *ΔglnK2* resultaron similares a los obtenidos al inocular con la cepa salvaje.

VII.2 Análisis morfológico y de la ultraestructura de nódulos de soja inducidos por *B. diazoefficiens* USDA 110 y las cepas mutantes en las proteínas PII

Para complementar los estudios de interacción con plantas de soja, se seleccionó del mismo ensayo anteriormente mencionado, a los 28 días post inoculación, una planta de cada una de las condiciones evaluadas y los nódulos obtenidos fueron seccionados longitudinalmente para luego ser observados al microscopio óptico (**Figura VII.3**). Mediante esta técnica pudimos ver que los nódulos obtenidos al inocular con la cepa *ΔglnB* poseen una menor ocupación respecto a los nódulos invadidos por la cepa salvaje (**Figura VII.3- Panel B y F**). Por su parte, resultó llamativo que, si bien el aspecto macroscópico de los nódulos producidos por la cepa mutante *ΔglnK1* parecían ser similares a los obtenidos en plantas inoculadas con la cepa salvaje, también presentaron un menor nivel de ocupación (**Figura VII.3- Panel C y G**), indicando que tanto *GlnB* como *GlnK1* parecen ser necesarias para el proceso de invasión de los nódulos. Finalmente,

los nódulos infectados por la cepa $\Delta glnK2$ no presentaron diferencias significativas en cuanto a su grado de ocupación (**Figura VII.3- Panel D y H**).

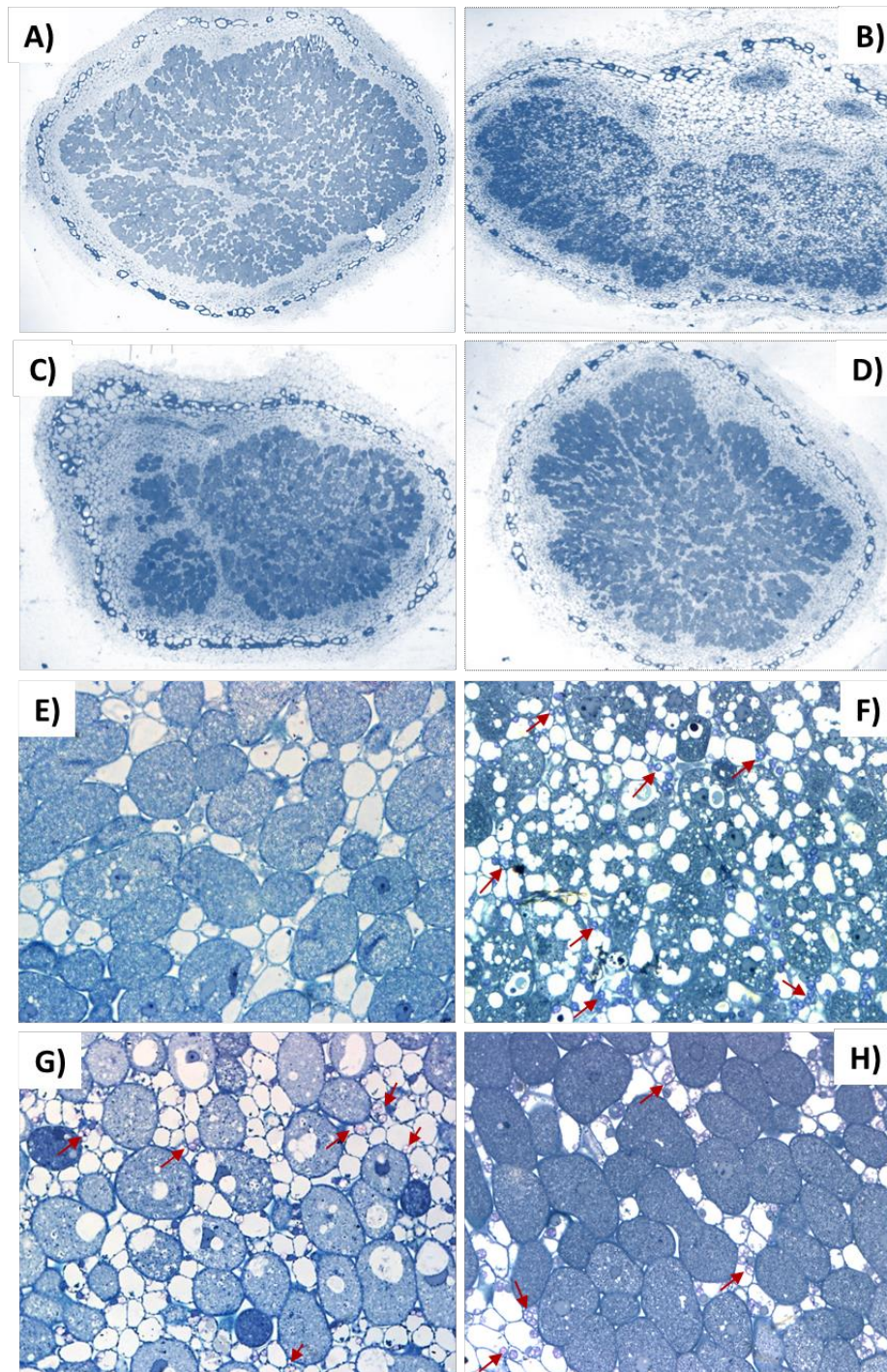


Figura VII.3 Microscopía óptica de cortes transversales de nódulos de soja (*Glycine max*) ocupados por las cepas *B. diazoefficiens* USDA 110 (**A y E**), $\Delta glnB$ (**B y F**), $\Delta glnK1$ (**C y G**) y $\Delta glnK2$ (**D y H**). Las imágenes A, B, C y D tienen una magnificación de 40X y las imágenes E, F, G y H de 400X. Las flechas en rojo señalan algunos de los gránulos de almidón encontrados en las cepas mutantes.

Al realizar un análisis más detallado de estas imágenes pudimos detectar que los nódulos de todas las cepas mutantes evaluadas presentaban una gran acumulación de gránulos de almidón (algunos de ellos indicados en la **Figura VII.3** con flechas rojas). En particular, los nódulos invadidos por la cepa $\Delta glnB$ presentaron la mayor cantidad de gránulos (**Figura VII.3- Panel F**). Sin embargo, los nódulos invadidos tanto por $\Delta glnK1$ como por $\Delta glnK2$ también mostraron un aumento en la cantidad de gránulos de almidón en relación a la cepa salvaje pero no tan significativos como $\Delta glnB$ (**Figura VII.3- Paneles G y H**).

Este aumento en la cantidad de almidón disponible dentro del nódulo podría estar indicando que los compuestos carbonados que la planta le brinda al bacteroide no son utilizados en su totalidad por las cepas mutantes probablemente debido a un desbalance de su metabolismo de C y N. Este fenotipo había sido descrito previamente para cepas mutantes en *glnB* de *E. meliloti* 2011 (Arcondéguy *et al.*, 1997). Sin embargo, la vinculación entre las proteínas PII y los acúmulos de almidón aún no se ha investigado. Este desbalance de C observado nos conduce a pensar nuevamente que las 3 proteínas PII de *B. diazoefficiens* son funcionales, y en este caso parecieran ser importantes para regular el metabolismo de N dentro del bacteroide.

Finalmente, analizamos los mismos cortes de nódulos mediante microscopía electrónica, y observamos que efectivamente la ultraestructura de los nódulos obtenidos de plantas inoculadas con $\Delta glnB$ difieren drásticamente de la obtenida de nódulos invadidos por la cepa salvaje (**Figura VII.4**). En este sentido, en los nódulos ocupados por $\Delta glnB$ sólo pudieron encontrarse unos pocos bacteroides en simbiosomas, con grandes vacuolas vegetales y gran cantidad de tejido necrótico (**Figura VII.4- Paneles E y F**), lo que puede interpretarse como bacteroides lisados, constituyendo en su conjunto compartimentos "líticos", señal típica de degradación (Werner *et al.*, 1984). Estos resultados fueron coincidentes con el fenotipo macroscópico observado en las plantas inoculadas con esta cepa, donde se detectó un menor desarrollo de la parte aérea y con un color amarillento similar al de las plantas sin inocular, indicando en conjunto la ausencia de la fijación de N_2 . Además, la presencia de hilos de infección (**Figura VII.4- Paneles F**) y de bacteroides en los simbiosomas nos sugiere que probablemente la ausencia de *GlnB* no afecte el proceso de invasión del nódulo, sino a la supervivencia del bacteroide en el interior del mismo. Sin embargo, es necesario

profundizar los estudios del fenotipo de $\Delta glnB$ en simbiosis para esclarecer esta hipótesis.

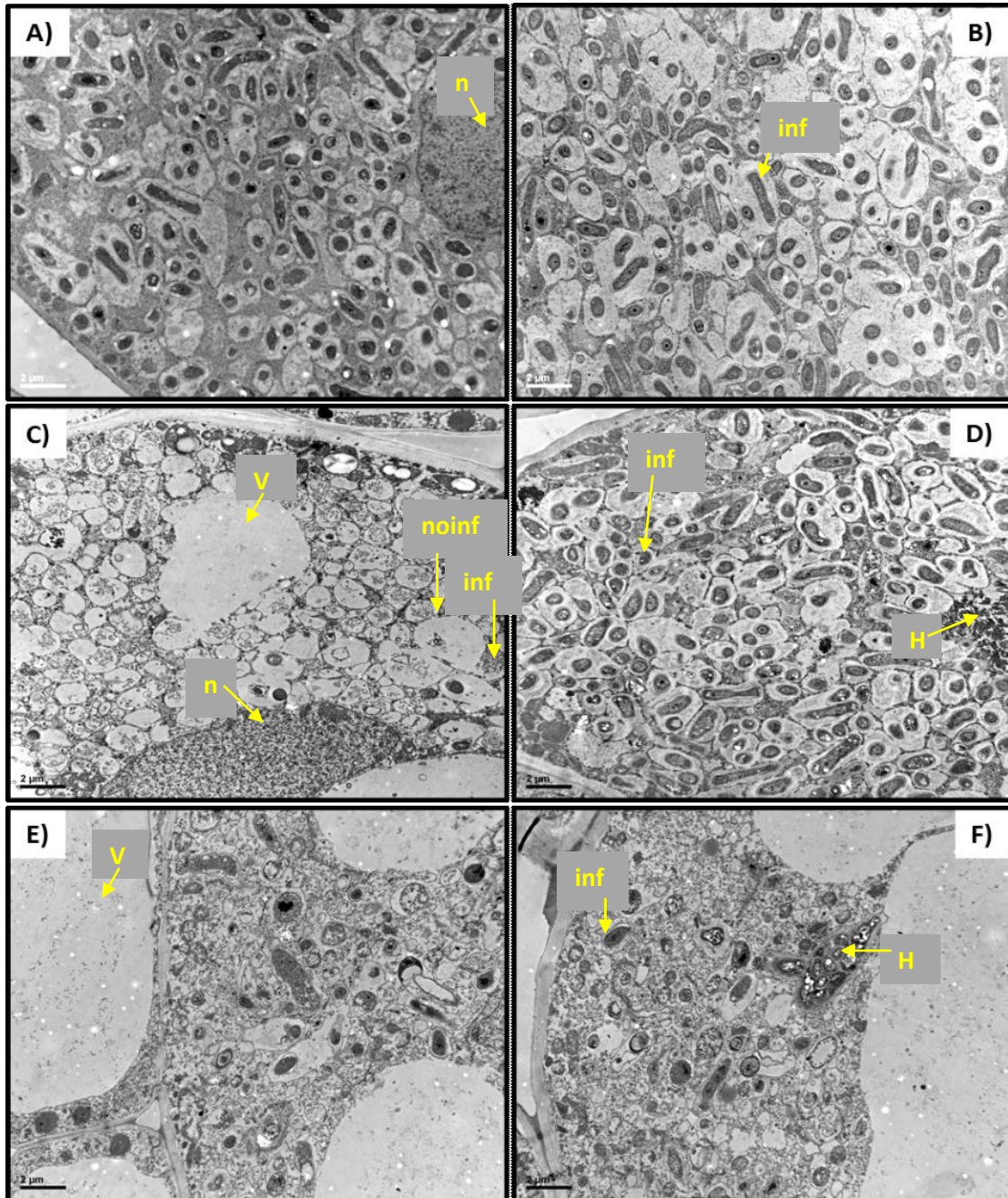


Figura VII.4 Microscopía electrónica de nódulos de soja (*G. max*) ocupados por las cepas *B. diazoefficiens* USDA 110 (A), $\Delta glnK2$ (B), $\Delta glnK1$ (C y D), $\Delta glnB$ (E y F). Los paneles C y D muestran la diferencia de ocupación observada en distintas zonas de un mismo nódulo para la cepa $\Delta glnK1$. Las barras en el interior de la imagen corresponden a 2 μ m. Las imágenes tienen una magnificación de 10.000X. En los paneles se marcan: (inf) simbiosomas infectados, (noinf) sin infectar, (n) núcleo celular, (H) hilos de infección y (V) vacuolas vegetales.

Por otra parte, al analizar la ultraestructura de los nódulos ocupados con la cepa *ΔglnK1* se encontró que efectivamente algunas zonas eran similares a los nódulos invadidos por la cepa salvaje y otras zonas se encontraban mayoritariamente células vacías y sólo algunas de ellas con escasos o nulos bacteroides (**Figura VII.4- Paneles C y D**). Sin embargo, basándonos en los datos obtenidos en este trabajo de Tesis parecería que esta disminución en la ocupación de los nódulos no afecta el proceso de fijación de N₂ (**Tabla VII.1**).

Finalmente, la ultraestructura de los nódulos obtenidos de plantas inoculadas con la cepa *ΔglnK2* resultaron similares a la de los nódulos invadidos por *B. diazoefficiens* USDA 110 (**Figura VII.4- Panel B**).

VII.3 Resumen y Discusión

La determinación de los factores que influyen directamente en el desarrollo de las distintas etapas de la interacción rizobio-leguminosa, es objeto continuo de investigación por diferentes grupos de trabajo. En particular, se realizan muchos esfuerzos para optimizar la simbiosis *B. diazoefficiens* - soja, dada la importancia de este cultivo a nivel mundial, y en particular en nuestro país.

En este capítulo evaluamos el rol de las proteínas PII en dicha interacción simbiótica y la posterior fijación de N₂. La importancia de las proteínas PII en bacteroides de *B. diazoefficiens* aún no había sido estudiada, sin embargo, estudios de transcriptómica realizado por Pessi y colaboradores (2007), determinaron que los niveles de *glnK1* aumentan 9 veces en el bacteroide en relación a la bacteria en vida libre, y que la inducción de este gen se encuentra regulado a través del factor σ_{54} . Además, en el 2010 Delmotte y colaboradores detectaron a partir de estudios proteómicos la presencia de GlnB y GlnK1 en bacteroides de *B. diazoefficiens*, sugiriendo que estas proteínas cumplen un rol determinado en el metabolismo de la bacteria dentro del nódulo.

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral resultaron concordantes con estos antecedentes previos. En este sentido, determinamos que la cepa mutante *ΔglnB* produce un fenotipo alterado de la nodulación, presentando un menor número de nódulos más pequeños y blanquecinos (pseudonódulos) (**Figura VII.2 - Panel B**). El análisis microscópico demostró que los mismos tenían un grado de ocupación mucho

menor (**Figura VII.3 - Panel B y F**) y que contenían, principalmente, tejidos necróticos, con grandes vacuolas vegetales y escasos bacteroides (**Figura VII.4 - Paneles E y F**). Estas observaciones también se correlacionaron claramente con una disminución de la fijación de N_2 de esta cepa, lo que trajo aparejado plantas pequeñas y con una coloración amarillenta, signos típicos de una deficiencia de N en el cultivo de la leguminosa. Estos resultados sugieren que GlnB es importante para el desarrollo y morfogénesis de los nódulos como así también para la subsistencia del bacteroide en su interior. Además, GlnB no sólo estaría cumpliendo un rol esencial en el metabolismo de N del rizobio en vida libre sino también parecería ser fundamental cuando éste último se encuentra en el interior del nódulo.

Por su parte, GlnK1 también pareciera influir en el proceso de invasión del nódulo, principalmente debido a la menor ocupación observada en los cortes de nódulos de plantas inoculadas con la cepa $\Delta glnK1$ (**Figura VII.3 - Panel C y G**). Sin embargo, el fenotipo observado en las plantas inoculadas con esta cepa mutante (plantas de color verde oscuro y de similar tamaño a las inoculadas con la cepa salvaje) y la cantidad y aspecto macroscópico de los nódulos junto con la medida de la cantidad de ureídos en hojas (**Tabla VII.1**), nos indica que la fijación biológica de N_2 no se ve alterada por la menor ocupación. En este caso, no logramos esclarecer cuál sería la función de GlnK1 en este proceso.

Finalmente, GlnK2 no afecta los procesos de nodulación y fijación de N_2 , ya que no se observó ninguna diferencia significativa en relación a las plantas inoculadas con *B. diazoefficiens* USDA 110, indicando que esta proteína no está involucrada en la simbiosis.

Por otra parte, otro dato llamativo fue que los nódulos invadidos por las cepas mutantes mostraron una acumulación de gránulos de almidón inusual, en particular la cepa $\Delta glnB$ (**Figura VII.3 – Paneles E, F, G y H**). Los compuestos carbonados brindados por la planta se transportan al nódulo en forma de sacarosa (Streeter, 1981; Reibach y Streeter, 1983; Gordon *et al.*, 1985; Kouchi y Yoneyama, 1986; Streeter, 1987) y una vez en el interior de la célula vegetal infectada, la sacarosa se convierte principalmente en malato, succinato y fumarato (Ledwig y Poole, 2003). Estos ácidos dicarboxílicos son transportados al interior del bacteroide a través de sistemas específicos (Ledwig y Poole, 2003) y son utilizados para adquirir la energía necesaria para llevar a cabo la fijación de

N₂ y para satisfacer sus demandas metabólicas (Forrest *et al.*, 1991). Cuando los bacteroides no utilizan estos compuestos, la sacarosa que ingresa a la célula vegetal infectada se almacena en forma de almidón (Thummlerf y Vermad, 1987; Vermad, 1989).

En base a estos datos bibliográficos podemos pensar que la presencia de gránulos de almidón en las cepas mutantes en las proteínas GlnK podría deberse a un desbalance metabólico de los bacteroides que los conduzca a consumir una menor cantidad de ácidos dicarboxílicos, aunque suficiente para llevar a cabo la fijación biológica de N₂ de igual manera que la cepa salvaje. En el caso del mutante en GlnB la acumulación de gránulos de almidón es mucho más exacerbada, lo que se correlaciona con la escasez de bacteroides presentes en el nódulo y la ausencia de fijación de N₂.

Los resultados obtenidos a partir del presente trabajo abren un abanico de nuevos interrogantes acerca de la función de las proteínas PII en la simbiosis. Con las observaciones realizadas, se puede hipotetizar que GlnB es esencial para la bacteria en sus dos estadios, regulando (directa o indirectamente) los metabolismos de C y N no sólo en vida libre sino también dentro del nódulo. De esta manera, GlnB está sujeta a un control de regulación más fino que conduce a que esta PII siga activa en el bacteroide. Sería interesante a futuro identificar cuáles son las proteínas que regulan las PII durante el proceso de diferenciación del nódulo, y luego dentro del mismo, con el fin de encontrar una explicación al rol que poseen estas proteínas en la fijación simbiótica de N₂.

Capítulo VIII

**Discusión y
Perspectivas**



VIII.1 Discusión general

La increíble habilidad que poseen los microorganismos para adaptarse a los diversos ambientes se debe en gran parte a la versatilidad de sus metabolismos. En este sentido, los microorganismos que habitan en el suelo, y en particular las bacterias, están sometidos a una amplia variedad de estreses ambientales y, debido a su pequeño tamaño y a su elevada relación superficie / volumen, cualquier cambio ambiental impacta en su estado metabólico rápidamente. Ante esta situación desfavorable que podría resultar en el daño de componentes vitales de la célula, las bacterias han desarrollado respuestas adaptativas que les permiten monitorear su entorno y desencadenar cambios en la regulación de sus actividades metabólicas, mediante la activación de cascadas de señalización con el objetivo de contrarrestar las perturbaciones que pueden sufrir.

Existe abundante literatura referida a los efectos y consecuencias del estrés ambiental sobre la viabilidad bacteriana (Rice *et al.*, 1977; Lowendorf *et al.*, 1981; Crist *et al.*, 1984; Brockwell *et al.*, 1995; Foster, 2000; Sadowsky, 2005; Lebrazi *et al.*, 2014; Kajić *et al.*, 2016). La escasez de N, a la que están expuestos los rizobios en los suelos agrícolas, es uno de los estreses ambientales más frecuentes, y en esas condiciones pueden llevar a cabo la simbiosis fijadora de N₂ con las leguminosas. En este sentido, el cultivo de *Bradyrhizobium diazoefficiens* en un medio con una alta relación C/N provoca que estos rizobios se vuelvan más infectivos y competitivos para la formación de nódulos cuando son utilizados para inocular semillas de soja (López-García *et al.*, 2001). Esto ocurre en parte gracias a que, en dichas condiciones de cultivo, las bacterias se enfrentan a una limitación metabólica en N que conduce a un desbalance de los *pooles* de C y N intracelular, lo que lleva a un direccionamiento del exceso de C hacia la acumulación preferencial de polisacáridos extracelulares (PSE) (López-García *et al.*, 2001; Quelas *et al.*, 2006), los cuales mejoran la adhesividad a las raíces de soja (López-García *et al.*, 2001). Así, nos resultó importante conocer en profundidad la regulación del metabolismo del N en este rizobio, con el fin último de aprovechar racionalmente el efecto de aquella condición en un establecimiento más eficiente de la simbiosis.

Sobre la base de las consideraciones anteriores, en este Trabajo de Tesis nos centramos en avanzar en la caracterización funcional de dos grupos de proteínas fundamentales de

la cascada de respuesta que se activa frente al estrés por N (NSR): las proteínas de señalización PII (GlnB y GlnK) y las enzimas responsables de la asimilación de NH_4^+ , las glutamino sintetasas (GS). Estas proteínas han sido descritas en profundidad para bacterias entéricas como *E. coli* o rizobios como *E. meliloti*, pero muy poco se conocía acerca de su rol en nuestra bacteria de estudio, *B. diazoefficiens* USDA 110.

Nuestro primer desafío fue formular variantes del medio de cultivo, que nos permitieran estudiar el comportamiento de nuestra cepa de interés en condiciones de exceso o limitación de N en las cuales el sistema NSR se encuentre apagado o prendido, respectivamente. Así, seleccionamos dos formulaciones para evaluar la escasez de N que denominamos **Evans Glutamato** (utilizando como única fuente de N glutamato de sodio) y **Evans NH_4^+** (utilizando NH_4Cl como única fuente de N); y una variante con exceso de N que llamamos **Evans NG** (NH_4Cl y glutamato de sodio como fuentes de N).

La caracterización fenotípica de *B. diazoefficiens* USDA 110 en estos tres medios nos permitió demostrar que esta bacteria cultivada en Evans Glutamato o Evans NH_4^+ presenta una disminución de su velocidad de crecimiento y de la biomasa final alcanzada (**Figura III.9** y **Tabla III.3**), así como también un aumento de transcriptos del gen *glnII* (**Figura III. 11**) y un aumento de actividad enzimática GS total (**Figura III. 12**). Estos datos nos permitieron confirmar que, en esas condiciones de cultivo, *B. diazoefficiens* activa su NSR para adaptarse a las condiciones adversas y subsistir en ellas.

Al iniciar con nuestros estudios de las proteínas GS sorprendentemente encontramos 4 copias del gen *glnA* (que codifica GSI) en el genoma de *B. diazoefficiens*. La presencia de múltiples copias de un mismo gen es una particularidad muy común de este rizobio. Un ejemplo de este fenómeno fue descrito en nuestro grupo de trabajo por Quelas y colaboradores (2013), quienes demostraron que *B. diazoefficiens* USDA 110 posee cinco polihidrobutirato sintetasas (PhaC), y sin embargo sólo dos de ellas se expresan y codifican para una enzima funcional que sintetiza PHB. A pesar de ser un fenómeno recurrente, hasta el momento aún permanece como una gran incógnita por qué ocurren estas multiplicaciones génicas en *B. diazoefficiens*.

En nuestro caso, mediante un análisis *in silico* pudimos demostrar que las copias GlnA1 y GlnA2 tienen mayor similitud de secuencia que el resto de las copias de GSI (**Figuras IV.2** y **IV.3**). Además, la distribución de *clusters* obtenida al realizar el análisis filogenético sugirió que la copia GlnA2 pareciera ser parte, junto con GlnA1, de las

enzimas pertenecientes a la isoforma GSI, mientras que las copias GlnA3 y GlnA4 podrían estar formando parte de una familia diferente de glutamino sintetasas (**Figura IV.6**). En este sentido, dichas copias se agruparon en el mismo *cluster* que la isoforma GSIII de *E. meliloti* (**Figura IV.6**). Por otra parte, las grandes diferencias encontradas entre la secuencia de las copias GlnA4 y GlnA1 nos conducen a pensar que probablemente la copia GlnA4 no se encuentra involucrada en la asimilación de NH_4^+ en *B. diazoefficiens*. Sin embargo, es necesario ahondar en el estudio de esta copia para confirmar nuestra hipótesis.

Desde el punto de vista funcional, pudimos demostrar que las diferentes copias de GS pueden reemplazarse entre ellas para cumplir su objetivo final de asimilar NH_4^+ y permitir el crecimiento bacteriano, aún en condiciones de limitación de dicho nutriente (**Figuras V.1 y V.2**). Llamativamente, a pesar de que la enzima GSII ha sido ampliamente descrita como la responsable de la asimilación de NH_4^+ en condiciones de inanición de este nutriente (Carlson *et al.*, 1987), la cepa mutante en dicha isoforma no presentó un fenotipo diferencial con respecto a la cepa salvaje al evaluar su cinética de crecimiento en medios limitados en N (**Figuras V.2**), indicando que alguna de las otras copias de la isoforma GSI se encontraba reemplazándola. Estos datos son coincidentes con lo observado en *R. etli* y *E. meliloti*, donde la delección individual de alguno de los genes que codifican para las distintas isoformas GS (*glnA*, *glnII* o *glnT*) tampoco genera deficiencias en el crecimiento bacteriano (Espín *et al.*, 1994).

Desde el punto de vista estructural, se ha demostrado mediante estudios de microscopía electrónica que la GS de *E. coli* es un agregado simétrico de 12 subunidades idénticas dispuestas en dos capas hexagonales (Valentine *et al.*, 1968). La isoforma GSI de *B. diazoefficiens*, y en particular GlnA1 tiene una alta homología de secuencia y es muy similar en cuanto a sus propiedades bioquímicas con la GS de *E. coli* (Carlson *et al.*, 1985), por lo que se podría asumir que también se encuentra formando agregados de 12 subunidades. Esta hipótesis está también apoyada por los resultados de los programas de modelados tridimensionales que predicen para la GSI de *B. diazoefficiens* estructuras de dodecámeros. En base a estas características de la isoforma GSI y teniendo en cuenta la alta similitud entre las copias GlnA1 y GlnA2 de *B. diazoefficiens* que hemos descrito mediante los análisis *in silico* (**Capítulo IV**), los resultados obtenidos nos conducen a hipotetizar que las copias GlnA1 y GlnA2 podrían estar formando parte de

heteromultímeros. En nuestros estudios hemos observado que la ausencia de la copia GlnA2 produce una disminución de la actividad específica de GlnA1 en aquellos medios que contienen NH_4^+ (**Figuras V.3- Panel A, V.4 Y V.8**). Esto nos lleva a proponer que, de alguna manera aún no descrita, GlnA2 podría estar cumpliendo un rol regulatorio importante sobre la copia GlnA1 y esta regulación podría darse mediante su participación en dichos multímeros. Además, nos resultó interesante que esta aparente regulación sólo pudo observarse en presencia de NH_4^+ pero no así en presencia de glutamato (**Figuras V.3- Panel B**), indicando que la copia GlnA2 no sería relevante cuando dicho compuesto es la única fuente nitrogenada disponible. En este sentido, ya ha sido previamente reportado que la isoforma GSI es activada de manera diferencial en base a la fuente nitrogenada en la que es cultivada la bacteria. En particular, en *R. leguminosarum* se ha descrito que la actividad GSI es 2 veces mayor cuando dicha bacteria se cultiva en NH_4^+ que cuando se cultiva en glutamato (Rossi *et al.*, 1989; Chiurazzi *et al.*, 1990). Lo inverso fue reportado para *R. etli*, donde se observó que la activación de GSI es mayor en presencia de glutamato que en NH_4^+ (Moreno *et al.*, 1991). En base a estos antecedentes, no sería ilógico pensar que la inducción o la activación de la copia GlnA2 en *B. diazoefficiens* también podría estar regulada por la fuente de N, en particular, por la presencia y/o ausencia de NH_4^+ . Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo no son suficientes para dilucidar la función específica que se encuentra cumpliendo la copia GlnA2, por lo que esta afirmación debería probarse mediante alguna otra estrategia experimental.

Por otro lado, otro dato llamativo fue que, en condiciones de limitación de N, la delección tanto individual como en conjunto de las copias GlnA1 y GlnA2 mostraron una menor actividad GS total en relación a la cepa salvaje, sobre todo cuando las cepas eran cultivadas en Evans NH_4^+ (**Figura V.5 – Panel A**). Por el contrario, en presencia de glutamato como única fuente nitrogenada, únicamente la copia GlnA1 mostró una disminución de la actividad GS total (**Figura V.5 – Panel B**), indicando que las copias GlnA1 y GlnA2 son importantes no sólo en condiciones suficientes de N sino también en condiciones limitantes de dicho nutriente. Nuevamente, la copia GlnA2 pareciera ser más relevante en presencia de NH_4^+ . Estos resultados nos resultaron sorprendentes debido a que los reportes bibliográficos destacan la importancia de la isoforma GSII en estas condiciones de limitación de N; incluso en *B. diazoefficiens* la inducción de *glnII*

ocurre cuando las bacterias se cultivan en NH_4^+ o glutamato limitante (Carlson *et al.*, 1987; Franck *et al.*, 2015). Sin embargo, la caracterización fenotípica de la cepa ΔglnII en medios limitados en N no arrojó ningún resultado diferencial con respecto al fenotipo de la cepa salvaje (**Figuras V.3 y V.5**). Llamativamente, este fenotipo se revierte cuando la bacteria se encuentra en una situación muy extrema de limitación de N, como es el medio Evans Bajo N (C/N= 3333). En este caso, la ausencia de *glnII* provoca un aumento exacerbado de la actividad de GlnA1 para lograr sobrevivir en esas condiciones muy desfavorables para la bacteria (**Figuras V.4**). Por lo tanto, parecería haber varios niveles de regulación de estas enzimas según las disponibilidades metabólicas. Sin embargo, aún no hemos podido cuantificar los niveles de transcripto de *glnA1* en Evans Bajo N en este mutante para confirmar esta hipótesis.

Conjuntamente con estos resultados, también pudimos demostrar que la ausencia de la copia GlnA1 podría ser suplida por la isoforma GSII, incluso en condiciones de exceso de N donde *glnII* no debería expresarse. En base a esto, observamos que, con excepción del medio limitado Evans NH_4^+ (**Figuras V.6**), en todos los medios evaluados la ausencia de la copia *glnA1* conduce a un aumento en los niveles de transcriptos de *glnII* (**Figuras V.7 y V.9**).

Finalmente, los datos obtenidos en este trabajo nos sugieren que la copia GlnA3, al menos en las condiciones ensayadas, no sería parte del metabolismo de N en *B. diazoefficiens*. En este sentido, y considerando que en el árbol filogenético esta enzima se agrupó en el *cluster* donde encontramos la isoforma GSIII de *E. meliloti*, probablemente las características de GlnA3 difieran del resto de las copias de GSI. En particular, se ha descrito que la isoforma GSIII en *E. meliloti* no tiene actividad transferasa y su afinidad por el NH_4^+ o el glutamato es muy baja (Espín *et al.*, 1994). De esta manera, se ha sugerido que la función primaria de dicha isoforma no sería la de asimilar NH_4^+ sino alguna otra aún no dilucidada (Shatters *et al.*, 1993). En *B. diazoefficiens* la copia GlnA3 también podría estar cumpliendo un rol secundario dentro del metabolismo bacteriano, sin embargo, los ensayos llevados a cabo en este trabajo de Tesis no son suficientes para dilucidarlo.

Tomados en conjunto, nuestros resultados nos indican que a pesar de la existencia de múltiples copias o isoformas de la enzima GS, la asimilación de NH_4^+ en *B. diazoefficiens* parecería ser llevada a cabo principalmente por las copias GlnA1 y GlnA2 de la isoforma

GSI y por la isoforma GSII. Mientras que en presencia de glutamato como única fuente nitrogenada sólo GlnA1 y GSII serían relevantes, probablemente debido a una activación diferencial de las copias de la isoforma GSI en respuesta a la disponibilidad de NH_4^+ . Sin embargo, y dada la gran complejidad de la red metabólica de la cual son parte estas enzimas, es necesario profundizar nuestros estudios para lograr una idea más certera sobre la función que cada una de estas copias posee en la asimilación de NH_4^+ en *B. diazoefficiens*.

En la segunda parte de nuestro trabajo nos enfocamos en el estudio de las proteínas de señalización PII, principales encargadas de detectar los niveles intracelulares de C y N y de transmitir la señal con el último fin de aumentar o disminuir la actividad GS, y por ende la asimilación de NH_4^+ según las necesidades de la bacteria.

El análisis del genoma de *B. diazoefficiens* nuevamente nos permitió encontrar una duplicación génica, en este caso para el par de genes *glnK-amtB*. Por el momento, esta duplicación no se ha descrito en ningún otro rizobio, en cambio sí se ha detectado en arqueas y en bacterias fijadoras de N_2 en vida libre (Zhang *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2003; Connelly *et al.*, 2006; Pedro-Roig *et al.*, 2011).

En *B. diazoefficiens* pudimos evidenciar que el par *glnK1-amtB1* se encuentra formando parte de un operón como en la mayoría de los microorganismos estudiados (Thomas *et al.*, 2000a), mientras que el par *glnK2-amtB2* mostró ser una excepción expresándose de manera independiente (**Figura VI.6**). Hasta el momento, esta expresión diferencial sólo se había descrito en archeas como *Methanococcus jannaschii*, la cual también posee dos copias de este par génico *glnK-amtB* (Thomas *et al.*, 2000a).

A diferencia de lo que ocurre en otras bacterias, nuestros resultados mostraron que, en *B. diazoefficiens* en presencia de NH_4^+ y en una condición con cantidades suficientes de N como es el medio de Evans, todos los genes de las copias de PII (*glnB*, *glnK1*, *glnK2*) como de los transportadores de amonio (*amtB1* y *amtB2*) se encuentran expresados (**Figura VI.5**). En este sentido, se pudo detectar que los genes mencionados no poseen una expresión diferencial según la fuente de N o la disponibilidad de la misma (Ninfa y Atkinson, 2000; Pedro-Roig *et al.*, 2013; Gosztolai *et al.*, 2017).

Mediante un análisis *in silico* de las secuencias de las proteínas PII pudimos determinar los altos niveles de homología entre ellas (**Figura VI.1**). Sin embargo, el análisis de las secuencias de las dos copias del transportador de amonio (**Figura VI.3, VI.4, Anexo 1**)

nos llevó a pensar que la copia *amtB2* podría estar mal asignada en la base de datos. Otra hipótesis que suponemos para este gen es que puede haber sufrido una inserción en algún momento de la evolución y podría no ser funcional, ya que en la mitad de su secuencia contiene una citosina adicional que produce un corrimiento del marco de lectura (**Figura VI.4 y Anexo 1**). El esclarecimiento de estas hipótesis será abordado en un futuro.

En este trabajo demostramos que, sorprendentemente, GlnB es de gran importancia para el crecimiento bacteriano bajo cantidades suficientes de N (**Figura VI.13 y Tabla VI.1**). Probablemente el rol de esta proteína esté relacionado con la detección inicial de las cantidades de glutamina y α -cetoglutarato intracelulares (indicadores de los niveles de C y N dentro de la célula) y la puesta en marcha del metabolismo de N. Asimismo, nuestros resultados sugieren que la función que lleva a cabo GlnB puede ser suplida por alguna de las otras proteínas PII que encontramos en *B. diazoefficiens*, ya que finalmente esta bacteria demostró adaptarse a la ausencia de GlnB en estos medios y alcanzar una biomasa final equivalente a la de la cepa salvaje (**Figura VI.13 y Tabla VI.1**). Esta hipótesis se correlaciona con el aumento de transcritos de *glnK1* durante los primeros días de crecimiento de la cepa mutante Δ *glnB*, lo que estaría indicando que la ausencia de GlnB podría ser reemplazada por GlnK1 (**Tabla VI.3**).

Como describimos en el **Capítulo I**, el blanco final de la cascada NSR y por ende de las proteínas PII son las enzimas GS. El análisis de estas enzimas en las cepas mutantes en PII nos permitió asignarle un rol diferencial a GlnB y GlnK. En este caso pudimos observar que GlnK y GlnB poseen un efecto contrario: las proteínas GlnK (tanto GlnK1 como GlnK2) parecerían tener un efecto atenuante sobre la actividad de la enzima GSI, mientras que GlnB no sólo no puede reemplazar esta función, sino que pareciera tener un efecto positivo sobre la actividad específica de esta enzima (**Figura VI.15**). También pudimos detectar una influencia de estas proteínas sobre la expresión de *glnA1* y *glnII* (**Tabla VI.4**); sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento no son suficientes para describir el mecanismo mediante el cual se lleva a cabo esta regulación.

De manera concordante con las diferencias observadas al determinar la actividad enzimática GSI, pudimos detectar que en la cepa Δ *glnB* la incorporación de NH_4^+ se lleva a cabo de manera mucho lenta que en la cepa parental, aunque con el pasar del tiempo, Δ *glnB* es capaz de asimilar casi la misma cantidad de NH_4^+ que la cepa salvaje (**Tabla**

VI.5), indicando que la copia de PII que está reemplazando la falta de GlnB es mucho menos eficiente en la activación de la asimilación de dicho nutriente.

Estudios previos han demostrado que en *E. coli* la regulación de la adeniltransferasa/adenilremovasa GlnE (encargada de activar o inactivar a GSI) mediada por GlnK es mucho menos efectiva que la regulación mediada por GlnB (Jiang *et al.*, 1997; Atkinson *et al.*, 1999). Si en *B. diazoefficiens* también es así, entonces, el retraso en el crecimiento y en la asimilación de NH_4^+ que determinamos en la cepa mutante ΔglnB podría ser también el resultado de la ineficiencia que posee GlnK para activar y poner en funcionamiento el metabolismo de N.

Otra posible explicación de estos resultados se basa en la ampliamente conservada interacción de GlnK con los transportadores de amonio AmtB. Suponiendo que en *B. diazoefficiens* esta interacción también se lleve a cabo, el aumento de transcritos de *glnK1* que observamos en la cepa ΔglnB (**Tabla VI.3**) podría conducir a un aumento en los niveles de proteínas GlnK1. Estas proteínas podrían unirse a los transportadores AmtB lo que llevaría a la disminución del ingreso de NH_4^+ al interior celular, y como consecuencia la asimilación del NH_4^+ se reduciría (**Tabla VI.5**), provocando finalmente, el retardo en la velocidad de crecimiento de ΔglnB (**Figura V.1**). Sin embargo, es necesario profundizar nuestros estudios para confirmar estas hipótesis. En este sentido, hemos avanzado en la construcción de un vector que sobreexpresa el gen *glnK1* en la cepa salvaje, para tratar de determinar si el aumento en GlnK1 conduce a una disminución del ingreso de NH_4^+ a la bacteria probablemente por un aumento en la unión de esta proteína con los transportadores de NH_4^+ . La obtención del vector se realizó en el marco de un trabajo final de Licenciatura de la Srta. Valentina Cajiao Checchin, bajo la dirección conjunta de Florencia Lamelza y Silvina López-García (Cajiao Checchin V. C., 2018).

Por otra parte, la función que cumplen las proteínas GlnK podría ser reemplazada prácticamente en su totalidad por GlnB cuando las bacterias se cultivan en suficiencia de NH_4^+ o en glutamato, ya que la deleción conjunta de las dos copias de *glnK* no mostró un fenotipo drástico (**Figura VI.13 y VI.14**), indicando que a pesar de que estas proteínas son funcionales, no son esenciales para el crecimiento de la bacteria. Sin embargo, los niveles de transcritos de *glnB* en dicho mutante no se vieron afectados (**Tabla VI.3**), sugiriendo que esta regulación se debe a un aumento en la activación de la misma.

Además, si en *B. diazoefficiens* ocurre lo mismo que en *E. coli*, los trímeros de GlnB serían más eficientes que los de GlnK, entonces probablemente ni siquiera sea necesario una mayor activación de estas últimas para suplir la ausencia de las GlnKs. Sin embargo, no sucede lo mismo cuando las bacterias se cultivan bajo escasez de NH_4^+ . En este caso, la ausencia de las 2 copias de GlnK produjo una disminución de la velocidad específica de crecimiento (**Tabla VI.3**) con respecto a la cepa parental, lo que indicaría que en esta condición de cultivo la función de GlnB no sería suficiente para el crecimiento de la bacteria. Resta aún evaluar los niveles de transcripto de *glnB* en este mutante en limitación de NH_4^+ .

Finalmente, y en relación a la interacción simbiótica entre los rizobios y las plantas de soja hemos podido determinar que GlnB juega un rol relevante en la simbiosis. Estas observaciones resultaron interesantes dada la relevancia agronómica que posee el cultivo de esta leguminosa. En particular, nuestros resultados nos permitieron describir a GlnB como una proteína que participa (directa o indirectamente) en el desarrollo de nódulos funcionales, ya que al inocular plantas de soja con la cepa mutante $\Delta glnB$ los nódulos obtenidos resultaron pequeños y blanquecinos (**Figura VII.2**). Asimismo, la ultraestructura de los nódulos obtenidos de plantas inoculadas con la misma cepa mutante demostró que los mismos contenían tejidos necróticos, con grandes vacuolas vegetales y escasos bacteroides (**Figuras VII.3 y VII.4**). Esto se correlaciona con el fenotipo de la parte aérea de dichas plantas que presentaron un color amarillento y menor tamaño, indicando en conjunto una menor fijación de N_2 (**Tabla VII.1**). Sin embargo, nuestros resultados parecen ser contradictorios con los obtenidos para *E. meliloti*, ya que Yurgel y colaboradores (2010) demostraron que las proteínas PII no parecen tener un rol directo en la simbiosis con plantas de alfalfa.

Por su parte, GlnK1 pareciera cumplir algún rol, aún no definido, en la interacción simbiótica principalmente debido a la menor ocupación observada en los cortes de nódulos de plantas inoculadas con la cepa $\Delta glnK1$ (**Figura VII.3 – Panel G**). A pesar de ello, la fijación biológica de N_2 en las plantas inoculadas con dicha cepa no se vio alterada (**Tabla VII.1**). En este sentido, se han reportado varios antecedentes que indican que las PII son las principales responsables de inducir la expresión de los genes *nif* para expresar el complejo de la nitrogenasa y llevar a cabo la fijación biológica de N_2 (Zhang *et al.*, 2000; Noindorf *et al.*, 2011), por lo que en nuestro caso, quizás, la menor ocupación de

los nódulos podría estar siendo compensada con un aumento en la transcripción de los genes *nif* lo que trae aparejado un aumento en la actividad nitrogenasa. Sin embargo, esta hipótesis será evaluada en un futuro en el laboratorio.

Una observación interesante fue la detección de grandes cantidades de acúmulos de almidón en las células vegetales infectadas por las cepas mutantes en las proteínas PII (**Figura VII.3**), éstos parecerían indicar un desbalance en el metabolismo del C del bacteroide. En relación a esto, los bacteroides utilizan los compuestos carbonados que la planta le brinda en forma de ácidos dicarboxílicos. Estos compuestos ingresan al bacteroide a través de transportadores específicos denominados Dct, que se encuentran codificados por los genes *dctA* y cuya expresión depende del factor σ_{54} (Lodwig y Poole, 2003). Además, se ha visto en *E. coli* que la expresión de estos transportadores se encuentra regulada por el sistema de dos componentes NtrBC (Allaway *et al.*, 1995), el cual además se encuentra bajo la regulación de las proteínas PII. Estos antecedentes nos conducen a pensar que las PII de *B. diazoefficiens* podrían encontrarse regulando la expresión de estos transportadores y por lo tanto, el ingreso de los ácidos dicarboxílicos al interior del bacteroide. Por ello, la ausencia de alguna de estas proteínas podría generar una disminución del ingreso de estos compuestos carbonados y como consecuencia se produciría la acumulación de los mismos como gránulos de almidón en el citoplasma de la célula vegetal infectada. Sin embargo, probablemente las PII se encuentren formando parte de la regulación de más de un gen y el fenotipo observado sea la sumatoria del desbalance de dicha regulación.

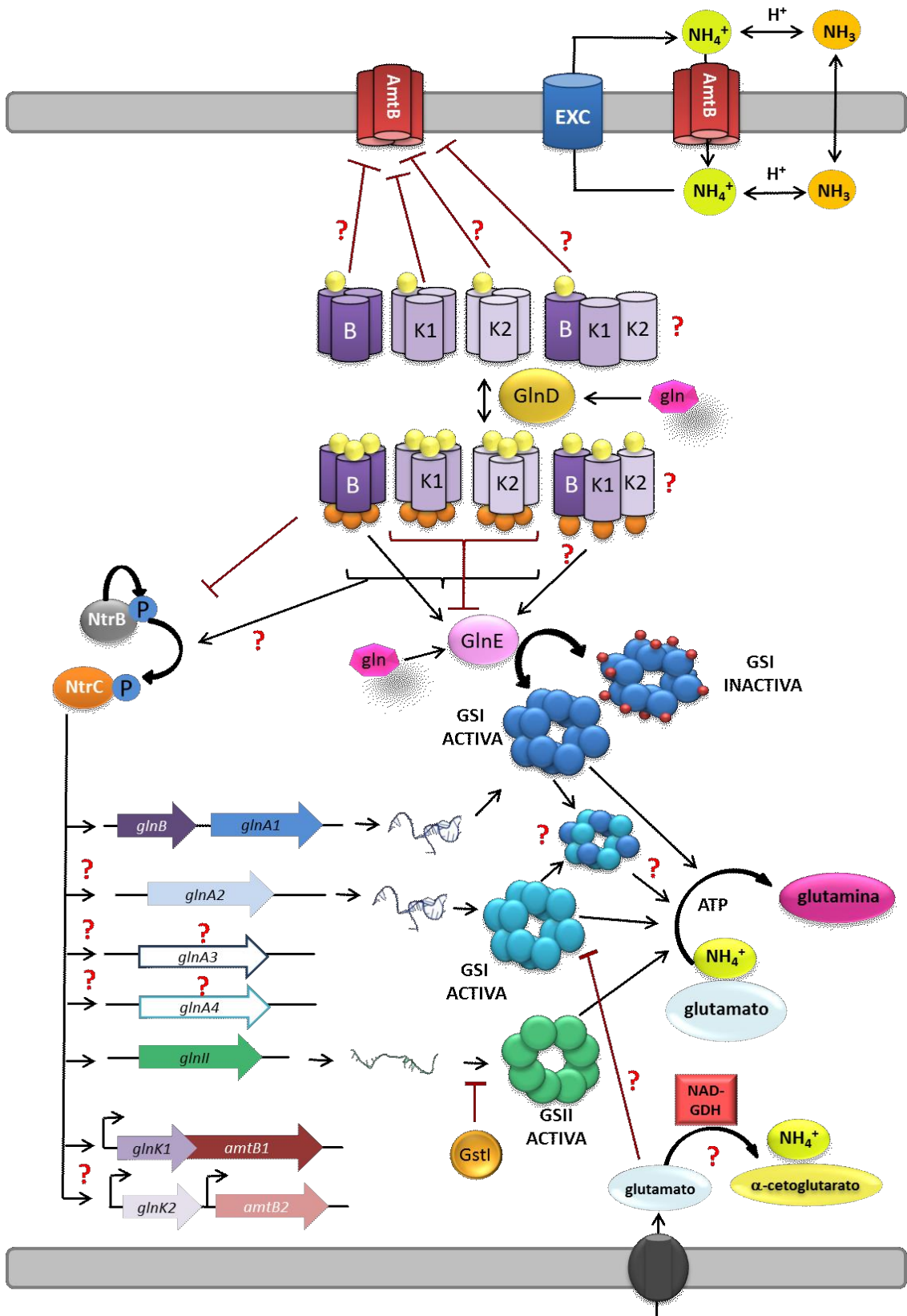
Por último, a pesar que la bibliografía confirma que dentro del nódulo el bacteroide mantiene la maquinaria necesaria para asimilar NH_4^+ prácticamente inactiva, los resultados de este trabajo nos permitirían asegurar que las proteínas PII de *B. diazoefficiens* poseen funciones específicas en el bacteroide, lo que concuerda con reportes previos en los cuales ya se ha detectado la presencia de las proteínas GlnB y GlnK en bacteroides (Delmotte *et al.*, 2010).

A modo de conclusión, todos estos resultados tomados en conjunto nos indican que todas las copias de PII (GlnB, GlnK1 y GlnK2) se expresan y son funcionales. Además, el rol que cumple cada una de ellas pareciera ser diferente, aunque algunas funciones podrían superponerse como ocurre en otros microorganismos. Sin embargo, es necesario el accionar de las 3 proteínas para una eficiente asimilación de NH_4^+ indicando

que, a pesar de la aparente redundancia de tener varias proteínas de señalización, cada una de ellas sería parte fundamental de una regulación fina de la activación de la NSR. Por su parte, principalmente GlnB, y en menor medida GlnK1, también resultan de vital importancia para el normal desarrollo de la interacción simbiótica y en conjunto, las 3 PII de *B. diazoefficiens* parecerían ser fundamentales en la regulación del metabolismo de N del bacteroide.

El fascinante mundo de la regulación de la vía metabólica del N es un claro ejemplo de cómo los microorganismos evolucionan y se adaptan a medios fluctuantes, generalmente enfrentándose a condiciones adversas, con el fin último de subsistir y permitir la supervivencia de la especie en la Tierra.

Finalmente, y a manera de conclusión final de este trabajo, presentamos un modelo regulatorio de la cascada NSR de *B. diazoefficiens* basándonos en datos de la bibliografía y en los resultados obtenidos durante esta Tesis.



El esquema de esta Figura representa un resumen general de los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis Doctoral sobre la regulación del metabolismo del NH_4^+ en *B. diazoefficiens*. Dado que la mayor parte de los ensayos fueron realizados en el medio de Evans, un medio balanceado en N y C, el esquema representa una condición de equilibrio del sistema NSR, es decir, una condición donde no se encuentra completamente activo (limitado en N) ni completamente inactivo (en exceso de N).

El sensor principal de la cascada NSR, al igual que en otros microorganismos parecería ser la proteína GlnD, la cual es responsable de uridilar/deutidilar a las proteínas PII: GlnB, GlnK1 y GlnK2, y responde a los niveles intracelulares de glutamina (heptágono rosa). En este caso, por las condiciones del medio anteriormente mencionadas probablemente encontremos PII uridiladas (círculos naranjas), PII deuridiladas y PII unidas a más o menos moléculas de α -cetoglutarato (círculos amarillos). Estas proteínas, en primer lugar, estarían interactuando con la adeniltransferasa/adenilremovasa GlnE, de manera de inactivar/activar la isoforma GSI mediante adenilación reversible (puntos rojos). En este sentido, pareciera que GlnK1 y GlnK2 tienen un efecto negativo sobre la activación (deadenilación) de GSI, mientras que GlnB parecería tener un efecto positivo sobre la activación de dicha enzima.

Además, es posible que GlnB se encuentre interaccionando con el sistema de dos componentes NtrBC, mediante su unión a NtrB. De esta manera, GlnB deuridilada es capaz de interaccionar físicamente con NtrB secuestrándolo e inhibiendo su autofosforilación y por ende, la posterior transferencia del grupo fosfato al regulador de respuesta NtrC. En caso contrario, en condiciones de limitación de glutamina, GlnB uridilada libera a NtrB, el cual se autofosforila y fosforila a NtrC, el cual induce la expresión del regulón Ntr en el que encontramos genes tales como *glnII*, *glnB*, *glnK1*, *amtB1*, entre otros (Franck *et al.*, 2015). Independientemente de ello, mediante un mecanismo de acción aún no dilucidado, todas las PII (GlnB, GlnK1 y GlnK2) afectan de manera directa o indirecta la expresión de los genes *glnA1* y *glnII*, que codifican las enzimas GSI y GSII, respectivamente. GSII a su vez, parecería estar regulada a nivel post-transcripcional por un homólogo de la proteína de GstI de *R. leguminosarum*.

Por otro lado, *B. diazoefficiens* posee 4 genes que codifican para la GSI: *glnA1*, *glnA2*, *glnA3* y *glnA4*. La actividad de GSI codificada por GlnA1 parecería estar regulada por la presencia de subunidades menos eficientes, probablemente codificadas por *glnA2*, que podrían estar formando parte de multímeros heterogéneos (GlnA1-GlnA2). Por su parte, la función y la regulación de GlnA3 y GlnA4 aún sigue siendo una gran incógnita.

El NH_4^+ proveniente del medio extracelular puede ingresar a la célula como NH_3 difundiendo a través de las membranas, o como NH_4^+ a través de transportadores específicos denominados AmtB. Las proteínas PII parecerían estar involucradas en la expresión del transportador de amonio *amtB1*, pero no así la del *amtB2*, el cual aún no dilucidamos si es funcional. La regulación del ingreso de NH_4^+ también parecería estar regulada por la interacción de GlnK1 con AmtB, sin embargo, también GlnK2, o incluso GlnB, podrían estar cumpliendo algún rol en esta regulación.

El glutamato por su parte, también ingresa al interior celular a través de transportadores específicos. Una vez dentro, podría ser metabolizado por la enzima NAD-GDH de *B. diazoefficiens*, si ésta fuera

funcional, para dar una molécula de α -cetoglutarato y una de NH_4^+ , aportando una fuente de N pero también compuestos carbonados. De alguna manera, aún no descifrada, la presencia de glutamato en el interior celular (y la ausencia de NH_4^+) regularía la enzima GlnA2, de tal manera que dicha copia se vuelve irrelevante.

Finalmente, al igual que ocurre en *E. coli*, las proteínas PII podrían estar formando heterotrímeros que cumplan funciones diferentes de los homotrímeros. En la Figura se grafica un único heterotrímero de manera representativa de las diversas combinaciones que podrían ocurrir.

VIII.2 Perspectivas

A lo largo de este trabajo de Tesis hemos avanzado en gran medida en el estudio del metabolismo de N de *B. diazoefficiens* tanto en vida libre como en simbiosis con las plantas de soja. Los resultados obtenidos son el puntapié inicial para dilucidar la regulación fina de las rutas metabólicas del C y el N en dicha bacteria.

En particular, los estudios que realizamos podrían enriquecerse a partir de la obtención de mutantes múltiples con el fin de evaluar el comportamiento individual de cada una de las copias de las proteínas de interés. En este sentido, sería interesante obtener mutantes dobles en *glnBglnK1* y *glnBglnK2*, para estudiar en detalle el rol de cada una de las PII en vida libre y en simbiosis.

Dado que hasta el momento sólo hemos podido caracterizar las cepas mutantes simples y la doble mutante *glnK1glnK2* de las proteínas PII en un medio balanceado en N y C, sería importante evaluar dichas cepas en medios limitados en N, utilizando tanto NH_4^+ como glutamato como únicas fuentes nitrogenadas. De igual manera, el análisis en medios con exceso de N también podría brindarnos información valiosa. Asimismo, resultaría interesante evaluar el rol de dichas proteínas en bacteroides y su influencia en la expresión de genes tales como los genes *nif* (que codifican para el complejo de la nitrogenasa), el gen *dct* (que codifica para el transportador de ácidos dicarboxílicos), entre otros.

Los estudios de estas proteínas de señalización podrían ampliarse mediante estudios de interacción entre proteínas. En particular, sería relevante evaluar la interacción entre las PII con los transportadores de amonio AmtB, en primer lugar, para confirmar que esta interacción tan conservada también se lleve a cabo en *B. diazoefficiens*, y en segundo

lugar para evaluar si únicamente las GlnK o también GlnB puede interactuar con dichos canales.

En estos estudios también sería importante analizar la interacción de las proteínas PII con el resto de las proteínas involucradas en la NSR, como por ejemplo, el sistema de dos componentes NtrBC o la enzima GlnE encargada de la activación/inactivación de GSI.

En cuanto al análisis de las glutamino sintetetasas, el mismo podría enriquecerse mediante el estudio del comportamiento simbiótico de las cepas mutantes obtenidas en este trabajo. A pesar de que se ha descrito que la actividad de estas enzimas se encuentra disminuída en bacteroides (Patriarca *et al.*, 2002), se ha visto que la delección de *glnII* o de *glnA1* en *B. diazoefficiens* tiene efectos positivos sobre la fijación de N₂, en particular la fijación de N₂ se ve aumentada en estas cepas mutantes (Carlson *et al.*, 1987). Por lo que resultaría interesante evaluar el fenotipo de las mutantes en *glnA2* y *glnA3*, que no han sido descritas hasta el momento en dicha interacción.

Asimismo, dado que los métodos de detección de actividad enzimática utilizados en este trabajo solamente nos han permitido evaluar actividad específica de GlnA1 o actividad específica total de GS, queda como perspectiva continuar con la puesta a punto de los ensayos de Western Blot que nos permitan al menos evaluar la presencia o ausencia de la proteína GSII.

Finalmente, aunque no menos importante, es fundamental obtener las cepas complementadas de cada una de las mutantes obtenidas. La complementación en *B. diazoefficiens* es un trabajo arduo y que no siempre tienen resultados positivos, sin embargo, es necesario obtener dichas cepas complementadas con el fin de confirmar que los fenotipos efectivamente son causados por la delección de nuestro gen de interés y no por algún otro efecto secundario.

Como resultado de estas propuestas podríamos obtener una visión más completa sobre la regulación del metabolismo del N en *B. diazoefficiens* y los mecanismos que dicha bacteria ha adquirido a lo largo de la evolución para subsistir tanto en vida libre como en simbiosis.



Anexos

Anexo 1.1 Alineamientos realizados a partir de la secuencia del gen que codifica el transportador de amonio AmtB2 (ORFs blr0607+blr0608) de *B. diazoefficiens* USDA 110 con las secuencias del ORF BJ6T_RS02820 de *B. japonicum* USDA 6 y el ORF BBta_0294 de *B. sp.* BTAi1

Al comparar la secuencia del gen *amtB2* de *B. diazoefficiens* con las secuencias putativas para los transportadores de amonio en otras bacterias encontramos que posee un 92 % de identidad con la secuencia codificada en el ORF BJ6T_RS02820 de *B. japonicum* USDA 6 y un 82 % de identidad con el ORF BBta_0294 de *B. sp.* BTAi1.

Alineamiento de la secuencia de *amtB2* de *B. diazoefficiens* USDA 110 con la secuencia del gen putativo para el transportador de amonio de *B. japonicum* USDA 6 (ORF BJ6T_RS02820):

```

USDA6_2795      ATGGCGGGATTGTTGCGCCGCGCAGCTGTTATGGCTGCGCCGCTGGGATTTGTGACGATC 60
amtB2           ATGGCGGGATTGTTGCGCCGCGCGCCGCTTGTAGCTGCGCCGCGCGGACTTATGTCGATC 60
                ***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

USDA6_2795      GTTGC GCGCGCCGCATCCGCGCGGGCTCCGAGATCAACACCGCCGACACCGCCTGGATG 120
amtB2           GTTGC GCGCGCCGCGCAGCGCGGGTTCGAGATCAACACCGCCGACACCGCCTGGATG 120
                ***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

USDA6_2795      ATCGTCGCCACCGCGCTGGTGCTGATGATGACGATCCCCGGCTTGGCGCTGTTCTATTCC 180
amtB2           ATCGTCGCCACCGCGCTGGTGCTGATGATGACGATCCCCGGCTTGGCGCTGTTCTATTCC 180
                ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

USDA6_2795      GGCATGGTGCGCAAGAAGAACGTGCTCGCCACCATGGCGCAGAGCCTCGCCGCGGTGACG 240
amtB2           GGCATGGTGCGCAAGAAGAACGTGCTCGCCACCATGGCGCAGAGCCTCGCCGCGGTGACG 240
                ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

USDA6_2795      ATGATCTCGATCCTCTGGGTGGCGTTCGGCTATTGCTCTGCTTTCGTCGGCGACGGCCG 300
amtB2           ATGATCTCGATCCTCTGGGTGGCGTTCGGCTATTGCTCTGCTTTCGTCGGCGACGGCCG 300
                ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

USDA6_2795      TGGATCGGAACGCTCGATCGCTGGTTCCTCGCGGGCATGACGATGGACAGCGTCAACCCG 360
amtB2           TGGATCGGCACGCTCGACCGCTGGTTCCTGGCGGGCATGACGCTCGACAGCGTCAACCCG 360
                ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

USDA6_2795      GCGGCGAAGACGATCCCGGAAGCGCTGTTTCATGCTGTACCAGATGACCTTTGCCATCATC 420
amtB2           GCCGCGAAGACCATCCCGGAATCGCTGTTTCATGCTGTACCAGATGACCTTTGCCATCATC 420
                ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

USDA6_2795      ACGGTGGCGCTGGTTCGCGGGCTCGGTTCGCCGACAGGATGCGATTCTCCGCTATCTGGTG 480
amtB2           ACGGTGGCGCTGGTTCGCGGGCTCGGTTCGCCGACAGGATGCGATTCTCCGCTATCTGGTG 480
                ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

USDA6_2795      TTCTCGGTTCGCTGGTTCATCTTCGCTTACATTCGCTGGCGCATGGGTGTGGGGCGGC 540
amtB2           TTCTCGGTTCGCTGGTTCATCTTCGCTTACATTCGCTGGCGCATGGGTGTGGGGCGGC 540
                ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```


USDA6_2795
amtB2
GGCTTCCTCGCCAGCATGGGCGTGTGGATTTTCGCCGGCGGCTCGTTCGTGCATCTGTTCG 600
GGCTTCCTCGCCAGCATGGGCGTACTGGATTTTCGCCGGCGGCTCGTGGTGCATCTGTTCG 600

USDA6_2795
amtB2
GCCGGCACC GCCGG-CCTCGTCGCCGCCAAGGTGATGGGCGCCGCCACGGCTACGGCAC 659
GCCGGCACC GCCGGCCTCGTCGCCGCCAAGGTGATGGGCGCCGCCACGGCTACGGCAC 660

USDA6_2795
amtB2
CGAAAATCTCTCGCCGTTTCGATCTGTTCGCTCGCGGTGATGGGCACC GGCTGTTGTGGGT 719
CGAAAATCTCTCGCCGTTTCGATCTGTTCGCTCGCCGTGATGGGCACCTGGCCTGTTGTGGGT 720

USDA6_2795
amtB2
CGGCTGGTTTCGGCTTCAACGGCGGCTCGGCGGGCGGCCAATTCGCGCGCGGTGCTGGC 779
CGGCTGGTTTCGGCTTCAACGGCGGTTTCGGCCGGCGGCCAATTCGCGCGCGGTGCTGGC 780

USDA6_2795
amtB2
GATCATCGCGACGCATCTCGCGCCCTGCTCCGGCGCGCTGACCTGGGGCGCGATCGAATG 839
GATCATCGCGACCCATCTGGCGCCCTGCTCCGGCGCGCTGACCTGGGGCGCAATCGAATG 840

USDA6_2795
amtB2
GTCGACCCGGCGCAAGCCGTCGGTGTTCGCGCATGATCTCCGGCGCGGTTCGCCGGGCTCGG 899
GTCAACGGCGCGCAAGCCTTCCGTGTTCGCGCATGATCTCCGGCGCGGTTCGCTGGCCTCGG 900
*** ** ***** ** *****

USDA6_2795
amtB2
CACGATCACGCCGGCCTCGGGCTTCGTTGCGCCATGGCATGGCATCGTCATCGGCATCGT 959
CACCATCACGCCGGCTTCGGGCTTCGTCGCGCCGTGGCATGGCATCGTCATCGGCATCAT 960
*** ***** ***** ***** ***** *

USDA6_2795
amtB2
CGCCGGCGCGGTCTGCTACTGGGCCTGCACCTGGCTGAAGCACCGCTTCAACTATGACGA1019
CGCCGGGGCGGTTTGCTACTGGGCCTGCACCTGGCTGAAGCACCGCTTCGACTATGACGA 1020
***** ***** ***** ***** *****

USDA6_2795
amtB2
TTCCCTCGACGTGTTTCGGCGTCCACGGCATCGGCGGCTGACCGGCACGCTGCTGGCCGG 1079
TTCGCTCGACGTGTTTCGGCGTCCACGGCATCGGCGGCTGACCGGCACCGCTGCTCGCCGG 1080
*** ***** ***** ***** *****

USDA6_2795
amtB2
CGTGTTTCGCGACCAGCGCGATCGGCGGCACCGCCGGCCTGATCGAGGGGCATCCGCAGCA 1139
GGTGTTTCGCAACCAGCGCCATCGGCGGCACCGCCGGCCTGCTCGAAGGTCATCCGCGGCA 1140
***** ***** ***** ***** *****

USDA6_2795
amtB2
ATTGCTGATCCAGCTCTACGGCGTCGCCGTACCTTCGTCTGGGCAGCCGGCGTGAGTTT 1199
GCTTCTGATCCAGCTTATGGGGTCGCCGTACCTTCGTTTGGGCGGCAGGCGTGAGCTT 1200
* ***** ** ** ***** ***** ** ***** **

USDA6_2795
amtB2
CGTCCTGCTCAAGCTGGTTCGCGCTGTTTCGTGCCCTTGCGTGTATCCCGTGAGCACGAGCT 1259
CATCTGCTCAAGCTGGTTCGCGCTGTTTCGTGCCCTTGCGGTATCCCGTGAGCACGAGCT 1260
* ***** ***** ***** ***** *****

USDA6_2795
amtB2
CGAGGGGCTCGATATCTCGCAGCACGGCGAAGCGCTTCAGTAA 1302
CGAGGGACTGGATATTTTCGAGCACGGTGAGGCCCTGCAGTAA 1303
***** ** ***** ** ** * *****

Alineamiento de la secuencia de *amtB2* de *B. diazoefficiens* USDA 110 con la secuencia codificada en el ORF BBta_0294 de *B. sp.* BTAi1 correspondiente a uno de los transportadores de amonio de dicha cepa:

```

BTai_0294      ATGGGGACCTATGCGTCTCGTTGCCTTCGCGCGTCTGCAGCTTCGGCTGCAGCAGGCGCG 60
amtB2          ATGGCG-----GGATTGTTGCGCCGCGCGGCCGTTGTAGCTGCGCCGCGCGACTTATG 54
                **** *      * *      ***      **      * *      * *      * *      * *      *
                *

BTai_0294      GCCATCTTACCACGCCTGCCTTGGCGGCTGCACCATCGACGATCGAACCGGCCGACACC 120
amtB2          TCGATCGTT--GCCGCGCCGCGCAGGCCGCGGTTCCGAGATCAACACCGCCGACACC 111
                * * * * *      * * *      * * * * *      * *      * * * * *      * * * * * * *
                *

BTai_0294      GCCTGGATGATCGTGGCCACGGCCCTCGTGCTGATGATGACCATCCCGGGCTGGCGCTG 180
amtB2          GCCTGGATGATCGTCGCCACCGCGCTGGTGCTGATGATGACGATCCCGGCCTCGCGCTG 171
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                *

BTai_0294      TTCTACTCGGGCATGGTGCGCAAGAAGAAGCTGCTGGCGACGATGGCGCAGAGCCTCGCC 240
amtB2          TTCTATTCGGCATGGTGCGCAAGAAGAAGCTGCTGCCACCATGGCGCAGAGCCTTGCC 231
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                *

BTai_0294      GCGGTCATGCTGATCTCGATCCTGTGGGTTGCGTTCGGCTATTTCGCTGGCCTTCGTCGGC 300
amtB2          GCCGTGACGATGATCTCGATTCTCTGGGTGCGGTTTCGGCTATTTCGCTCTGCTTTGTCGGC 291
                ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                *

BTai_0294      GACGGCGCCTGGATCGGCACGCTCGACCGCGCCTTCCTCGCCGGCATGGGCATGGAGAGC 360
amtB2          GACGGCCCTGGATCGGCACGCTCGACCGCTGGTTCCTGGCGGGCATGACGCTCGACAGC 351
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                *

BTai_0294      GTGCATCCCGGAGCCAAGACGATTCGGAAGCGCTGTTTCATGCTGTACCAGATGACCTTC 420
amtB2          GTCACCCGCGCCGGAAGACCATCCCGGAATCGCTGTTTCATGCTGTACCAGATGACGTTT 411
                ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                *

BTai_0294      GCGATCATCACGGTGGCGCTGGTGGCCGGCTCGGTGGCCGATCGCATGCGCTTCTCGGCC 480
amtB2          GCGATCATCACGGTGGCGCTGGTGGCCGGCTCGGTGGCCGACCGCATGCGGTTCTCCGCT 471
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                *

BTai_0294      TATCTGTGTTTCGGCGTCGCCTGGTTCGTCTTCGTCTATGTGCCGCTGGCGCATGGGATC 540
amtB2          TATCTGTGTTTCGGTCGCCTGGTTCATCTTCGTCTACATTCCGCTGGCGCATGGGGTG 531
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                *

BTai_0294      TGGGGCGGCGGTTTCCTCGCCAGGCCGGCGTGGTTCGATTCGCCGGCGGCCTCGTGGTA 600
amtB2          TGGGGCGGCGGCTTCCTCGCCAGCATGGGCGTACTGGATTCGCCGGCGGCCTCGTGGTG 591
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                *

BTai_0294      CATCTGTCCGCCGGCACCGGCGGC-CTGGTTCGCGGCCGTGGTTCATGGGACCGCCACGG 659
amtB2          CATCTGTCCGCCGGCACCGGCGGCCTCGTTCGCCGCAAGGTGATGGGGCGCCGCCACGG 651
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                *

BTai_0294      CTATGGCAGCGAGAACCTGTGCGCGTTCGACCTGTGCTCGCGGTCGCGCACCGGCCCT 719
amtB2          CTACGGCACCGAAAATCTCTCGCCGTTTCGATCTGTGCTCGCCGTCGCGGCTGGGCACTGGCCT 711
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                *

BTai_0294      GCTCTGGGTTCGGCTGGTTCGGCTTCAATGGCGGATCGGCGCTCGGCGCAACGCGCATGC 779
amtB2          GTTGTGGGTTCGGCTGGTTCGGCTTCAACGGCGGTTTCGGCCGGCGCGGCAATTCGCGCGC 771
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                *

BTai_0294      CGTGATGGCGATCCTGACCACGCATCTTGCCGCTGCGCCGGCGCCGTCACCTGGGGCGC 839
amtB2          GGTGCTGGCGATCATCGCACCCATCTGGCGGCTGCTCCGGCGCGCTGACCTGGGGCGC 831
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                *

BTai_0294      GCTGGAATGGTTCGACCCGCGCAAGCCGTCGGTTCGCGCATGATCTCCGGAGCGGTCGC 899
amtB2          AATCGAATGGTCAACGCGCGCAAGCCCTCCGTGCTCGGCATGATCTCCGGCGCGGTCGC 891
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                *
    
```

```

BTai_0294      CGGCCTCGGCACCATCACCCGGCATCGGGCTTCGTGCCCCCTTGGCACGGCCTGGTCAT 959
amtB2          TGGCCTCGGCACCATCACGCCGGCTTCGGGCTTCGTGCGCGCCGTGGCATGGCATCGTCAT 951
                *****
BTai_0294      CGGCGCGCTGGCCGGCATCATCTGCTACTGGGCCTGCACCTCGCTGAAGCACCGCTTCAA 1019
amtB2          CGGCATCATCGCCGGGGCGGTTTGCTACTGGGCCTGCACCTGGCTGAAGCACCGCTTCGA 1011
                **** * *****
BTai_0294      TTATGACGATTCGCTCGACGTGTTTCGGCGTCCACGGCATCGGCGGCCTCACCGGCACGGT 1079
amtB2          CTATGACGATTCGCTCGACGTGTTTCGGCGTCCACGGCATCGGCGGTCTGACCGGCACCT 1071
                *****
BTai_0294      GCTGGCCGGCGTGTTCGCCACGGCAGCGATCGGCGGCACCGCCGGGTGATCGAGGGCAA 1139
amtB2          GCTCGCCGGGTGTTTCGCAACCAGCGCCATCGGCGGCACCGCCGGCTGCTCGAAGGTCA 1131
                *** ***** ** * *****
BTai_0294      CCCGAAGCAACTCGCGGCGCAGCTCTACGGCGTCGCGGTACCCCTGGTCTGGTCGGGCGG 1199
amtB2          TCCGCGGCAGCTTCTGATCCAGCTTTATGGGGTCGCGGTACCTTCGTTGGGCGGCAGG 1191
                *** ** * ***** ** * *****
BTai_0294      CGTCACCTGGGGTCTCCTGAAGCTGGTCAGCGTCTTCGTGCCGTTGCGGGTGTCCCGGA 1259
amtB2          CGTGAGCTTCATCCTGCTCAAGCTGGTCGGCCTGTTTCGTGCCCTTGCGCGTATCCCGTA 1251
                *** * ** * * ***** ** * *****
BTai_0294      GCAGGAACTCGAGGGTCTCGACATCTCCAGCACGGCGAAGCGCTGCAATAA 1311
amtB2          GCACGAGCTCGAGGGACTGGATATTTTCGAGCACGGTGAGGCCCTGCAGTAA 1303
                *** * ***** ** * * ***** ** * *****
    
```

La citosina resaltada en amarillo en los dos alineamientos es la citosina adicional que posee el gen *amtB2* de *B. diazoefficiens* USDA 110 en la posición 652.826 de su genoma que no se encuentra en los otros genomas analizados.

Anexo 1.2 Secuencias proteicas de los transportadores de amonio AmtB1 (codificado en el ORF blr0613) y AmtB2 (codificado por los ORF blr0607 y blr0608)

AmtB1 (blr0613) - 510 aa

```

MRFVSAPARPMRPFDFALNLIQSGVNNMTFKRPYGAGLAALAVGLFAATAAYAEPVTKGDNAW
MLTSTVLVLLMTIPGLALFYGGLVRSKNMLSVLMQVFYTVCVVTVIWAVVGYSLAFTGGSDFIGGFSK
AFMMGVTTDSKAATFSVDANISELIYMCQMFTAAITPALIVGAFERMKFSAIALFIPLWVTLIYFPIA
HMVWYWPDPDAIQDAAKALAAATDAAAKTAAQAKLDEINADAGWIFKKGAI DFAGGTVVHINAGI
AGLVGALLIGKRTGYGKELMAPHSLTMSMIGASLLWVGWFGFNAGSNLEANGGAALAMTNSFVAT
AAAALSWMFAEWIVKGHPVSLGVISGAVAGLVAVTPAAGFSGVMGAIVLGLVVGVVCLFFCTVVKN
AIGYDDSLDVFVHCIGGIVGALGTGILVNPALGGAGIIDYTAIPPKVADYDFAAQMVVSQFWGVCCTL
VWSGIGSAILYKVVDVIVGLRANVESEREGLDITEHTERAYNM
    
```

Blr0607 – 338 aa

MAGLLRRAAVVAAPAGLMSIVAAPAQAAGSEINTADTAWMIVATALVLMMTIPGLALFYSGMVRK
 KNVLATMAQSLAAVTMISILWVAFGYSLCFVGDGPWIGTLDRWFLAGMTLDSVNPAAKTIPESLFML
 YQMTFAIITVALVAGSVADRMRFSA YLLFSVAWFIFVYIPLAHVWVGGGFLASMGVLDFAAGLVVHL
 SAGTAGPRRRQGDGAPPRLRHRKSLAVRSVARRDGHWPVVGRLVRLQRRFGRRGQFARGAGDHR
 DPSGGLLRADLGRNRMVNAAQAFRARHDLRRGRWPRHHHAGFGLRRAVAWHRHRHRRGGLL
 LGLHLAEAPLRL

Blr0608 – 223 aa

MMGRRHGYGTENLSPFDLSLAVMGTGLLWVGWFGFNGGSAGAANSRAVLAIATHLAACSGALTW
 GAIEWSTRRKPSVLGMISGAVAGLTITPASGFVAPWHGIVIGIAGAVCYWACTWLKHRFDYDDSL
 DVFGVHGIGGLTGTLGAVFATS AIGGTAGLLEGHPRQLLIQLYGVAVTFVWAAGVSFILLKLVGLFVP
 LRVSREHELEGLDISQHGEALQ

AmtB2 (desde el inicio del ORF blr0607 al final del blr0608) – 434 aa

MAGLLRRAAVVAAPAGLMSIVAAPAQAAGSEINTADTAWMIVATALVLMMTIPGLALFYSGMVRK
 KNVLATMAQSLAAVTMISILWVAFGYSLCFVGDGPWIGTLDRWFLAGMTLDSVNPAAKTIPESLFML
 YQMTFAIITVALVAGSVADRMRFSA YLLFSVAWFIFVYIPLAHVWVGGGFLASMGVLDFAAGLVVHL
 SAGTAGPRRRQGDGAPPRLRHRKSLAVRSVARRDGHWPVVGRLVRLQRRFGRRGQFARGAGDHR
 DPSGGLLRADLGRNRMVNAAQAFRARHDLRRGRWPRHHHAGFGLRRAVAWHRHRHRRGGLL
 LGLHLAEAPLRL.RFARRVRRPRHRRSDRHPARRGVRNQRHRRHRRPARRSSAAASDPALWGRRHLR
 LGGRRELHPAQAGRPVRLARIP.ARARGTGYFAAR.GPAV

Anexo 1.3 Alineamientos realizados a partir de las secuencias proteicas del AmtB1 y AmtB2 de *B. diazoefficiens* USDA 110

Las secuencias proteicas de AmtB1 y AmtB2 solamente poseen un 39% de identidad.

AmtB1	MRFVSAPARPMRPFDFALNLIQSGVNNMTFKRPYAGLAALAVGLFAATAAYAEPTVNK	60
AmtB2	-----MAGL-----LRRAAVVAAPAGLMSIVAAPAQAAGSEINT	34
	:*: ::* .. * :.:** * * :*.	
AmtB1	GDNAWMLTSTVLVLLMTIPGLALFYGGLVRSKNMLSVLMQVFYTVCVVTVIWA VYGYSLA	120
AmtB2	ADTAWMIVATALVLMMTIPGLALFYSGMVRKKNVLATMAQSLAAVTMISILWVAFGYSLC	94
	.*.***:.*.***:*****.*:*.***:*.:.: * : * :.:.:*.:.:****.	
AmtB1	FTGGSDFIGGFSKAFMMGVTTDSKAATFSVDANISELIYMCFQMTFAAITPALIVGAFAE180	
AmtB2	FVGDGPWIGTLDRWFLAGMTLDSVNP---AAKTIPESLFMLYQMTFAIITVALVAGSVAD	151
	... :** :.: * : *.* ** . . * * :.* :***** ** **.*:*.:.:	

AmtB1	RMKFSAIALFIPLWVTLIYFPIAHMVVYWPGPDAIQDAAKALAAATDAAAKTAAQAKLDE	240
AmtB2	RMRFSAYLLFSVAWFIFVYIPLAHVWVG--G----- **:* ** * . :*:** ** *	180
AmtB1	INADAGWIFKKGAI DFAGGTVVHINAGIAGLVGALLIGKRTGYGKELMAPHSLTM-----	295
AmtB2	-----GFLASMGVLD FAGGLVVHLSAGTAGPRRRQGDGAPP-----RLRHRKSLAVRSVAR * : . * :***** ** : ** * * * . * : ** :	231
AmtB1	-----SMIGASLL-----WVGWFGFNAGSNLEANGGAALAMT---NSFVATAA---AAL	338
AmtB2	RDGHWPVVGRLVRLQRRFGRRGQFARGAGDHRDPSGGLLRADLGRNRMVNAQA FRARH : * : * * . ** . : . ** * : * : *	291
AmtB1	SWMFAEWIVKGHPSVLGVISGAVAGLVAVTPAAGFSGVMGAIVLGLVVGVCVCLFFCT---	395
AmtB2	DLRRGRWPRHHHAG-FGLRRA-----VAWHRHRHRRGGLLLGLHLAEAPLRL-RFAR . . * : * . : * : . * : * : ** : . . * :	342
AmtB1	VVKNAI-GYDD-SLDVFGVH-----CIGGIVGALGTGILVNPA	431
AmtB2	RVRRPRHRRSDRHPARRGVRNQRHRRHRRPARRSSAAASDPALWGRRHLRLGGRRELHPA * : . * ** : * ** : **	402
AmtB1	LGGAGIIDYTAIPPKVADYDFAAQMV SQFWGVCTTLVWSGIGSAILYKVVDVIVGLRANV	491
AmtB2	QAGR PVRALARIP-ARARG-----TG YFA-----AR-GPAV----- . * : : ** * : : . : * * :	431
AmtB1	ESEREGLDITEHTERAYNM	510
AmtB2	-----	431

Anexo 2 Construcción del mutante en el gen *glnD*

Como mencionamos en el **Capítulo I**, la proteína GlnD es el sensor más importante del estado de N intracelular y el responsable de activar o inhibir la respuesta al estrés por N (NSR) mediante la uridilación/deuridilación de las proteínas PII. En base a la importancia de esta proteína y a la falta de conocimiento sobre la misma en *B. diazoefficiens* nos propusimos construir un mutante delecional en el gen que la codifica: *glnD* (ORF bll0916).

Estudios previos a este trabajo de Tesis mostraron que, en *E. meliloti* 1021, la mutación del gen *glnD* resultaba letal, indicando que en esta bacteria *glnD* es un gen esencial (Rudnick *et al.*, 2001; Yurgel *et al.*, 2008). Únicamente a partir de la deleción parcial de dicho gen fue posible su caracterización en *E. meliloti* 1021 (Yurgel *et al.*, 2008; Yurgel *et al.*, 2010; Yurgel *et al.*, 2011).

En la **Figura A.1** se puede observar un esquema del entorno génico del gen *glnD* de *B. diazoefficiens* USDA 110 (**Panel A**) y los dominios que posee la proteína (predichos a través del servidor *on line* Pfam) (**Panel B**). En el panel B se detallan los cuatro dominios predichos para GlnD: un dominio N-terminal que nucleotidiltransferasa (Nt), un dominio característico de las proteínas GlnD (UTasa/UR), un dominio central de HD, llamado así por la presencia de residuos conservados de histidina y aspartato, y un dominio ACT de unión a ligandos en el extremo C-terminal. A partir de estudios mutacionales (Ninfa *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2005; Tøndervik *et al.*, 2006) y análisis de dominio (Holm *et al.*, 1995; Aravind *et al.*, 1999) se ha reportado que el sitio activo de uridiltransferasa se encuentra en el extremo N-terminal de la proteína mientras que la función uridilremovedora pareciera estar vinculada al dominio HD (Zhang *et al.*, 2010). Por su parte el dominio ACT, que generalmente se une a pequeños efectores o aminoácidos, cumpliría un rol regulatorio de la actividad GlnD, a través de su unión a glutamina (Zhang *et al.*, 2010).

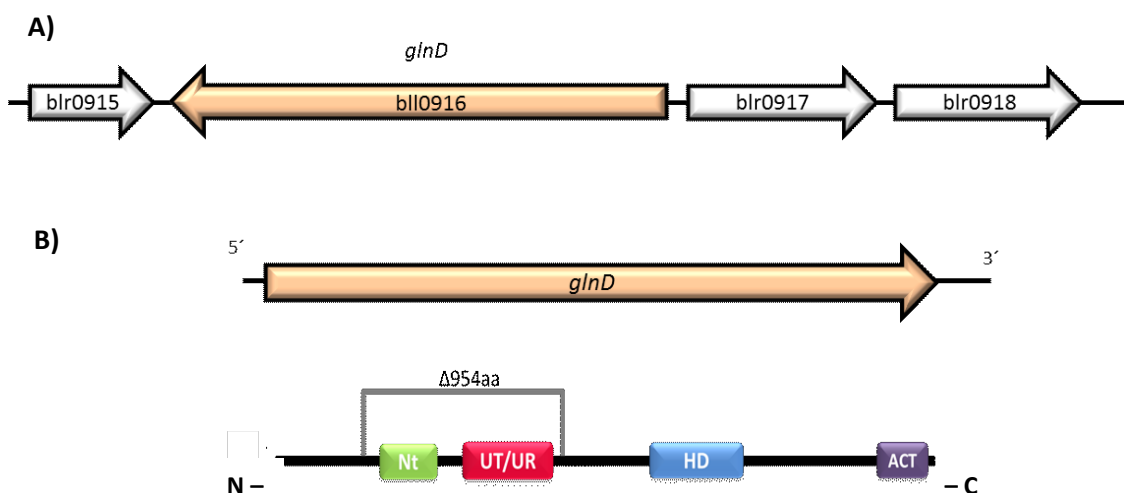


Figura A.1 Esquema representativo de la región génica de *glnD* (flecha naranja) (A) y predicción de dominios de la proteína GlnD (B). Las flechas en gris esquematizan genes que no están involucrados en el metabolismo del N. La predicción de dominios de GlnD mediante el programa *on line* Pfam (<https://pfam.xfam.org/search/sequence>). En el panel B se puede observar la presencia de 4 dominios: el dominio nucleotidiltransferasa (Nt), el dominio característico de las proteínas GlnD uridiltransferasa/uridilremovasa (UTasa/UR), el dominio HD y un dominio ACT. Además, en la imagen se indica la región que se desea deleccionar y la cantidad de aminoácidos (aa) que contiene esa región.

Considerando que los datos reportados indican que la delección total de *glnD* puede ser letal para la bacteria, y que el extremo N-terminal de la proteína está vinculado a su función uridiltransferasa, decidimos diseñar una estrategia para la delección parcial de dicho gen, en particular de la región que codifica para el extremo N-terminal de la proteína donde se encuentran los dominios Nt y UTasa/UR (**Figura A.1 - Panel B**).

Para generar la construcción que nos permitirá obtener el mutante en *glnD*, se eligió la estrategia de doble recombinación homóloga descrita por Sukdeo y Charles (2003) que se detalló en el **Capítulo II.3.12**. Brevemente, se amplificaron por PCR, utilizando la enzima Pfu ADN polimerasa, fragmentos internos del *glnD* y flanqueantes a los dominios nucleotidiltransferasa y utidiltransferasa/uridilremovasa. Utilizando los cebadores *glnD* 5'Fw/ *glnD* 5'Rv amplificamos un fragmento de 427 pb río arriba (**PCR1**) y utilizamos el par de cebadores *glnD* 3'Fw/ *glnD* 3'Rv para amplificar 502 pb río debajo de dichos dominios (**PCR2**) (**Figura A.2, gel a**). Las secuencias de los cebadores utilizados se detallan en la **Tabla II.3.1**. Los fragmentos amplificados en las PCR1 y PCR2 se utilizaron como ADN molde para llevar a cabo la **PCR3** (**Figura A.2, gel b**) utilizando la combinación

de cebadores glnD 5'Fw/ glnD 3'Rv. El producto final obtenido (908 pb) contiene la región interna del *glnD* río arriba de los dominios a delecionar unido por la secuencia sintética a la región río debajo de los mismos

El fragmento de PCR3 se insertó en el vector pK18mobSacB (Schafer *et al.*, 1994), ambos previamente digeridos con las enzimas de restricción *HindIII-PstI*. Una vez obtenida la construcción, la misma se chequeó primero por PCR utilizando la combinación de cebadores M13 (-40) Fw (que hibridan específicamente sobre el plásmido) y glnD 3'Fw obteniendo un fragmento de 542pb (**Figura A.2, gel c**). De aquellos clones que resultaron poseer el plásmido con el fragmento de la PCR 3, se seleccionó el clon 2 y se digirió con la enzima *BamHI* para corroborar la presencia del fragmento de interés donde efectivamente se observó la liberación de un fragmento de 436 pb (**Figura A.2, gel d**). Esta construcción se chequeó por secuenciación y se denominó pFL0916.

Con la construcción obtenida se transformó una cepa de *E. coli* S17-1 y luego se movilizó a *B. diazoefficiens* USDA 110 mediante una conjugación biparental. Como mencionamos en el **Capítulo II.3.12**, la selección de transconjugantes se llevó a cabo en medio YEM suplementado con Km y la selección de dobles recombinantes se realizó en medio YEM suplementado con sacarosa 10 %.

Pese a los múltiples intentos realizados, no fue posible encontrar un clon Km^s-Cm^r donde se haya delecionado el gen de interés. Por el contrario, todos los clones chequeados por PCR utilizando los cebadores glnD 5'Fw/ glnD 3'Rv (utilizados para amplificar la PCR3) dieron como resultado la presencia de la copia salvaje del gen. Esto indicaría que tanto la primera como la segunda recombinación homóloga ocurrieron en el mismo sitio dando como resultado la eliminación del plásmido pFL0916 y la reversión de los transconjugantes simples a la cepa salvaje. Incluso en varias ocasiones, a pesar de intentar forzar la segunda recombinación homóloga sembrando los transconjugantes simples en medio YEM con 10 % de sacarosa, se comprobó que se obtuvieron clones que aún mantenían el plásmido insertado en el genoma ya que se obtenían por PCR con los cebadores glnD 5'Fw/ glnD 3'Rv dos fragmentos: uno de 896pb que pertenece a la amplificación de la copia mutante del gen y otro de 1829pb que corresponde a la copia salvaje. Esto probablemente pudo ocurrir porque en ocasiones la sacarosa fue esterilizada por vapor de agua en autoclave a sobrepresión. Las elevadas temperaturas

podieron caramelizar la sacarosa y como consecuencia la concentración adicionada al medio de cultivo podría no haber sido la adecuada.

Dada las múltiples complicaciones encontradas al intentar deletar el gen *glnD* y considerando la bibliografía mencionada al inicio de este anexo, podríamos suponer que, en *B. diazoefficiens*, *glnD* es también un gen importante y su delección podría ser letal.

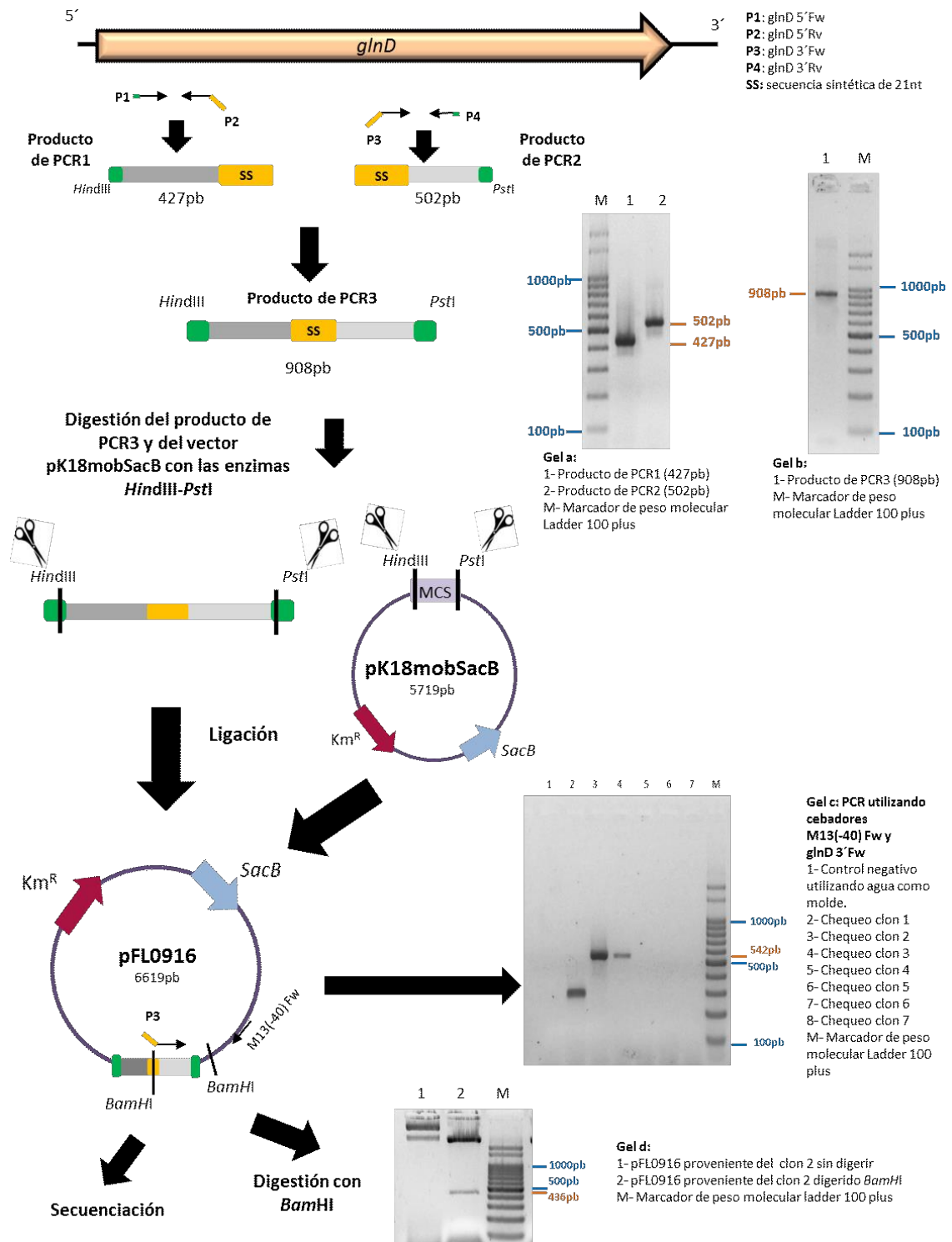


Figura A.2 Esquema de la estrategia de clonado utilizada para la construcción del vector pFL0916, que será utilizada para la delección del gen *glnD* (*bll0916*) en *B. diazoefficiens* USDA 110, y chequeo de la construcción obtenida. A los lados de los geles se indican los pesos moleculares de los fragmentos de interés (naranja) y del marcador de peso molecular (celestes).

Referencias bibliográficas



- Abd-Alla M. H., El-enany A.E., Bagy M.K. y Bashandy S.R.** 2014. Alleviating the inhibitory effect of salinity stress on nod gene expression in *Rhizobium tibeticum*-fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) symbiosis by isoflavonoids treatment. *Journal of Plant Interaction*. **9**(1): 275-284.
- Adams T.H., Chelm B.K.** 1988. Effects of oxygen levels on the transcription of *nif* and *gln* genes in *Bradyrhizobium japonicum*. *Microbiology*, **134**(3), 611-618.
- Allaway D., Boesten B., O'gara F.** 1995. NtrBC-dependent expression from the *Rhizobium meliloti* *dctA* promoter in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*. **128**(3): 241-245.
- Allen E.K., Allen O.N.** 1950. Biochemical and symbiotic properties of the rhizobia. *Bacteriological reviews*. **14**(4): 273-330.
- Althabegoiti M.J., López-García S.L., Piccinetti C., Mongiardini E.J., Pérez-Giménez J., Quelas J.I., Peticari A., Lodeiro A.R.** 2008. Strain selection for improvement of *Bradyrhizobium japonicum* competitiveness for nodulation of soybean. *FEMS Microbiol. Lett.* **282**: 115-23.
- Althabegoiti M.J., Covelli J.M., Pérez-Giménez J., Quelas J.I., Mongiardini E.J., López M.F., López-García S.L., Lodeiro A.R.** 2011. Analysis of the role of the two flagella of *Bradyrhizobium japonicum* in competition for nodulation of soybean. *FEMS Microbiol. Lett.* **319** (2):133-9.
- Amar M., Patriarca E.J., Manco G., Bernard P., Riccio A., Lamberti A., Defez R., Iaccarino M.** 1994. Regulation of nitrogen metabolism is altered in a *glnB* mutant strain of *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Microbiol.* **11**: 685-693.
- Anderson M.R.** 1990. Perfecting the polymerase chain reaction. *Laboratory Equipment Digests*. **1**: 30-31.
- Andrade S.L., Dickmanns A., Ficner R., Einsle O.** 2005. Crystal structure of the archaeal ammonium transporter Amt-1 from *Archaeoglobus fulgidus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**:14994-99.
- Andrade S.L., Einsle O.** 2007. The Amt/Mep/Rh family of ammonium transport proteins. *Mol Membr Biol.* **24**(5-6): 357-365.
- Aravind L., Koonin E.V.** 1999. DNA polymerase -like nucleotidyltransferase superfamily: identification of three new families, classification and evolutionary history. *Nucleic Acids Res.* **27**: 1609-1618.
- Arcondéguy T., Huez I., Fourment J., Kahn D.** 1996. Symbiotic nitrogen fixation does not require adenylation of glutamine synthetase I in *Rhizobium meliloti*. *FEMS Microbiology Letters*. **145**(1): 33-40.
- Arcondéguy T., Huez I., Pascal T., Gangneux C., de Billy F., Gojon A., Truchet G., Kahn D.** 1997. The *Rhizobium meliloti* P-II protein, which controls bacterial nitrogen metabolism, affects alfalfa nodule development. *Genes & development*. **11**: 1194-206.
- Arcondéguy T., Lawson D., Merrick M.** 2000. Two residues in the T-loop of GlnK determine NifL-dependent nitrogen control of *nif* gene expression. *J. Biol. Chem.* **275**:38452-38456.
- Arcondéguy T., Jack R., Merrick M.** 2001. PII signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. *Microbiol Mol. Biol.* **65**: 80-105.
- Aresano F., Banci L., Benvenuti M., Bertini I., Calderone V., Mangani S., Viezzoli M.S.** 2003. The Evolutionarily Conserved Trimeric Structure of CutA1 Proteins Suggests a Role in Signal Transduction. *Journal of Biological Chemistry*. **278**(46): 45999-46006.
- Atkinson M.R., Kamberov E.S., Weiss R.L., Ninfa A.J.** 1994. Reversible uridylylation of the *Escherichia coli* PII signal transduction protein regulates its ability to stimulate the dephosphorylation of the transcription factor nitrogen regulator I (NRI or NtrC). *J. Biol. Chem.* **269**: 28288-28293.
- Atkinson M.R., Ninfa A.J.** 1998. Role of the GlnK signal transduction protein in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **29**(2): 431-47.
- Atkinson M.R., Ninfa A.J.** 1999. Characterization of the GlnK protein of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. **32**(2): 301-313.
- Atkinson M.R., Blauwkamp T., Ninfa A.J.** 2002 Context-dependant functions of the PII signal transduction protein of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**: 5364-5375.
- Beckers G., Strosser J., Hildebrandt U., Kalinowski J., Farwick M., Krämer R., Burkovski A.** 2005. Regulation of AmtR-controlled gene expression in *Corynebacterium glutamicum*: mechanism and characterization of the AmtR regulon. *Mol. Microbiol.* **58**:580-595.
- Bender R.A., Janssen K.A., Resnick A.D., Blumentberg M., Foor F., Magasanik B.** 1977. Biochemical parameters of glutamine synthetase from *Klebsiella aerogenes*. *J. Bacteriol.* **129**: 1001-1009.

- Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L.** 2007. Biochemistry, 6th edn. New York, NY: Friedman & Co.
- Bishop P.E., Guevara J.G., Engelke J.A., Evans H.J.** 1976. On the relation between glutamine synthetase and nitrogenase activities in the symbiotic association between *Rhizobium japonicum* and *Glycine max*. Plant Physiology **57**: 542-546.
- Blakey D., Leech A., Thomas G.H., Coutts G., Findlay K., Merrick M.** 2002. Purification of the *Escherichia coli* ammonium transporter AmtB reveals a trimeric stoichiometry. Biochem J **364**(2): 527-535.
- Blauwkamp T.A., Ninfa A.J.** 2002. Physiological role of the GlnK signal transduction protein of *Escherichia coli*: survival of nitrogen starvation. Mol Microbiol. **46**: 203-214.
- Bolaños L., Redondo-Nieto M., Rivilla R., Brewin N.J., Bonilla I.** 2004. Cell surface interactions of *Rhizobium* bacteroids and other bacterial strains with symbiosomal and peribacteroid membrane components from pea nodules. Mol Plant Microbe Interact. **17**(2): 216-223.
- Boogerd F.C., Ma H., Bruggeman F.J., van Heeswijk W.C., Garcia-Contreras R., Molenaar D., Krab K., Westerhoff H.V.** 2011. AmtB-mediated NH₃ transport in prokaryotes must be active and as a consequence regulation of transport by GlnK is mandatory to limit futile cycling of NH₄⁺/NH₃. FEBS Lett. **585**(1): 23-28.
- Boyle J.S. y Lew A.M.** 1995. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. Trends in Genetics **11**(1): 8.
- Bradford M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem **72**: 248-254.
- Bravo A., Mora J.** 1987. Ammonium assimilation in *Rhizobium phaseoli* by the glutamine synthetase-glutamate pathway. J. Bacteriol. **170**: 980-984.
- Bren A., Park J.O., Towbin B.D., Dekel E., Rabinowitz J.D., Alon U.** 2016. Glucose becomes one of the worst carbon sources for *E. coli* on poor nitrogen sources due to suboptimal levels of cAMP. Scientific Reports. **6**(1).
- Brockwell J., Bottomley P.J., Thies J.E.** 1995. Manipulation of rhizobia microflora for improving crop productivity and soil fertility: a critical assessment. Plant and Soil. **174**: 143-180.
- Brown C.M., Dilworth M.J.** 1975. Ammonia assimilation by *Rhizobium* cultures and bacteroids. J. Gen. Microbiol. **86**: 39-48.
- Burkovski A.** 2003. Ammonium assimilation and nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum* and its relatives: an example for new regulatory mechanisms in actinomycetes. FEMS Microbiol Rev. **27**: 617-628.
- Caetano-Anollés G., Gresshoff P.M.** 1991. Alfalfa controls nodulation during the onset of rhizobium-induced cortical cell division. Plant Physiol. **95**: 366-373.
- Cajiao Checchin V.C.** 2018. Análisis de la interacción de las proteínas PII con los transportadores de amonio AmtB en *Bradyrhizobium diazoefficiens*. Trabajo Final de Licenciatura, Universidad Nacional de La Plata.
- Canfield D.E., Glazer A.N., Falkowski P.G.** 2010. The evolution and future of Earth's nitrogen cycle. Science. **330**: 192.
- Capone D.G.** 2001. Marine nitrogen fixation: what's the fuss? Curr Opin Microbiol **4**(3): 341-348.
- Carlson T.A., Chelm B.K.** 1986. Apparent eukaryotic origin of glutamine synthetase II from the bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. Nature. **322**: 568-570.
- Carlson T.A., Guerinot M.L., Chelmb K.** 1985. Characterization of the gene encoding glutamine synthetase I (*glnA*) from *Bradyrhizobium japonicum*. J. Bacteriol. **162**: 698-703.
- Carlson T.A., Martin G.B., Chelm B.K.** 1987. Differential transcription of the two glutamine synthetase genes of *Bradyrhizobium japonicum*. J. Bacteriol. **169**: 5861- 5866.
- Carr P.D., Cheah E., Suffolk P.M., Vasudevan S.G., Dixon N.E., Ollis D.L.** 1996. X-ray structure of the signal transduction protein PII from *Escherichia coli* at 1.9 Å. Acta Crystallogr.D. **52**:93-104.
- Cassab G.I.** 1998. Plant cell wall proteins. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. **49**: 281-309.
- Castillo A., Taboada H., Mendoza A., Valderrama B., Encarnacion S., Mora J.** 2000. Role of GOGAT in carbon and nitrogen partitioning in *Rhizobium etli*. Microbiology **146**: 1627-1637.

- Castro L., Acuña O.** 1992. Determinación de la concentración de ureidos en tres leguminosas fijadoras de nitrógeno: soya, frijol y maní. *Agronomía Costarricense*. **16(2)**: 187-193.
- Cebolla A., Palomares A.J.** 1994. Genetic regulation of nitrogen fixation in *Rhizobium metiloti*. *Microbiología*. **10**: 371-84.
- Chen Y.M., Ferrar T.S., Lohmeir-Vogel E., Morrice N., Mizuno Y., Berenger B., Ng K.K., Muench D.G., Moorhead G.B.** 2006. The PII signal transduction protein of *Arabidopsis thaliana* forms an arginine-regulated complex with plastid N-acetyl glutamate kinase. *J. Biol. Chem.* **281**:5726–33.
- Chiurazzi M., Iaccarino M.** 1990. Transcriptional analysis of the *glnB-glnA* region of *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Microbiol.* **4**: 1727.
- Chiurazzi M., Meza R., Lara M., Lahm A., Defez R., Iaccarino M., Espin G.** 1992. The *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli *glnT* gene, encoding glutamine synthetase III. *Gene* **119**: 1–8.
- Colnaghi R., Rudnick P., He L., Green A., Yan D., Larson E., Kennedy C.** Lethality of *glnD* null mutations in *Azotobacter vinelandii* is suppressible by prevention of glutamine synthetase adenylation. *Microbiology*. **147(5)**:1267-1276.
- Commichau F.M., Forchhammer K., Stülke J.** 2006. Regulatory links between carbon and nitrogen metabolism. *Curr. Opin. Microbiol.* **9(2)**: 167-72.
- Connelly H.M., Pelletier D.A., Tse-Yuan L., Lankford P.K., Hettich R.L.** 2006. Characterization of PII family (GlnK1, GlnK2, and GlnB) protein uridylylation in response to nitrogen availability for *Rhodospseudomonas palustris*. *Analytical Biochemistry*. **357**: 93–104.
- Conroy M.J., Jamieson S.J., Blakey D., Kaufmann T., Engel A., Fotiadis D., Merrick M., Bullough P.A.** 2004. Electron and atomic force microscopy of the trimeric ammonium transporter AmtB. *EMBO Rep.* **5(12)**: 1153-1158.
- Conroy M.J., Durand A., Lupo D., Li X., Bullough P.A., Winkler F.K., Merrick M.** 2007. The crystal structure of the *Escherichia coli* AmtB-GlnK complex reveals how GlnK regulates the ammonia channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 1213–1218.
- Cooper J.E.** 2007. Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *J Appl Microbiol.* **103(5)**: 1355-1365.
- Cosgrove D.J., Bedinger P., Durachko D.M.** 1997. Group I allergens of grass pollen as cell wall-loosening agents. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94(12)**:6559–6564.
- Coutts G., Thomas G., Blakey D., Merrick M.** 2002. Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. *The EMBO Journal*. **21(4)**: 536–545.
- Crist E.P.** 1984. Effects of cultural and environmental factors on corn and soybean spectral development patterns. *Remote Sensing of Environment*. **14(1-3)**: 3-13.
- Čuklina J., Hahn J., Imakaev M., Omasits U., Förstner K.U., Ljubimov N., Goebel M., Pessi G., Fischer H.M., Ahrens C.H., Gelfand M.S. y Evguenieva-Hackenberg E.** 2016. Genome-wide transcription start site mapping of *Bradyrhizobium japonicum* grown free-living or in symbiosis – a rich resource to identify new transcripts, proteins and to study gene regulation. *BMC Genomics*. **17**: 302.
- Cullimore J.V., Bennett M.J.** 1991. Nitrogen assimilation in the legume root nodule: current status of the molecular biology of the plant enzymes. *Can. J. Microbiol.* **38**: 461 466.
- Darrow R.A., Knotts R.R.** 1977. Two forms of glutamine synthetase in free-living root-nodule bacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **78**: 554-559.
- Darrow R.A.** 1980. Role of glutamine synthetase in nitrogen fixation. En: *Glutamine: Metabolism, Enzymology, and Regulation*. Editores: Mora J. y Palacios R. Academic Press, New York, EEUU. Págs.: 148-175.
- Darrow R.A., Crist D., Evans W.R., Jones B.L., Keister D.L., Knotts R.R.** 1981. Biochemical and physiological studies on the two glutamine synthetase of *Rhizobium*. En: *Current Perspectives in Nitrogen Fixation*. Editores: Gibson A.H. y Newton W.E. Canberra, Australia. Págs.:182-185.
- Dávalos A., Gómez-Cordovés C., Bartolomé B.** 2004. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-Fluorescein) assay. *J. Agric. Food Chem.* **52**: 48-54.

- de Bruijn F.J., Rossbach S., Schneider M., Ratet P., Messmer S., Szeto W.W., Ausubel F. M., Schell J.** 1989. *Rhizobium meliloti* 1021 has three differentially regulated loci involved in glutamine biosynthesis, none of which is essential for symbiotic nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* **171**: 1673–1682.
- de Lajudie P.M., Young J.P.W.** 2018. International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of rhizobia and agrobacteria Minutes of the closed meeting. *Int J Syst Evol Microbiol.* **68**(10): 3363-3368.
- de Zamaroczy M., Delorme F., Elmerich C.** 1990. Characterization of three different nitrogen-regulated promoter regions for the expression of *glnB* and *glnA* in *Azospirillum brasilense*. *Mol. Gen. Genet.* **224**: 421–430.
- Delamuta J.R., Ribeiro R.A., Ormeño-Orrillo E., Melo I.S., Martínez-Romero E., Hungria M.** 2013. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* **63**(9):3342-3351.
- Delmotte N., Ahrens C., Knief C., Qeli E., Koch M., Fischer H.M., Vorholt J., Hennecke H., Pessi G.** 2010. An integrated proteomics and transcriptomics reference data set provides new insights into the *Bradyrhizobium japonicum* bacteroid metabolism in soybean root nodules. *Proteomics.* **10**: 1391-1400.
- Detsch C., Stulke J.** 2003. Ammonium utilization in *Bacillus subtilis*: transport and regulatory functions of NrgA and NrgB. *Microbiology.* **149**(11): 3289–3297.
- Dixon R., Kahn D.** 2004. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 621–631.
- Dombrecht B., Vanderleyden J., Michiels J.** 2001. Stable RK2-Derived Cloning Vectors for the Analysis of Gene Expression and Gene Function in Gram-Negative Bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**: 426–430.
- Downie J.A.** 2010. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiol Rev.* **34**(2): 150-170.
- Durand A., Merrick M.** 2006. In vitro analysis of the *Escherichia coli* AmtB-GlnK complex reveals a stoichiometric interaction and sensitivity to ATP and 2-oxoglutarate. *J Biol Chem.* **281**(40): 29558-29567.
- Duzan H.M., Mabood F., Souleimanov A., Smith D.L.** 2006. Nod Bj-V (C18:1, MeFuc) production by *Bradyrhizobium japonicum* (USDA110, 532C) at suboptimal growth temperatures. *J. Plant Physiol.* **163**: 107-111.
- Ehlers C., Weidenbach K., Veit K., Forchhammer K., Schmitz R.A.** 2005. Unique mechanistic features of post-translational regulation of glutamine synthetase activity in *Methanosarcina mazei* strain Go1 in response to nitrogen availability. *Mol. Microbiol.* **55**:1841–1854.
- Eisenberg D., Gill H.S., Pfluegl G.M., Rotstein S.H.** 2000. Structure-function relationships of glutamine synthetases. *Biochim. Biophys.* **1477**: 122–145.
- Elkan G.H.** 1981. En: *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 13. Editor: Atherty A. New York, EEUU. Págs.: 1-14.
- Engleman E.G., Francis S.H.** 1978. Cascade control of *E. coli* glutamine synthetase: II. Metabolite regulation of the enzymes in the cascade. *Archives of biochemistry and biophysics.* **191**(2): 602-612.
- Espín G., Moreno S., Wild M., Meza R., Iaccarino M.** 1990. A previously unrecognized glutamine synthetase expressed in *Klebsiella pneumonia* from the *glnT* locus of *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Gen. Genet.* **223**: 513–516.
- Espín G., Moreno S., Guzman J.** 1994. Molecular genetics of the glutamine synthetases in *Rhizobium* species. *Crit. Rev. Microbiol.* **20**: 117–123.
- Espinosa J., Forchhammer K., Burillo S., Contreras A.** 2006. Interaction network in cyanobacterial nitrogen regulation: PipX, a protein that interacts in a 2-oxoglutarate dependent manner with PII and NtcA. *Mol. Microbiol.* **61**:457–469.
- Evans C.G.T., Herbest D., Tempest D.W.** 1970. *Methods in Microbiology.* **2**: 275-327.
- Ferguson B.J., Indrasumunar A., Hayashi S., Lin M.H., Lin Y.H., Reid D.E., Gresshoff P.M.** 2010. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *J Integr Plant Biol.* **52**(1):61-76.
- Ferrario-Mery S., Bouvet M., Leleu O., Savino G., Hodges M., Meyer C.** 2005. Physiological characterisation of *Arabidopsis* mutants affected in the expression of the putative regulatory protein PII. *Planta.* **223**(1): 28–39.

- Fisher S.H., Sonenshein A.L.** 1991. Control of carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**: 107–135.
- Forchhammer K., Hedler A., Strobel H., Weiss V.** 1999. Heterotrimerization of PII-like signalling proteins: implications for PII-mediated signal transduction systems. *Molecular Microbiology.* **33**: 338-349.
- Forchhammer K.** 2007. Glutamine signalling in bacteria. *Front Biosci.* **12**:358-370.
- Forchhammer K.** 2008. PII signal transducers: novel functional and structural insights. *Trends in microbiology.* **16**(2): 65-72.
- Forrest S.I., Verma D.P.S. y Dhindsa R.S.** 1991. Starch content and activities of starch-metabolizing enzymes in effective and ineffective root nodules of soybean. *Canadian Journal of Botany.* **69**(4): 697–701.
- Foster J.W.** 2000. Microbial responses to acid stress. En: *Bacterial stress response*. Editores: Storz G. y Hengge-Aronis R., ASM Press, Washington, D.C., EEUU. Págs.: 9-115.
- Fowler D., Coyle M., Skiba U., Sutton M.A., Cape J.N., Reis S., Sheppard L.J., Jenkins A., Grizzetti B., Galloway J.N., Vitousek P., Leach A., Bouwman A.F., Butterbach-Bahl K., Dentener F., Stevenson D., Amann M., Voss M.** 2013. The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **368**(1621): 20130164.
- Franck W.L., Qiu J., Lee H.I., Chang W.S., Stacey G.** 2015. DNA microarray-based identification of genes regulated by NtrC in *Bradyrhizobium japonicum*. *Applied and environmental microbiology.* **81**(16): 5299–5308.
- Fuchs R.L., Keister D.L.** 1980 Comparative properties of glutamine synthetases I and II in *Rhizobium* and *Agrobacterium spp.* *J. Bacteriol.* **144**(2): 641-648.
- Fujihara S., Yoneyama T.** 1993. Effects of pH and osmotic stress on cellular polyamine contents in the soybean *Rhizobia fredii* P220 and *Bradyrhizobium japonicum* A1017. *Applied and Environmental Microbiology.* **59**: 1104-1109.
- Fujishige N.A., Lum M.R., De Hoff P.L., Whitelegge J.P., Faull K.F., Hirsch A.M.** 2008. Rhizobium common nod genes are required for biofilm formation. *Mol Microbiol.* **67**(3): 504-515.
- Gage D.J.** 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev.* **68**: 280-300.
- Gaworzewska E.T., Carlile M.J.** 1982. Positive Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* and other Bacteria towards Root Exudates from Legumes and other Plants. *Microbiology* **128**(6): 1179-1188.
- Goodman H.J.K., Woods D.R.** 1993. Cloning and nucleotide sequence of the *Butyrivibrio fibrisolvens* gene encoding a type III glutamine synthetase. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 1487–1493.
- Gordon A.J., Ryle G.J.A., Mitchell D.F., Powell C.E.** 1985. The flux of ¹⁴C-labeled photosynthate through soybean root nodules during N₂ fixation. *Journal of Experimental Botany.* **36**: 756–769.
- Gosztolai A., Schumacher J., Behrends V., Bundy J.G., Heydenreich F., Bennett M.H., Buck M., Barahona M.** 2017. GlnK facilitates the dynamic regulation of bacterial nitrogen assimilation. *Biophys. J.* **112**: 2219–2230.
- Grageda-Cabrera O.A., Vera-Núñez J.A., Castellanos J.Z., Peña-Cabriales.** 2003. Comparación de métodos para estimar la fijación de N₂ en frijol en condiciones de campo. *TERRA Latinoamericana.* **21**(1): 65-71.
- Graham, P.H.** 1992. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil-conditions. *Can. J. Microbiol.* **38**: 475-484.
- Gruswitz F., O'Connell J., Stroud R.M.** 2007. Inhibitory complex of the transmembrane ammonia channel, AmtB, and the cytosolic regulatory protein, GlnK, at 1.96 Å. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 42–47.
- Hablieb C.M., Luden P.W.** 2000. Regulation of biological nitrogen fixation. *J. Nutr.* **130**: 1081-1084.
- Hadri A.E., Spanik H.P., Bisseling T., Brewin N.J.** 1998 Diversity of root nodulation and rhizobial infection processes. En: *The Rhizobiaceae*. Editores: Spaink H.P., Kondorosi A., Hooykaas P.J.J. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Países Bajos. Págs.: 348-360.
- Hauser F., Lindemann A., Vuilleumier S., Patrignani A., Schlapbach R., Fischer H.M., Hennecke H.** 2006. Design and validation of a partial-genome microarray for transcriptional profiling of the *Bradyrhizobium japonicum* symbiotic gene region. *Mol Genet Genomics* **275**: 55-67.

- He L., Soupene E., Ninfa A., Kustu S.** 1998. Physiological role for the GlnK protein of enteric bacteria: relief of NifL inhibition under nitrogen-limiting conditions. *J. Bacteriol.* **180**:6661–67.
- Heinrich A., Maheswaran M., Ruppert U., Forchhammer K.** 2004. The *Synechococcus elongates* P signal transduction protein controls arginine synthesis by complex formation with N-acetyl-L-glutamate kinase. *Mol. Microbiol.* **52**:1303–1314.
- Heinrich A., Woyda K., Brauburger K., Meiss G., Detsch C., Stulke J., Forchhammer K.** 2006. Interaction of the membrane-bound GlnK-AmtB complex with the master regulator of nitrogen metabolism TnrA in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **281**: 34909–34917.
- Helling R.B.** 1994. Why does *Escherichia coli* have two primary pathways for synthesis of glutamate? *J. Bacteriol.* **176**: 4664–4668.
- Helling R.B.** 1998. Pathway choice in glutamate synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**: 4571–4575.
- Herridge D., Rose I.** 2000. Breeding for enhanced nitrogen fixation in crop legumes. *Field Crop Res.* **65**: 229–248.
- Hill R., Parker J., Goodman H., Jones D., Woods D.** 1989. Molecular analysis of a novel glutamine synthetase of the anaerobe *Bacteroides fragilis*. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 3271–3279.
- Hirsch A.M., Wilson K.J., Jones J.D., Bang M., Walker V.V., Ausubel F.M.** 1984. *Rhizobium meliloti* nodulation genes allow *Agrobacterium tumefaciens* and *Escherichia coli* to form pseudonodules on alfalfa. *Journal of Bacteriology.* **158**(3): 1133–1143.
- Hirsch P., Sprent J.I.** 2002. Nodulation in legumes. *Ann. Bot.* **89**(6): 797–798.
- Hoben P., Royal N., Cheung A., Yamao F., Biemann K., Soll D.** 1982. *Escherichia coli* glutaminyl-tRNA synthetase. II. Characterization of the *glnS* gene product. *J Biol Chem* **257**: 11644–11650.
- Holm L., Sander C.** 1995. DNA polymerase belongs to an ancient nucleotidyltransferase superfamily. *Trends Biochem. Sci.* **20**: 345–347.
- Howitt S.M., Gresshoff P.M.** 1985. Ammonia regulation of glutamine synthetase in *Rhizobium sp.* ANU289. *Microbiology.* **131**(6): 1433–1440.
- Howitt S.M., Udvardi K., Day D., Gresshoff P. M.** 1986. Ammonia transport in free-living and symbiotic *Rhizobium sp.* ANU289. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 257–261.
- Hsieh M., Lam H., Van de Loo F.J., Coruzzi G.** 1998. A PII-like protein in *Arabidopsis*: putative role in nitrogen sensing. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95**: 13965–13970.
- Huergo L.F., Chubatsu L.S., Souza E.M., Pedrosa F.O., Steffens M.B., Merrick M.** 2006. Interactions between PII proteins and the nitrogenase regulatory enzymes DraT and DraG in *Azospirillum brasilense*. *FEBS Lett.* **580**(22): 5232–5236.
- Huergo, L.F., Chandra, G., Merrick, M.** 2013. PII signal transduction proteins: nitrogen regulation and beyond. *FEMS Microbiol.* **37**: 251–283.
- Humbeck C., Thierfelder H., Gresshoff P.M. y Werner D.** 1985. Competitive growth of slow growing *Rhizobium japonicum* against fast growing *Enterobacter* and *Pseudomonas* species at low concentrations of succinate and other substrates in dialysis culture. *Arch. Microbiol.* **142**: 223–228.
- Jack R., de Zamaroczy M., Merrick M.** 1999. The signal transduction protein GlnK is required for NifL-dependent nitrogen control of nif gene expression in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **181**:1156–1162.
- Javelle A., Severi E., Thornton J., Merrick M.** 2004. Ammonium sensing in *Escherichia coli*. Role of the ammonium transporter AmtB and AmtB–GlnK complex formation. *J. Biol. Chem.* **279**(10): 8530–8.
- Javelle A., Merrick M.** 2005. Complex formation between AmtB and GlnK: an ancestral role in prokaryotic nitrogen control. *Biochem. Soc. Trans.* **33**:170–172.
- Javelle A., Thomas G., Marini A.M., Kramer R., Merrick M.** 2005. *In vivo* functional characterization of the *Escherichia coli* ammonium channel AmtB: evidence for metabolic coupling of AmtB to glutamine synthetase. *Biochem J.* **390**(1): 215–222.
- Jeong H., Barbe V., Lee C.H., Vallenet D., Yu D.S., Choi S.H., Couloux A., Lee S.W., Yoon S.H., Cattolico L., Hur C.G., Park H.S., Ségurens B., Kim S.C., Oh T.K., Lenski R.E., Studier F.W., Daegelen P., Kim J.F.** 2009. Genome sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21(DE3). *J. Mol. Biol.* **394**: 644–52.

- Jiang L., Ninfa A.J.** 2007. *Escherichia coli* PII signal transduction protein controlling nitrogen assimilation acts as a sensor of adenylate energy charge in vitro. *Biochemistry*. **46**(45): 12979-12996.
- Jiang P., Zucker P., Atkinson M.R., Kamberov E.S., Tirasophon W., Chandran P., Ninfa A.J.** 1997. Structure/function analysis of the PII signal transduction protein of *Escherichia coli*: genetic separation of interactions with protein receptors. *Journal of Bacteriology*. **179**(13): 4342-4353.
- Jiang P., Peliska J.A., Ninfa A.J.** 1998. Enzymological characterization of the signaltransducing uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme (EC 2.7.7.59) of *Escherichia coli* and its interaction with the PII protein. *Biochemistry*. **37**:12782–12794.
- Jiang P., Ninfa A.J.** 1999. Regulation of the autophosphorylation of *Escherichia coli* NRII by the PII signal transduction protein. *J. Bacteriol.* **181**: 1906-1911.
- Jiménez-Guerrero I., Acosta-Jurado S., Del Cerro P., Navarro-Gómez P., López-Baena F.J., Ollero F.J., Vinardell J.M., Pérez-Montaño F.** 2017. Transcriptomic studies of the effect of nod gene-inducing molecules in Rhizobia: different weapons, one purpose. *Genes (Basel)*. **9**(1): 1.
- Jin H., Nikolau B.J.** 2012. The role of genetic redundancy in polyhydroxyalkanoate (PHA) polymerases in PHA biosynthesis in *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.* **194**(20):5522-9.
- Jordan D.** 1984. The Rhizobiaceae. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Editores: Holt J.G.y Kreig N.R., Willians y Wilkins L. Willians y Wilkins, London, Inglaterra. Págs.: 24–43.
- Kahn M.L., Kraus J., Somerville J.E.** 1985. A model for nutrient exchange in the *Rhizobium*-legume symbiosis. En: Nitrogen fixation research progress. Editor: Evans H.J. Dordrecht, Países Bajos. Págs.: 193–199.
- Kajić S., Hulak N. y Sikora S.** 2016. Environmental stress response and adaptation mechanisms in Rhizobia. *Agriculturae Conspectus Scientifi cus*. **81**: 15-19.
- Kanbe M., Yagasaki J., Zehner S., Gottfert M. y Aizawa S.I.** 2007. Characterization of two sets of subpolar flagella in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* **189**: 1083–1089.
- Kaneko T., Nakamura Y., Sato S., Minamisawa K., Uchiumi T., Sasamoto S., Watanabe A., Idesawa K., Iriguchi M., Kawashima K., Kohara M., Matsumoto M., Shimpo S., Tsuruoka H., Wada T., Yamada M., Kaneshiro T., Kurtzman M.A.** 1982. Glutamate as a differential nitrogen source for the characterization of acetylene-reducing *Rhizobium* strains. *Journal of Applied Bacteriology*. **52**(2): 201–207.
- Keener J., Kustu S.** 1988. Protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities of nitrogen regulatory proteins NTRB and NTRC of enteric bacteria: roles of the conserved amino-terminal domain of NTRC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **85**: 4976–4980.
- Keister L.D., Jones B.L., Kondorosi A., Svab Z.** 1987.Characteristics of glutamine synthetase I and II mutants of *Rhizohium*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **33**: 267.
- Kelley L., Sternberg M.J.E.** 2009. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat. Protoc.* **4**: 363–71.
- Khademi S., O'Connell J., Remis J., Y. Robles-Colmenares Y., Miercke L.J., Stroud R. M.** 2004. Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: structure of AmtB at 1.35 Å. *Science* **305**(5690): 1587-1594.
- Khademi S., Stroud R.M.** 2005. The Amt/MEP/Rh Family: Structure of AmtB and the mechanism of ammonia gas conduction. *Physiology*. **21**(6): 419-429
- Kikeri D., Sun A., Zeidel M.L., Hebert S.C.** 1989. Cell membranes impermeable to NH₃. *Nature*. **339**(6224): 478-480.
- Kirchner O., Tauch A.** 2003. Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*. **104**(1-3): 287-299.
- Kleiner D.** 1981. The transport of NH₃ and NH₄⁺ across biological membranes." *Biochim Biophys Acta* **639**(1): 41-52.
- Kleiner D.** 1985. Energy expenditure for cyclic retention of NH₃/NH₄⁺ during N₂ fixation by *Klebsiella pneumoniae*. *FEBS Lett.* **187**(2): 237-239.
- Kondorosi E., Mergaert P., Kereszt A.** 2013. A paradigm for endosymbiotic life: cell differentiation of *Rhizobium* bacteria provoked by host plant factors. *Annu. Rev. Microbiol.* **67**:611-628.

- Kouchi H., Yoneyama T.** 1986. Metabolism of [¹³C]-labeled photosynthate in plant cytosol and bacteroids of root nodules of *Glycine max*. *Physiology Plant*. **68**: 238–244.
- Krusell L., Madsen L. H., Sato S., Aubert G., Genua A., Szczyglowski K., Due G., Kaneko, S. Tabata T., de Bruijn F., Pajuelo B., Sandal N., Stougaard J.** 2002. Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. *Nature*. **420**: 422-426.
- Kurz W.G.W., Rokosh D.A., LaRue T.A.** 1975. Enzymes of ammonia assimilation in *Rhizobium leguminosarum* bacteroids. *Can. J. Mien. biol.* **21**: 1009-1012.
- Laemmlí U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lamelza F.** 2013. Obtención de un mutante en el gen *glnII* en *Bradyrhizobium japonicum* y su influencia en la simbiosis con soja. Trabajo Final de Licenciatura. Universidad Nacional de La Plata.
- Le S.Q., Gascuel O.** 1993. An improved general amino acid replacement matrix. *Mol. Biol. Evol.* **25**(7): 1307-1320.
- Lebrazi S., Fikri Benbrahim K.** 2014. Environmental stress conditions affecting the N₂ fixing *Rhizobium*-legume symbiosis and adaptation mechanisms. *African J. of Microbiology Research*. **8**(53): 4053-4061.
- Lee S., Flores-Encarnación M., Contreras-Zentella M., Garcia-Flores L., Escamilla J.E., Kennedy C.** 2004. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome c biogenesis genes. *J. Bacteriol.* **186**(16): 5384-5391.
- Lehninger A.L., Nelson D.L., Cox M.M.** 2005. Biosynthesis of amino acids, nucleotides, and related molecules. En: *Lehninger principles of biochemistry*. 4th ed. Freeman W.H., New York, EEUU. Págs.: 833–880.
- Leigh J.A., Dodsworth J.A.** 2007. Nitrogen Regulation in Bacteria and Archaea. *Annual Review of Microbiology*. **61**(1): 349–377.
- Lengeler J.W., Drews G., Schlegel H.G.** 1999. Biology of the Prokaryotes. *Internatl Microbiol.* **2**: 125–130.
- Liaw S.H., Pan C., Eisenberg D.** 1993. Feedback inhibition of fully unadenylylated glutamine synthetase from *Salmonella typhimurium* by glycine, alanine and serine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 4996–5000.
- Liaw S.H., Jun G., Eisenberg D.** 1994. Interactions of nucleotides with fully unadenylylated glutamine synthetase from *Salmonella typhimurium*. *Biochemistry*. **33**: 11184–11188.
- Limpens E., Mirabella R., Fedorova E., Franken C., Franssen H., Bisseling T., Geurts R.** 2005. Formation of organelle-like N₂-fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by DMI2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**(29):10375-10380.
- Lindström K., Kokko-Gonzales P., Terefework Z., Räsänen L.A.** 2006. Differentiation of nitrogen-fixing legume root nodule bacteria. En: *Molecular techniques for soil and rhizosphere microorganisms*. Editores: Cooper J.E., Rao J.R. CABI Publishing, Wallingford, EEUU. Págs.: 236–258.
- Lindström K., Martínez-Romero E.** 2007. International committee on systematics of prokaryotes subcommittee on the taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium*: minutes of the meeting, 23-24 July 2006, Århus, Denmark. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**:1365–1366.
- Little R., Reyes-Ramirez F., Zhang Y., van Heeswijk W.C., Dixon R.** 2000. Signal transduction to the *Azotobacter vinelandii* NIFL-NIFA regulatory system is influenced directly by interaction with 2-oxoglutarate and the PII regulatory protein. *EMBO J.* **19**:6041–6050.
- Little R., Colombo V., Leech A., Dixon R.** 2002. Direct interaction of the NifL regulatory protein with the GlnK signal transducer enables the *Azotobacter vinelandii* NifL-NifA regulatory system to respond to conditions replete for nitrogen. *J. Biol. Chem.* **277**:15472–15481.
- Liu Y., Hu X.** 2006. Molecular determinants for binding of ammonium ion in the ammonia transporter AmtB-A quantum chemical analysis. *J Phys Chem A*. **110**(4): 1375-1381.
- Lloret L., Martínez-Romero E.** 2005. Evolución y filogenia del *Rhizobium*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. **47** (1-2): 43.
- Lodeiro A.R., López-García S.L., Vazquez T.E., Favelukes G.** 2000. Stimulation of adhesiveness, infectivity, and competitiveness for nodulation of *Bradyrhizobium japonicum* by its pretreatment with soybean seed lectin. *FEMS Microbiol. Lett.* **188**: 177-184.

- Lodeiro A.R., López García S.L., Mongiardini E., Quelas J.I., Peticari A.** 2003. Los rizobios y la inoculación de las leguminosas para la fijación simbiótica de nitrógeno. En: Microbiología Agrícola: Un Aporte De La Investigación Argentina. Editores: Albanesi A., Anriquez A., Luna S., Kunst C. y Ledesma R. Argentina. Págs. 159-193.
- Lodeiro A.R.** 2015. Queries related to the technology of soybean seed inoculation with *Bradyrhizobium spp.* Rev. Argent. Microbiol. **47**(3): 261-273.
- Lodwig E., Poole P.** 2003. Metabolism of *Rhizobium* bacteroids. Crit. Rev. Plant Sci. **22**: 37-78.
- López-García S.L., Vázquez T.E, Favelukes G., Lodeiro A.R.** 2001. Improved soybean root association of N-starved *Bradyrhizobium japonicum*. J. Bacteriol. **183**: 7241–7252.
- López-García S.L., Vazquez T.E., Favelukes G., Lodeiro A.R.** 2002. Rhizobial position as a main determinant in the problem of competition for nodulation in soybean. Environmental Microbiology. **4**: 216-24.
- López-García S.L.** 2004. Tesis Doctoral. Interacciones tempranas entre *Bradyrhizobium japonicum* y soja: efectos de la escasez de N y la distribución de los rizobios sobre la raíz. Facultad de Ciencias. Exactas, (UNLP).
- López-García S.L., Peticari A., Piccinetti C., Ventimiglia L., Arias N., De Battista J.J., Althabegoiti M.J., Mongiardini E.J., Pérez Giménez J., Quelas J.I., Lodeiro A.R.** 2009. In-furrow inoculation and selection for higher motility enhances the efficacy of *Bradyrhizobium japonicum* nodulation. Agronomy Journal. **101**: 357–363.
- Lowendorf H.S., Baya A.M., Alexander M.** 1981. Survival of *Rhizobium* in acid soils. Appl. Environ. Microbiol. **42**(6): 951-957.
- Ludwig R.A.** 1978. Control of ammonium assimilation in *Rhizobium* 32H1. J. Bacteriol. **135**: 114-123.
- Ludwig R.A.** 1980. Physiological roles of glutamine synthetases I and II in ammonium assimilation in *Rhizobium sp.* 32H1. J. Bacteriol. **141**: 1209-1216.
- Maheswaran M., Urbanke C., Forchhammer K.** 2004. Complex formation and catalytic activation by the PII signaling protein of N-acetyl-L-glutamate kinase from *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942. J. Biol. Chem. **279**:55202–55210.
- Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J.** 1982. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Marini A.M., Vissers S., Urrestarazu A., Andre B.** 1994. Cloning and expression of the MEP1 gene encoding an ammonium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. The EMBO journal. **13**(15): 3456-3463.
- Marini A.M., Soussi-Boudekou S., Vissers S., Andre B.** 1997. A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol. **17**(8): 4282-4293.
- Martin G.B., Chapman K.A., Chelm B.K.** 1988. Role of the *Bradyrhizobium japonicum ntrC* gene product in differential regulation of the glutamine synthetase II gene (*glnII*). J. Bacteriol. **170**: 5452-5459.
- Martin G.B., Thomashow M.F., Chelm B.K.** 1989. *Bradyrhizobium japonicum glnB*, a putative nitrogen-regulatory gene, is regulated by NtrC at tandem promoters. J. Bacteriol. **171**(10):5638-45.
- Marzluf G.A.** 1997. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. Microbiology and Molecular Biology Reviews. **61**: 17-32.
- Mendoza A., Leija A., Martinez-Romero B., Hernandez G., Mora J.** 1995. The enhancement of ammonium assimilation in *Rhizobium etli* prevents nodulation of *Phaseolus vulgaris*. Mol. Plant-Microbe Interact. **8**: 584-592.
- Mergaert P., Van Montagu M., Holsters M.** 1997. Molecular mechanisms of Nod factor diversity. Mol Microbiol. **25**(5): 811-817.
- Merrick M.J., Edwards R.A.** 1995. Nitrogen control in bacteria. Microbiol. Rev. **59**(4): 604-22.
- Michel-Reydellet N., Desnoues N., Elmerich C., Kaminski P.A.** 1997. Characterization of *Azorhizobium caulinodans glnB* and *glnA* genes: involvement of the P(II) protein in symbiotic nitrogen fixation. Journal of Bacteriology. **179**(11): 3580–3587.
- Miller R.E, Stadtman E. R.** 1972. Glutamate synthase from *Escherichia coli*: an iron-sulfide flavoprotein. J. Biol. Chem. **247**:7407-7419.

- Mizuno Y.B., Moorhead G.B., Ng K.K.** 2007. Crystal structure of *Arabidopsis* PII reveals novel structural elements unique to plants. *Biochemistry*. **46**:1477–1483.
- Mongiardini E.J., Quelas, J.I., Dardis C., Althabegoiti M.J., Lodeiro A.R.** 2017 Transcriptional control of the lateral-flagellar genes of *Bradyrhizobium diazoefficiens*. *J. Bacteriol.* **199**(15).
- Moreno S., Meza R., Guzman J., Caravez A., Espín G.** 1991. The *glnA* gene of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* and its role in symbiosis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**: 619.
- Mort A.J., Bauer W.D.** 1982. Application of two new methods for cleavage of polysaccharides into specific oligosaccharide fragments. Structure of the capsular and extracellular polysaccharides of *Rhizobium japonicum* that bind soybean lectin. *J. Biol. Chem.* **257**: 1870-1875.
- Mulley G., White J.P., Karunakaran R., Prell J., Bourdes A., Bunnewell S., Hill L., Poole P.S.** 2011. Mutation of GOGAT prevents pea bacteroid formation and N₂ fixation by globally downregulating transport of organic nitrogen sources. *Molecular Microbiology* **80**(1):149–167.
- Natera S.H.A., Guerreiro N., Djordjevic M.** 2000. Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for the investigation of symbiosis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 995-1009.
- Ninfa A.J. y Magasanik B.** 1986. Covalent modification of the *glnG* product, NRI, by the *glnL* product, NRII, regulates the transcription of the *glnALG* operon in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 5909–5913.
- Ninfa A.J., Atkinson M.R., Kamberov E.S., Feng J, Ninfa E. G.** 1995. Control of nitrogen assimilation by the NRI-NRII two-component system of enteric bacteria. En: Two-component signal transduction. Editores Hoch J.A. y Silhavy T.J. American Society for Microbiology. Washington, EEUU. Págs.: 67-88.
- Ninfa A.J., Atkinson M.R.** 2000. PII signal transduction proteins. *Trends Microbiol.* **8**: 172-179.
- Ninfa A. J., Jiang P., Atkinson M. R. y Peliska J. A.** 2000. Integration of antagonistic signals in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. *Curr. Top. Cell. Regul.* **36**: 31-75.
- Ninfa A.J., Jiang, P.** 2005. PII signal transduction proteins: sensors of alpha-ketoglutarate that regulate nitrogen metabolism. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**: 168–173.
- Ninnemann O., Jauniaux J.C., Frommer W.B.** 1994. Identification of a high affinity NH₄⁺ transporter from plants. *EMBO J.* **13**: 3464–3471.
- Noindorf L., Bonatto A.C., Monteiro R.A., Souza E.M., Rigo L.U., Pedrosa F.O., Chubatsu L.S.** 2011. Role of PII proteins in nitrogen fixation control of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1. *BMC Microbiology.* **11**: 8.
- O'Gara F., Shanmugan K.T.** 1976. Regulation of nitrogen fixation by Rhizobia: export of fixed N₂ as NH₄⁺. *Biochim. Biophys.* **437**: 313-321.
- Oke V., Long S.R.** 1999. Bacteroid formation in the Rhizobium-legume symbiosis. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 641-6.
- Oldroyd G.E., Downie J.A.** 2008. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol.* **59**: 519-546.
- Oldroyd G.E., Murray J.D., Poole P.S., Downie J.A.** 2011. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu. Rev. Genet.* **45**: 119-144.
- Palmer K.M., Turner S.L., Young J.P.** 2000. Sequence diversity of the plasmid replication gene repC in the *Rhizobiaceae*. *Plasmid.* **44**(3): 209-219.
- Pate J.S., Atkins C.A., White S.T., Rainbird R.M., Woo K.C.** 1980. Nitrogen nutrition and xylem transport of nitrogen in ureide producing grain legumes. *Plant Physiol.* **65**: 961–65.
- Patriarca E.J., Tate R., Iaccarino M.** 2002. Key role of bacterial NH₄⁺ metabolism in *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol. Mol. Biol.* **66**(2): 203–222.
- Patriarca E.J., Tatè R., Ferraioli S., Iaccarino M.** 2004. Organogenesis of legume root nodules. *Int. Rev. Cytol.* **234**: 201–262.
- Pawlowski A., Riedel K.U., Klipp W., Dreiskemper P., Gross S., Bierhoff H., Drepper T., Masepohl B.** 2003. Yeast two hybrid studies on interaction of proteins involved in regulation of nitrogen fixation in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* **185**:5240–5247.

- Peck M.C., Fisher R.F., Long S.R.** 2006. Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to nod gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **188**(15): 5417-5427.
- Pedro-Roig L., Camacho M., Bonete M.J.** 2011. *In vitro* proof of direct regulation of glutamine synthetase by GlnK proteins in the extreme halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*. *Biochem. Soc. Trans.* **39**: 259–262.
- Pedro-Roig L., Lange C., Bonete M.J., Soppa J., Maupin-Furlow J.** 2013. Nitrogen regulation of protein-protein interactions and transcript levels of GlnK PII regulator and AmtB ammonium transporter homologs in Archaea. *Microbiologyopen*. **2**(5):826-40.
- Peoples M.B., Boddey R.M., Herridge D.F.** 2002. Quantification of nitrogen fixation. En: Nitrogen fixation at the millennium. Editor: Leigh G.J. Amsterdam: Elsevier Science. Londres, Inglaterra. Págs: 357–389.
- Perret X., Staehelin C., Broughton W.J.** 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev.* **64**(1): 180-201.
- Pessi G., Ahrens C.H., Rehrauer H., Lindemann A., Hauser F., Fischer H.-M., Hennecke H.** 2007. Genome-wide transcript analysis of *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids in soybean root nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* **20**(11): 1353–1363.
- Popp C., Ott T.** 2011. Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**(4): 458-467.
- Porter S.C., North A.K., Kustu S.** 1995. Mechanism of transcriptional activation by NTRC (Nitrogen Regulatory Protein C): Requirement for oligomerization and phosphorylation. En: Two-Component Signal Transduction. Editores: Silhavy T. y Hoch J., American Society for Microbiology, Washington, DC, EEUU.
- Postgate J.** 1982. Biology Nitrogen Fixation: Fundamentals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences,* **296**(1082): 375-385. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/2395691>
- Prell J., Poole P.S.** 2006. Metabolic changes in rhizobia. *Trends in Microbiology* **14**: 161-168.
- Prentki P., Krisch H.M.** 1984. In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene.* **29**: 303–313.
- QIAGEN.** 2003. The QIAexpressionist. A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins.
- Quelas J.I., López-García S.L., Casabuono A., Althabegoiti M.J., Mongiardini E.J., Pérez-Giménez J., Couto A., Lodeiro A.R.** 2006. Effects of N-starvation and C-source on *Bradyrhizobium japonicum* exopolysaccharide production and composition, and bacterial infectivity to soybean roots. *Arch. Microbiol.* **186**: 119-128.
- Quelas J.I.** 2009. Biosíntesis de exopolisacáridos y polihidroxitirato y su relación con la simbiosis *Bradyrhizobium japonicum* - soja. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
- Quelas J.I., Mongiardini E.J., Pérez-Giménez J., Parisi G., Lodeiro A.R.** 2013. Analysis of two polyhydroxyalkanoate synthases in *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. *J. Bacteriol.* **195**(14): 3145–3155.
- Rao V.R., Darrow R.A., Keister D.L.** 1978. Effect of oxygen tension on nitrogenase and on glutamine synthetases I and II in *Rhizobium japonicum* 61A76. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **81**: 224-231.
- Ravishankara A.R., Daniel J.S., Portmann R.W.** 2009. Nitrous oxide (N₂O): the dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century. *Science* **326**(5949): 123-125.
- Raymond J., Siefert J.L., Staples C.R., Blankenship R.E.** 2004. The natural history of nitrogen fixation. *Mol. Biol. Evol.* **21**: 541-554.
- Regensburger B., Hennecke H.** 1983. RNA polymerase from *Rhizobium japonicum*. *Arch. Microbiol.* **135**:103-109.
- Reibach P.H., Streeter J.G.** 1983. Metabolism of ¹⁴C-labeled photosynthate and distribution of enzymes of glucose metabolism in soybean nodules. *Plant Physiology.* **72**: 634–640.
- Reitzer L.** 2003. Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**: 155–176.

- Reyes J., Florencio F.** 1994. A new type of glutamine synthetase in cyanobacteria: the protein encoded by the *glnN* gene supports nitrogen assimilation in *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *J. Bacteriol.* **176**: 1260–1267.
- Rice W.A., Penney D.C., Nyborg M.** 1977. Effects of soil acidity on rhizobia numbers, nodulation and nitrogen fixation by alfalfa and red clover. *Can. J. Soil Sci.* **57**: 197-203.
- Ronson C.W., Nixon B.T., Ausubel F.M.** 1987. Conserved domains in bacterial regulatory proteins that respond to environmental stimuli. *Cell.* **49**(5): 579-581.
- Rossi M., Defez R., Chiurazzi M., Lamberti A., Fuggi A., Iaccarino M.** 1989. Regulation of glutamine synthetase isoenzymes in *Rhizobium leguminosarum biovar viciae*. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 629.
- Rudnick P.A., Arcondéguy T., Kennedy C.K., Kahn D.** 2001. *glnD* and *mviN* are genes of an essential operon in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **183**(8): 2682-5268.
- Rudnick P., Kunz C., Gunatilaka M.K., Hines E.R., Kennedy C.** 2002. Role of GlnK in NifL-mediated regulation of NifA activity in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **184**:812–820.
- Sadowski, M.J., Graham P.H.** 1998. Soil Biology of the *Rhizobiaceae*. En: *The Rhizobiaceae. Molecular biology of model plant-associated bacteria*. Editores: Spaink A. Kondorosi y Hooykaas P.J.J. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Países Bajos. Págs.: 155-172.
- Sadowsky M.** 2005. Soil Stress Factors Influencing Symbiotic Nitrogen Fixation. In: *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment*. Editores: Werner D. y Newton W.E. Springer. Países Bajos. Págs.: 89-112.
- Sakai H., Wang H., Takemoto-Hori C., Kaminishi T., Yamaguchi H., Kamewari Y., Terada T., Kuramitsu S., Shirouzu M., Yokoyama S.** 2005. Crystal structures of the signal transducing protein GlnK from *Thermus thermophilus* HB8. *J Struct Biol.* **149**:99–110.
- Salminen S.O., Streeter J.G.** 1987. Uptake and metabolism of carbohydrates by *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. *Plant Physiology.* **83**: 535–540.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3ed. New York. New York. USA.
- Sant'Anna F.H., Trentini D.B., de Souto W.S., Cecagno R., da Silva S.C. y Schrank I.S.** 2009. The PII superfamily revised: a novel group and evolutionary insights. *J. Mol. Evol.* **68**: 322–336.
- Sawada H., Kuykendall L.D., Young J.M.** 2003. Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **49**: 155–179.
- Schafer A., Tauch A., Jäger W., Kalinowski J., Thierbach G., Pühler A.** 1994. Small mobilizable multipurpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene.* **145**(1): 69-73.
- Schauser L., Roussis A., Stiller J., Stougaard J.** 1999. A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature.* **402**: 191-195.
- Schluter A., Nohlen M., Kramer M., Defez R., Priefer U.B.** 2000. The *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* GlnD gene, encoding a uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme, is expressed in the root nodule but is not essential for nitrogen fixation. *Microbiology.* **146**: 2987–2996.
- Schumacher J, Behrends V, Pan Z, Brown DR, Heydenreich F, Lewis MR, Bennett MH, Razzaghi B, Komorowski M, Barahona M, Stumpf MPH, Wigneshweraraj S, Bundy JG, Buck M.** 2013. Nitrogen and carbon status are integrated at the transcriptional level by the nitrogen regulator NtrC in vivo. *mBio* **4**(6): 881-913.
- Senior P.J.** 1975. Regulation of nitrogen metabolism in *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*: studies with the continuous-culture technique. *J. Bacteriol.* **123**:407–418.
- Shapiro B.M., Stadtman E.R.** 1986. Glutamine synthetase deadenylylating enzyme. *Biochem. Biophys Res. Commun.* **30**(1): 32-7.
- Shatters R.G., Liu Y., Kahn M.L.** 1993. Isolation and characterization of a novel glutamine synthetase from *Rhizobium meliloti*. *J. Biol. Chem.* **268**:469–475.
- Shaw V.K., Brill W.J.** 1977. Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 3249-3253.

- Simon R., Priefer U., Pühler A.** 1983. A broad host range mobilisation system for in vivo genetic engineering transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Biotechnology* **1**: 784-791.
- Simon R., Quandt J., Klipp W.** 1989. New derivatives of transposon Tn5 suitable for mobilization of replicons, generation of operon fusions and induction of genes in gram-negative bacteria. *Gene* **80**(1): 161-169.
- Smit G., Swart S., Lugtenberg B.J., Kijne J.W.** 1992. Molecular mechanisms of attachment of Rhizobium bacteria to plant roots. *Mol Microbiol.* **6**(20): 2897-2903.
- Solorzano L.** 1969 Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite method *Limnol. Oceanogr.* **14**: 799-801.
- Soupe E., He L., Yan D., Kustu S.** 1998. Ammonia acquisition in enteric bacteria: physiological role of the ammonium/methylammonium transport B (AmtB) protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95**(12): 7030-7034.
- Spinosa M., Riccio A., Mandrich L., Manco G., Lamberti A., Iaccarino M., Patriarca E.J.** 2000. Inhibition of glutamine synthetase II expression by the product of the *gstI* gene. *Molecular microbiology.* **37**(2): 443-452.
- Stadtman E.R.** 2001. The story of glutamine synthetase regulation. *J Biol Chem.* **276**(48):44357-44364.
- Stowers M.D.** 1985. Carbon metabolism in Rhizobium species. *Annu Rev Microbiol.* **39**: 89-108.
- Streeter J.G.** 1981. Seasonal distribution of carbohydrates in nodules and stem exudate from field grown soya bean plants. *Annals of Botany.* **48**: 441-450.
- Streeter J.G.** 1987. Carbohydrate, organic acid, and amino acid composition of bacteroids and cytosol from soybean nodules. *Plant Physiology.* **85**: 768-773.
- Streng A., op den Camp R., Bisseling T., Geurts R.** 2011. Evolutionary origin of rhizobium Nod factor signaling. *Plant Signal Behav.* **6**(10): 1510-1514.
- Strosser J., Ludke A., Schaffer S., Kramer R., Burkovski A.** 2004. Regulation of GlnK activity: modification, membrane sequestration and proteolysis as regulatory principles in the network of nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol* **54**: 132-147.
- Sugiyama K., Hayakawa T., Kudo T., Ito T., Yamaya T.** 2004. Interaction of N-acetylglutamate kinase with a PII-like protein in rice. *Plant Cell Physiol.* **45**: 1768-1778.
- Sukdeo N., Charles T.C.** 2003. Application of crossover-PCR-mediated deletion-insertion mutagenesis to analysis of the *bdhA-xdhA2-xdhB2* mixed-function operon of *Sinorhizobium meliloti*. *Arch Microbiol.* **179**(4): 301-304.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S.** 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution.* **30**: 2725-2729.
- Tatè R., Riccio A., Merrick M. y Patriarca E. J.** 1998. The *Rhizobium etli amtB* gene coding for an NH₄⁺ transporter is down-regulated early during bacteroid differentiation. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **11**: 188-198.
- Tatè R., Mandrich L., Spinosa M.R., Riccio A., Lamberti A., Iaccarino M., Patriarca E.J.** 2001. The Rhizobium GstI protein reduces the NH₄⁺ assimilation capacity of *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**: 823-831.
- Temple S.J., Vance C.R., Gantt J.S.** 1998. Glutamate synthase and nitrogen assimilation. *Trends Plant Sci.* **3**: 51-56.
- Terpolilli J.J., Hood G.A., Poole P.S.** 2012. What determines the efficiency of N(2)-fixing Rhizobium-legume symbioses? *Adv Microb Physiol.* **60**: 325-389.
- Thomas G., Coutts G., Merrick M.** 2000a. The *glnK-amtB* operon. A conserved gene pair in prokaryotes. *Trends Genet.* **16**:11-14.
- Thomas G., Mullins J.G.L., Merrick M.** 2000b. Membrane topology of the Mep/Amt family of ammonium transporters. *Mol Microbiol.* **37**: 331-344.
- Thornton J., Blakey D., Scanlon E., Merrick M.** 2006. The ammonia channel protein AmtB from *Escherichia coli* is a polytopic membrane protein with a cleavable signal peptide. *FEMS Microbiol Lett.* **258**(1): 114-120.

- Thummler F., Vermad P.S.** 1987. Nodulin 100 of soybean is a nodule-specific form of sucrose synthase. *J. Biol. Chem.* **262**: 14730-14736.
- Tøndervik A., Torgersen H. R., Botnmark H. K. y Strøm A. R.** 2006. Transposon mutations in the 5' end of *glnD*, the gene for a nitrogen regulatory sensor, that suppress the osmosensitive phenotype caused by *otsBA* lesions in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **188**: 4218-4226.
- Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L.** 2007. En: *Introducción a la Microbiología*. Rondinone S. *et al.*, (traductor). 9ª edición. Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires. Argentina. Págs: 809-818.
- Tremblay P., Drepper T., Masepohl B., Hallenbeck P.C.** 2007. Membrane sequestration of PII proteins and nitrogenase regulation in the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* **189**: 5850–5859.
- Tung W.L., Chow K.C.** 1995. A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*. *Trends Genet.* **11**: 128-129.
- Udvardi M.K., Lister D.L., Day D.A.** 1992. Isolation and characterization of a *nrnC* mutant of *Bradyrhizobium (Parasponia) sp.* ANU289. *Journal of General Microbiology.* **138**(5): 1019–1025.
- Udvardi M.K. y Kahn M.L.** 1993. Evolution of the (*Brady*) *Rhizobium* legume symbiosis: why do bacteroids fix nitrogen? *Symbiosis* **14**: 87–101.
- Ureta A., Nordlund S.** 2002. Evidence for conformational protection of nitrogenase against oxygen in *Gluconacetobacter diazotrophicus* by a putative FeSII protein. *J. Bacteriol.* **184**(20): 5805-5809.
- Vairinhos F., Murray D.R.** 1983. The seed proteins of chick pea: Comparative studies of *Cicer arietinum*, *C. reticulatum* and *C. echinospermum (Leguminosae)*. *Pl. Syst. Evol.* **142**: 11.
- Valentine R.C., Shapiro B. M., Stadtman E.R.** 1968. *Biochemistry.* **7**(6): 2143–2152.
- van Heeswijk W.C., Rabenberg M., Westerhoff H.V., Kahn D.** 1993. The genes of the glutamine synthetase adenylation cascade are not regulated by nitrogen in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **9**: 443–457.
- van Heeswijk W.C., Hoving S., Molenaar D., Stegeman B., Kahn D., Westerhoff H.V.** 1996. An alternative PII protein in the regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **21**(1): 133-46.
- van Heeswijk W.C., Wen D., Clancy P., Jaggi R., Ollis D.L., Westerhoff H.V., Vasudevan S.G.** 2000. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **97**: 3942– 3947.
- van Heeswijk W.C., Westerhoff H.V., and Boogerd F.C.** 2013. Nitrogen assimilation in *Escherichia coli*: putting molecular data into a systems perspective. *Microbiol. Mol. Biol.* **77**: 628–695.
- Vance C.P.** 2001. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. *Plant nutrition in a world of declining renewable resources.* *Plant Physiol.* **127**(2): 390-397.
- Vermad P.S.** 1989. Plant genes involved in carbon and nitrogen assimilation in root nodules. En *Plant nitrogen metabolism*. Editores: Poulton J.E., Romeo J.T., Conn E.E. Plenum Publishing Corporation, New York, EEUU.
- Vincent J.** 1970. A manual for the practical study of the root nodule bacteria. *IBP Handbook N°15*.
- Vogel G., van Der D.** 1970. Differential analyses of glyoxilate derivatives. *Analytical Biochemistry.* **33**: 143-157.
- von Wiren N., Merrick M.** 2004. Regulation and function of ammonium carriers in bacteria, fungi, and plants. En: *Topics in Current Genetics: Molecular Mechanisms Controlling Transmembrane Transport*. Editores: E. Boles and R. Krämer. Berlin, Alemania. Págs.: 95–120.
- Wagner S.C.** 2011. Biological Nitrogen Fixation. *Nature Education Knowledge* **3**(10):15.
- Walsh S., Metzger D.A. y Higuchi R.** 1991. Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques.* **10**: 506–513.
- Wang J., Yan D., Dixon R., Wang Y.P.** 2016. Deciphering the principles of bacterial nitrogen dietary preferences: a strategy for nutrient containment. *mBio.* **7**(4): 792-16.
- Weir B.S.** 2016. The current taxonomy of rhizobia. NZ Rhizobia website. <https://rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>.

- Werner D., Mörschel E., Kort R., Mellor R., Bassarab S.** 1984. Lysis of bacteroids in the vicinity of the host cell nucleus in an ineffective (fix^-) root nodule of soybean (*Glycine max*). *Planta*. **162**: 8-16.
- Wolfe D.M., Zhang Y., Roberts G.P.** 2007. Specificity and regulation of interaction between the PII and AmtB1 proteins in *Rhodospirillum Rubrum*. *J. Bacteriol.* **189**: 6861–6869.
- Xu Y., Cheah E., Carr P.D., van Heeswijk W.C., Westerhoff H.V., Vasudevan S.G., Ollis D.L.** 1998. GlnK, a PII-homologue: structure reveals ATP binding site and indicates how the T-loops may be involved in molecular recognition. *J Mol Biol.* **282**: 149–165.
- Xu Y., Carr P.D., Clancy P., Garcia-Dominguez M., Forchhammer K., Florencio F., Vasudevan S.G., Tandeau de Marsac N., Ollis D.L.** 2003. The structures of the PII proteins from the cyanobacteria *Synechococcus sp.* PCC 7942 and *Synechocystis sp.* PCC 6803. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **59**: 2183–2190.
- Yildiz O., Kalthoff C., Raunser S., Kühlbrandt W.** 2007. Structure of GlnK1 with bound effectors indicates regulatory mechanism for ammonia uptake. *EMBO J.* **26**: 589–599.
- Yurgel S.N., Kahn M.L.** 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**(48): 18958-18963.
- Yurgel S.N., Rice J., Mulder M., Kahn M.L.** 2010. GlnB/GlnK PII proteins and regulation of the *Sinorhizobium meliloti* Rm1021 nitrogen stress response and symbiotic function. *J. Bacteriol.* **192**(10): 2473-2481.
- Yurgel S.N., Rice J., Kahn M.L.** 2011. Nitrogen metabolism in *Sinorhizobium meliloti*–Alfalfa symbiosis: dissecting the role of GlnD and PII proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* **25**(3): 355–362
- Yurgel S.N., Rice J., Kahn M.L.** 2012. Nitrogen metabolism in *Sinorhizobium meliloti*–alfalfa symbiosis: dissecting the role of GlnD and PII proteins. *Mol. Plant Microbe Interact.* **25**(3): 355-362.
- Yurgel S.N., Rice J., Kahn M.L.** 2013. Transcriptome analysis of the role of GlnD/GlnBK in nitrogen stress adaptation by *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. *PLoS one*, **8**(3): e58028.
- Zalkin H., Smith J.L.** 1998. Enzymes utilizing glutamine as an amide donor. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **72**: 87–144.
- Zevenhuizen L.P.** 1981. Cellular glycogen, 3-1, 2-glucan, poly-P-hydroxybutyric acid and extracellular polysaccharides in fast-growing species of *Rhizobium*. *Antonie van Leeuwenhoek.* **47**: 481-497.
- Zhang Y., Pohlmann E.L., Ludden P.W., Roberts G.P.** 2000. Mutagenesis and functional characterization of the *glnB*, *glnA*, and *nifA* genes from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.* **182**: 983–92.
- Zhang Y., Pohlmann E.L., Ludden P.W., Roberts G. P.** 2001. Functional characterization of three GlnB homologs in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*: roles in sensing ammonium and energy status. *J. Bacteriol.* **183**: 6159–6168.
- Zhang Y., Pohlmann E.L., Ludden P.W., Roberts G.P.** 2003. Regulation of nitrogen fixation by multiple PII homologs in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Symbiosis.* **35**: 85–100.
- Zhang Y., Pohlmann E.L. y Roberts G.P.** 2005. GlnD is essential for NifA activation, NtrB/NtrC-regulated gene expression, and posttranslational regulation of nitrogenase activity in the photosynthetic, nitrogen-fixing bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.* **187**: 1254-1265.
- Zhang Y., Pohlmann E. L., Serate J., Conrad M. C.y Roberts G. P.** 2010. Mutagenesis and functional characterization of the four domains of GlnD, a bifunctional nitrogen sensor protein. *J. Bacteriol.* **192**(11): 2711–2721.
- Zheng L., Kostrewa D., Berneche S., Winkler F.K., Li X.D.** 2004. The mechanism of ammonia transport based on the crystal structure of AmtB of *Escherichia coli*. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA.* **101**(49): 17090-17095.
- Zhu Y, Conrad MC, Zhang Y, Roberts GP.** 2006. Identification of *Rhodospirillum rubrum* GlnB variants that are altered in their ability to interact with different targets in response to nitrogen status signals. *J. Bacteriol.* **188**:1866–1874.

Páginas web utilizadas:

www.bolsadecereales.com/

www.edzna.ccg.unam.mx/rhizobial-taxonomy

www.evolution-textbook.org/content/free/figures/06_EVOW_Art/26_EVOW_CH06.jpg

www.inta.gob.ar/

www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2

www.pfam.xfam.org/search/sequence

www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo

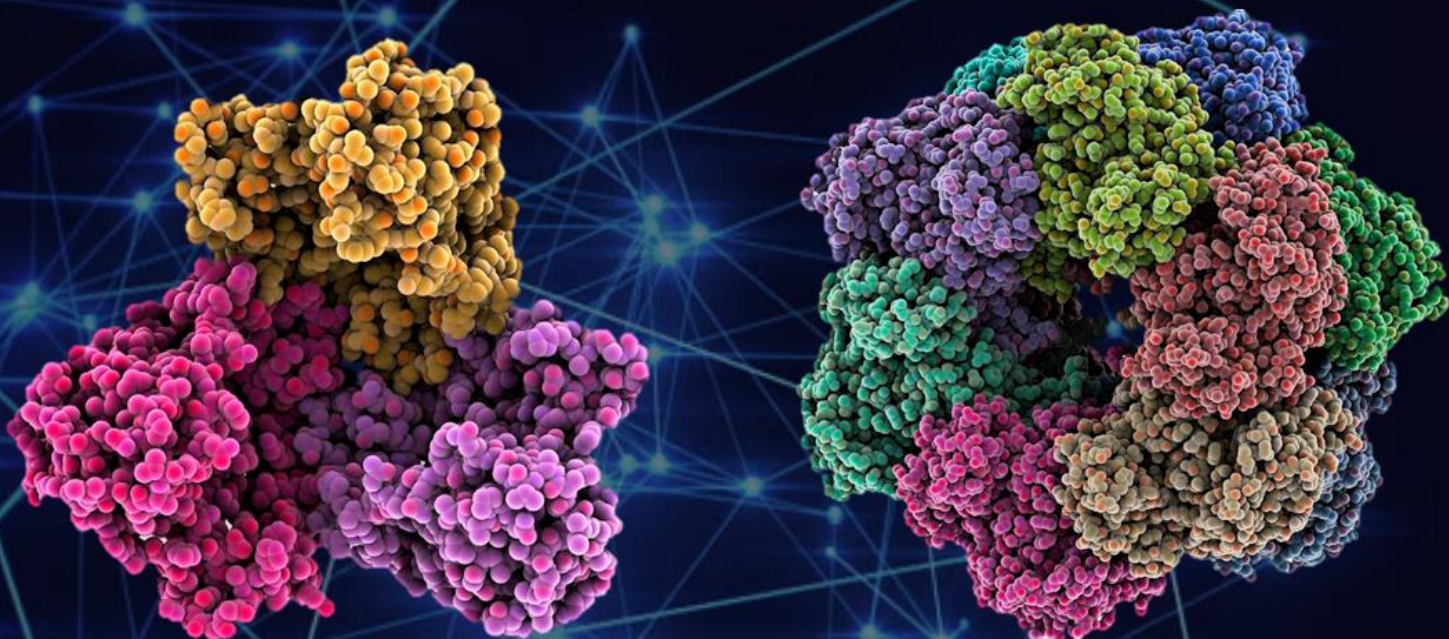
www.prosite.expasy.org/scanprosite

www.reverse-complement.com

www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/

www.microbesonline.org

www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed



Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

