

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS.....	3
ÍNDICE DE TABLAS	4
RESUMEN.....	5
INTRODUCCIÓN	6
Los rizobios.....	6
Fijación biológica de nitrógeno.....	7
La simbiosis rizobio-leguminosa	8
El hierro.....	9
Captación de hierro en procariotas	10
Internalización mediada por sideróforos	10
Hemo y hemoproteínas como fuentes de hierro.....	11
Regulación de la homeostasis de hierro	12
Almacenamiento de hierro en procariotas.....	14
Ferritinas.....	16
Dps	18
Bacterioferritinas	19
Los rizobios y el hierro.....	23
ANTECEDENTES	24
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS.....	25
Objetivo General	25
Objetivos específicos de este trabajo	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
Análisis <i>in silico</i>	26
Cultivos bacterianos.....	26
Extracción de ADN genómico de <i>S. meliloti</i> 1021.....	27
Extracción de ADN plasmídico	28
Preparación de células competentes	29
Transformación	29
Digestión con enzimas de restricción.....	30
Reacciones de ligación.....	30
Reacciones de amplificación por PCR	30
Visualización y cuantificación de ADN.....	31

Extracción de ADN a partir de geles de agarosa	32
Mediante el uso del kit ApplyChem DNA isolation.....	32
Mediante el método de extracción con fenol.....	32
Construcción de la mutante.....	32
Obtención del plásmido recombinante pBSK- <i>bfr</i> ₁₂	32
Obtención del plásmido recombinante pBSK- <i>bfr</i> ₃₄	33
Obtención del plásmido recombinante pBSK- <i>bfr</i> Δ.....	34
Obtención de la construcción pBSK- <i>bfr</i> :: <i>lacZGm</i> ^R	34
Obtención del vector pK18 <i>bfr</i> :: <i>lacZGm</i> ^R	35
Movilización del vector pK18- <i>bfr</i> :: <i>lacZGm</i> ^R a <i>S. meliloti</i> 1021 mediante conjugación triparental.....	35
Selección del doble evento de recombinación homóloga.....	36
Verificación de la mutación mediante Southern blot	36
RESULTADOS	38
Análisis <i>in silico</i>	38
Construcción de la mutación <i>bfr</i> :: <i>lacZGm</i> ^R	42
Obtención del plásmido recombinante pBSK- <i>bfr</i> ₁₂	42
Obtención del plásmido recombinante pBSK- <i>bfr</i> ₃₄	45
Obtención del plásmido recombinante pBSK- <i>bfr</i> Δ.....	47
Obtención de la construcción pBSK- <i>bfr</i> :: <i>lacZGm</i> ^R	49
Verificación de la mutación obtenida mediante Southern blot.....	53
DISCUSIÓN	57
PERSPECTIVAS	66
ANEXO.....	68
Composición de medios utilizados:	68
LB	68
TY	68
Soluciones utilizadas:	68
Solución I para minipreparación de ADN plasmídico.....	68
Solución II para minipreparación de ADN plasmídico	68
Solución III para minipreparación de ADN plasmídico	68
Solución de depurinificación para transferencia:	69
Solución neutralizante para transferencia:	69
Solución desnaturalizante para transferencia	69
Buffer T ₁₀ E ₂₅ :	69
Buffer de transferencia (SSC 10x):	69

Buffer de electroforesis (TAE 1x).....	69
Abreviaturas utilizadas	69
BIBLIOGRAFÍA	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1: Estructura cristalográfica de ferritinas bacterianas	15
Fig. 2: Diagrama de cintas de las subunidades de diferentes ferritinas.....	15
Fig. 3: Centro ferroxidasa de la ferritina de <i>E. coli</i> (FtnA)	17
Fig. 4: Mecanismo de mineralización de la ferritina de <i>E. coli</i> (FtnA).	17
Fig. 5: Centro ferroxidasa de Dps.....	19
Fig. 6: Grupo hemo de la Bfr de <i>E. coli</i>	20
Fig. 7: Centro ferroxidasa de la Bfr de <i>E. coli</i>	21
Fig. 8: Mecanismo de mineralización del hierro en la Bfr de <i>E. coli</i>	22
Fig. 9: Entorno genético del gen <i>bfr</i> de <i>S. meliloti</i> 1021	39
Fig. 10: Resultado de la búsqueda de dominios conservados de la secuencia Smc03786	40
Fig. 11: Resultado de la búsqueda de dominios conservados de la secuencia SMC03787	40
Fig. 12: Alineamiento entre las secuencias traducidas de los genes <i>bfr</i> de diferentes bacterias	41
Fig. 13: Estructura predicha a partir de la secuencia aminoacídica de Bfr de <i>S. meliloti</i> 1021.....	43
Fig. 14: Mapa de restricción teórico del producto de amplificación <i>bfr</i> ₁₂	42
Fig. 15: Gel de agarosa 0,8 % (v/v) en TAE, de los productos de amplificación por PCR con los cebadores <i>bfr</i> ₁ y <i>bfr</i> ₂	43
Fig. 16: Gel de electroforesis de agarosa 0,8% (p/v) en TAE de la construcción pBSK <i>bfr</i> ₁₂	44
Fig. 17: Posibles conformaciones de la construcción pBSK- <i>bfr</i> ₁₂	45
Fig. 18: Gel de agarosa 0,8 % (p/v) en TAE del resultado de las digestiones de pBSK- <i>bfr</i> ₁₂ con BamHI y EcoRI	45
Fig. 19: Mapa de restricción teórico del producto de amplificación <i>bfr</i> ₃₄	46
Fig. 20: Gel de agarosa 0,8 % (p/v) en TAE de los productos de amplificación con los cebadores <i>bfr</i> ₃ y <i>bfr</i> ₄	46
Fig. 21: Posibles conformaciones de la construcción pBSK- <i>bfr</i> ₃₄	47

Fig. 22: Gel de agarosa 0,8 % (p/v) en TAE del resultado de la digestión de pBSK-bfr ₃₄ con la enzima de restricción Sall.	47
Fig. 23: Esquema de la construcción pBSK <i>bfr</i> ₃₄ y esquema del amplicón esperado mediante PCR con los cebadores bfr ₅ y bfr ₆	48
Fig. 24: Gel de electroforesis de agarosa 0,8% (p/v) en TAE de los productos de amplificación obtenidos en la PCR con los cebadores bfr ₅ y bfr ₆	48
Fig. 25: Esquema de la construcción pBSK- <i>bfr</i> Δ.	49
Fig. 26: Gel de electroforesis de agarosa 0,8% (p/v) en TAE de los productos de digestión de pBSK <i>bfr</i> Δ con las enzimas de restricción BamHI y HindIII.....	49
Fig. 27: Esquema del plásmido pAB2001	50
Fig. 28: Esquema de la construcción pBSK- <i>bfr</i> :: <i>lacZGm</i> ^R	50
Fig. 29: Gel de agarosa 0,8% (p/v) en TAE del producto de digestión de pAB2001 con SmaI; construcción pBSK- <i>bfr</i> Δ; productos de digestión de pBSK- <i>bfr</i> Δ con Sall; pK18 sin digerir y digerido con BamHI y HindIII.....	51
Fig. 30: Gel de agarosa 0,8% (p/v) en TAE de pBSK- <i>bfr</i> :: <i>lacZGm</i> ^R sin digerir y digerido con XhoI	51
Fig. 31: Gel de agarosa 0,8% (p/v) en TAE de la construcción pK18- <i>bfr</i> :: <i>lacZGm</i> ^R sin digerir y digerido con EcoRI.	52
Fig. 32: Esquema de la construcción pK18- <i>bfr</i> :: <i>lacZGm</i> ^R	52
Fig. 33: Esquema que representa el sitio de unión de la sonda al ADN genómico de la cepa <i>S. meliloti</i> 1021 salvaje.	54
Fig. 34: Esquema que representa las posibles configuraciones del simple evento de recombinación homóloga.	55
Fig. 35: Esquema que representa el resultado de un doble evento de recombinación homóloga entre el genoma de <i>S. meliloti</i> 1021 y el alelo <i>bfr</i> :: <i>lacZGm</i> ^R	55
Fig. 36: Resultado de la verificación de la mutante obtenida mediante análisis por Southern blot	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Cepas bacterianas y plásmidos utilizados	27
Tabla 2. Secuencias de los cebadores utilizados	31
Tabla 3. Programas utilizados en las reacciones de PCR.	31
Tabla 4. Resultado de la búsqueda de marcos abiertos de lectura que codifiquen posibles proteínas de almacenamiento de hierro	38

RESUMEN

El hierro constituye un nutriente esencial para prácticamente todos los seres vivos, formando parte de proteínas involucradas en una gran variedad de procesos celulares. Sin embargo, al reaccionar con O₂ o sus especies reducidas, el ion ferroso genera el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), especie altamente reactiva y dañina para la célula. La presencia de proteínas de almacenamiento de hierro les permite a las células contar con reservas intracelulares del metal, en una forma biodisponible y no tóxica, que pueden ser utilizadas en condiciones de deficiencia de hierro.

En el caso particular de los rizobios (bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno), durante su etapa de vida endosimbiótica la demanda de hierro aumenta enormemente, debido a la presencia del metal en las enzimas involucradas en el proceso de fijación de nitrógeno. Hasta el presente se desconoce cómo la bacteria satisface esta demanda en su etapa simbiótica. En este trabajo se parte de la hipótesis que las proteínas de almacenamiento de hierro son importantes para el establecimiento de una simbiosis efectiva de *S. meliloti* 1021 con su planta hospedera Alfalfa.

Se realizaron estudios *in silico* del genoma de *S. meliloti* 1021, buscando secuencias que codifiquen posibles proteínas de tipo ferritina, encontrándose la presencia del ORF SMc03786, que codifica una probable bacterioferritina. Se realizó una búsqueda de dominios conservados en la secuencia traducida del gen, observándose la presencia de motivos característicos de las bacterioferritinas.

Para evaluar el rol del gen *bfr* de *S. meliloti* se propuso en este trabajo la construcción de una mutante carente de Bfr, mediante dos estrategias. Una de ellas consistió en generar una delección en la que no se afecta el marco de lectura y la segunda en insertar en el gen el cassette reportero *lacZGm^R*

Se obtuvo una mutante por inserción del cassette reportero la cual fue analizada por Southern blot, encontrándose que corresponde a un simple evento de recombinación, en la que el gen *bfr* interrumpido por el cassette se encuentra corriente abajo con respecto al gen salvaje. Se discute en el trabajo, los resultados obtenidos en el marco de las diferentes aproximaciones metodológicas empleadas.



Los rizobios

El término rizobio hace referencia a un diverso grupo de bacterias Gram negativas que viven en el suelo en forma libre y forman simbiosis con plantas de la familia *Fabaceae*, estimulando la formación en las raíces de la planta de órganos especializados llamados nódulos, donde se da el proceso de fijación biológica del nitrógeno.

Las primeras referencias datan del siglo XVI donde figuran dibujos realizados por Leonard Fuchsius de leguminosas noduladas y posteriormente en el siglo XVII Malpighi describe la presencia de nódulos en las raíces de *Phaseolus vulgaris* y de *Vicia faba* (Rev. por: Perret, Staehelin *et al.*, 2000). Mientras que su participación en el metabolismo del nitrógeno data de 1879, cuando Frank examinaba nódulos de leguminosas, pensando, como sus contemporáneos, que se trataba de hongos. En 1888 Beijerinck aisló bacterias de nódulos a las que nombró *Bacillus radicicola*. En el año siguiente Frank publicó el nombre *Rhizobium* (de *rhiza* = raíz, *bios* = vida), acuñando el término de rizobios, usado hasta la fecha. A principios del siglo pasado se reconocían seis especies de rizobios: *Rhizobium leguminosarum*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. meliloti*, *R. japonicum* y *R. lupini*. Esta nomenclatura se estableció en función de las leguminosas que cada especie de rizobio nodula. Sin embargo, se observó que el grado de especificidad de la simbiosis rizobio-leguminosa es variable. Algunos rizobios tienen una especificidad de hospedador muy acotada, por ejemplo *R. leguminosarum*, mientras otros, como *Rhizobium* sp. NGR234 tiene un amplio rango de hospedadores (Rev. por: van Rhijn y Vanderleyden, 1995). Una nueva clasificación de los rizobios se basó en la observación de que algunas especies crecían muy lentamente en medios de laboratorio y mostraban características bioquímicas diferentes a las especies de crecimiento rápido. Esto llevó a la movilización de las especies de rizobios de crecimiento lento a un nuevo género, el cual fue denominado por Jordan en 1982 como *Bradyrhizobium* (Rev. por: Young y Haukka, 1996). La

aplicación de técnicas moleculares como la secuenciación del gen de la subunidad ribosómica 16S en el estudio de la taxonomía de los rizobios llevó a la redistribución de las especies en tres géneros: *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* y *Azorhizobium*, todos ellos perteneciente al grupo α de las proteobacterias.

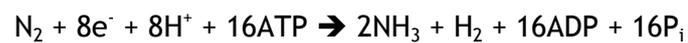
Actualmente la taxonomía de los rizobios tiene un enfoque polifásico, que incluye caracterizaciones de morfología, bioquímica, fisiología, genética y filogenia, entre otras. Así se observa que los rizobios no constituyen un grupo monofilético, sino que se distribuyen en nueve grupos monofiléticos separados y no relacionados (Sawada, Kuykendall *et al.*, 2003); se distinguen 92 especies distribuidas en 12 géneros, dos de ellos en el grupo de las β -proteobacterias y los diez restantes como parte de las α -proteobacterias (Weir, 2011). Todos los α -rizobios pertenecen al orden Rhizobiales, mientras que los β -rizobios pertenecen al orden Burkholderiales (Masson-Boivin, Giraud *et al.*, 2009).

Fijación biológica de nitrógeno

El proceso conocido como fijación biológica del nitrógeno (FBN), en el que el nitrógeno atmosférico es reducido a amonio mediante la reacción catalizada por la enzima nitrogenasa, es exclusivo de procariotas. Los organismos fijadores de nitrógeno, conocidos como diazótrofos, se encuentran ampliamente distribuidos en los dominios Bacteria y Archaea. Se encuentran organismos capaces de fijar nitrógeno en la mayoría de los grupos filogenéticos, incluyendo bacterias verdes del azufre, Firmibacterias, actinomicetes, cianobacterias y en todas las divisiones de Proteobacteria.

El complejo enzimático responsable de la FBN consta de dos componentes: el componente I, o dinitrogenasa (proteína Mo-Fe) y el componente II o dinitrogenasa reductasa. La dinitrogenasa reductasa es un homodímero que presenta un agrupamiento metálico [4Fe-4S] en la interfase entre las subunidades, y es codificada por el gen *nifH*. Este componente media el acoplamiento de la hidrólisis de ATP con la transferencia de electrones hacia el componente I. La nitrogenasa contiene el sitio activo para la reducción del dinitrógeno y está organizada como un tetrámero $\alpha_2\beta_2$, siendo estas subunidades codificadas por los genes *nifD* y *nifK* respectivamente. Se asocian a esta proteína 2 átomos de Mo, 30 de Fe y 32 de S organizados en dos sitios denominados Fe-Mo y el cluster P. En el centro Fe-Mo ocurre la reducción del sustrato, mientras que el sitio P probablemente sea el aceptor inicial de electrones desde el componente I (Rev. por: Hu y Ribbe, 2011).

El mecanismo de la nitrogenasa requiere la reducción del componente I por donadores de electrones como ferredoxina o flavodoxina, transferencias de un electrón desde el componente II al componente I, acopladas a la hidrólisis de ATP, y la transferencia de electrones desde el sitio P al cofactor Fe-Mo y finalmente al dinitrógeno (Rev. por: Dixon y Kahn, 2004). La estequiometría mínima de la reacción de reducción de dinitrógeno a amonio es la siguiente:



La nitrogenasa es una enzima altamente sensible al oxígeno, lo cual impone grandes limitaciones en la fisiología de la FBN. La expresión de los componentes de la nitrogenasa es controlada negativamente con altas concentraciones de O₂ y en condiciones suficientes de nitrógeno asimilado. En cuanto a la sensibilidad al oxígeno, los diazótrofos han desarrollado distintas estrategias para proteger la enzima, las que incluyen evitar el oxígeno, generar un metabolismo anaerobio, consumir el exceso de oxígeno mediante respiración, formación de barreras de difusión de oxígeno y compartimentalización espacial y temporal de la FBN (Rev. por: Dixon y Kahn, 2004).

La simbiosis rizobio-leguminosa

La estrategia empleada por los rizobios para proteger del oxígeno a la enzima responsable de la FBN es mediante la simbiosis con plantas leguminosas, donde los nódulos, que constituyen un ambiente de baja concentración de oxígeno (Rev. por: Dixon y Kahn, 2004). Esta simbiosis es responsable de casi la mitad del nitrógeno fijado biológicamente (Gruber y Galloway, 2008).

El proceso de infección comprende múltiples etapas y está iniciado por eventos pre-infectivos que ocurren en la rizósfera, en los que los rizobios son atraídos hacia las raíces de las leguminosas, en respuesta a sustancias quimioatrayentes presentes en exudados radiculares. Los rizobios entonces se unen a pelos radiculares y se acumulan formando un capuchón, e inician el proceso de infección. La liberación de factores Nod por el rizobio inducen la deformación, ramificación y enrollado del pelo radicular. Los factores Nod son lipooligosacáridos cuya síntesis es mediada por los genes *nod*, los cuales son inducidos por los flavonoides excretados en los exudados radiculares. La especificidad en la simbiosis entre rizobio y leguminosa se da a este nivel, siendo los factores Nod producidos por el rizobio, específicos para un número

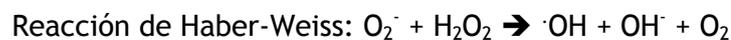
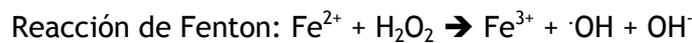
limitado de leguminosas. Al enrullarse el pelo radicular las bacterias quedan atrapadas en un bolsillo formado por la pared celular de la planta hospedera. En ese sitio las bacterias inducen lesiones locales mediante hidrólisis de la pared celular y penetran a la célula vegetal mediante invaginación de la membrana. La planta hospedera responde depositando material de pared celular sobre la lesión, formándose un tubo que crece hacia adentro por el que ingresan las bacterias en proliferación. De esta manera se forma el hilo de infección. Éste penetra hacia las células corticales, donde las bacterias se liberan mediante un mecanismo similar a la endocitosis. En el proceso de liberación en las células corticales los rizobios no quedan en contacto directo con el citoplasma de las células infectadas sino envueltos en una membrana de origen vegetal, denominada membrana peribacteroidea, distinta en su composición a la membrana plasmática. La membrana peribacteroidea limita entonces las vesículas formadas (denominadas simbiosomas), donde quedan envueltas las bacterias que se diferencian luego morfológicamente a bacteroides. Los bacteroides crecen en tamaño y pierden la capacidad de dividirse y es en ese estadio donde se produce la reducción de dinitrógeno a amonio, el cual es posteriormente exportado a la planta (Rev. por: van Rhijn y Vanderleyden, 1995; Long, 1996; Long, 2001; Monza y Palacios, 2004).

El hierro

El hierro es el segundo metal más abundante de la corteza terrestre. Se trata de un metal de transición cuyos estados de oxidación varían de 2- a 4+ siendo los estados 2+ y 3+ los principales. El amplio rango de estados de oxidación que presenta el hierro en función del ligando que coordina y su capacidad de transferir a otros compuestos un solo electrón, hacen que este metal esté presente en una gran variedad de reacciones celulares convirtiéndolo en un metal indispensable para la mayoría de los seres vivos. De hecho, la necesidad del hierro en los sistemas biológicos es casi universal, siendo las bacterias del ácido láctico la única excepción de organismos vivos que pueden prescindir de este metal, al utilizar el manganeso y el cobalto en su lugar (Archibald, 1983; Posey y Gherardini, 2000). Las reacciones bioquímicas en las que participa el hierro son muy diversas, incluyendo vías de respiración, activación y unión de oxígeno, degradación de peróxidos y superóxidos, síntesis de aminoácidos, pirimidinas, ácidos orgánicos, ADN, fijación de nitrógeno y carbono, fotosíntesis, metanogénesis, producción y consumo de H₂, ciclo los ácidos tricarbónicos, degradación de compuestos aromáticos y regulación de la

expresión génica (Rev. por: Andrews, Robinson *et al.*, 2003; Rudolph, Hennecke *et al.*, 2006). Su función biológica depende mayoritariamente de su incorporación a proteínas formando parte de especies mono o bi nucleares, como cluster Fe-S o como parte del grupo hemo (Rev. por: Andrews, Robinson *et al.*, 2003).

El ión ferroso (Fe^{2+}) puede reaccionar con oxígeno y sus especies reducidas producidas durante el metabolismo y generar el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), una especie reactiva del oxígeno, altamente reactiva y dañina para la célula. Éste se produce vía las reacciones de Fenton y Haber-Weiss (Haber y Weiss, 1934):



Las especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) generadas son fuertemente deletéreas para los organismos ya que producen, entre otros, la peroxidación de lípidos, alteración de proteínas y ácidos nucleicos (Rev. por: Flitter, Rowley *et al.*, 1983; Harrison y Arosio, 1996; Andrews, 1998)

El ión ferroso es muy soluble en agua pero por el contrario el ión férrico a pHs 7 o mayores forma óxidos y oxihidróxidos muy poco solubles. Es por esto que este nutriente se ha vuelto escaso luego del advenimiento de una atmósfera oxidante a partir del surgimiento de los autótrofos oxigénicos, que enriquecieron la atmósfera en oxígeno (Rev. por: Crichton y Boelaert, 2001; Andrews, Robinson *et al.*, 2003).

Por estas razones los organismos han generado sistemas finamente regulados capaces de balancear la captación del hierro del ambiente y su potencialmente tóxica acumulación en el citosol. Esta regulación se da principalmente en los sistemas de adquisición del hierro, que sufren una regulación a nivel transcripcional y post-transcripcional en respuesta a la disponibilidad del metal.

Captación de hierro en procariontas

Internalización mediada por sideróforos

Una de las estrategias que utilizan algunos organismos para adquirir la cantidad necesaria del metal de forma de satisfacer sus requerimientos

celulares, consiste en la biosíntesis y captación de agentes quelantes denominados sideróforos, Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular que se caracterizan por tener una gran afinidad por el ión férrico. Son sintetizados por bacterias, hongos y plantas monocotiledóneas en condiciones limitantes de hierro (Rev. por: Andrews, Robinson *et al.*, 2003). Los sideróforos se clasifican según el grupo quelante de hierro en: hidroxamatos, catecolatos, carboxilatos, mixtos y otros (Rev. por: Crichton y Boelaert, 2001). Otra forma de clasificación basada en su vía de síntesis, los diferencia en dependientes o no de péptido sintetadas no ribosomales (NRPS) (Lynch, O'Brien *et al.*, 2001; Donadio, Monciardini *et al.*, 2007).

Para lograr una mayor competitividad en el nicho que ocupan, los microorganismos pueden incorporar sideróforos producidos por otros organismos, los cuales son referidos como xenosideróforos o sideróforos exógenos. La biosíntesis de los sideróforos requiere la expresión de diferentes genes, generalmente dispuestos en un operón y en una posición cercana a los genes que codifican sus respectivos receptores (Rev. por: O'Brian y Fabiano, 2010).

Debido a que se trata de moléculas polares de un tamaño que impide su paso a través de porinas, los sideróforos requieren de transportadores para su exportación al medio extracelular y para su internalización en forma de ferri-sideróforo. La internalización de estos complejos en bacterias Gram negativas depende de la presencia en la membrana externa de proteínas receptoras que se unen a estos complejos con gran afinidad. La internalización del complejo ferri-sideróforo al espacio periplasmático es un proceso de transporte activo. La energía necesaria para el transporte proviene de la fuerza protón motriz de la membrana citoplasmática (Rev. por: O'Brian y Fabiano, 2010).

Hemo y hemoproteínas como fuentes de hierro

El hemo y las hemoproteínas pueden ser usados por bacterias patógenas y no patógenas como fuentes de hierro, incluidos los rizobios (Noya, Arias *et al.*, 1997; Battistoni, Platero *et al.*, 2002). Su adquisición es mediada por receptores presentes en la membrana externa y por transportadores, de manera similar al mecanismo de adquisición mediada por sideróforos. Se han identificado genes involucrados en el transporte del hemo en *R. leguminosarum*, *S. meliloti* y *B. japonicum*, en todos los casos ubicados en el cromosoma, y no como parte de plásmidos indicando su importancia para

estas bacterias (Rev. por: O'Brian y Fabiano, 2010). En *S. meliloti* se demostró que la proteína ShmR (*Sinorhizobium heme receptor*) es imprescindible para la internalización del hierro presente en el hemo, la hemoglobina y la leghemoglobina (Amarelle, O'Brian *et al.*, 2008).

En algunas bacterias Gram negativas la adquisición de hemo como fuente de hierro es mediada por receptores de membrana externa que reconocen hemóforos, proteínas estructuralmente muy relacionadas que se caracterizan por unir hemo con gran afinidad (Rev. por: Wandersman y Delepelaire, 2004; Cescau, Cwerman *et al.*, 2007).

Regulación de la homeostasis de hierro

En *E. coli* el principal regulador transcripcional dependiente de hierro es Fur (*Ferric uptake regulator*), una proteína homodimérica que actúa como represor de genes dependientes de hierro bajo condiciones de suficiencia de hierro. Su modo de acción consiste en la formación del complejo Fe-Fur, que interactúa con gran afinidad con una secuencia consenso denominada caja Fur en la región promotora de genes que responden al hierro (Rev. por: Andrews, Robinson *et al.*, 2003). La unión de Fe-Fur a la caja Fur impide la expresión de genes involucrados directamente en la adquisición y metabolismo del hierro, pero además se encuentran regulados por Fur, genes que participan en procesos de respuesta a estrés oxidativo y ácido como también a la liberación de toxinas y factores de virulencia (Rev. por: Rudolph, Hennecke *et al.*, 2006). En condiciones limitantes de hierro apoFur no se une con suficiente afinidad a la caja Fur, de manera que la expresión génica no se reprime.

Al igual que en *E. coli*, Fur es el regulador central de la expresión génica dependiente de hierro en muchas otras bacterias, pero tal no es el caso para algunos rizobios. En estas bacterias los reguladores centrales de la homeostasis del hierro son las proteínas Irr y/o RirA, mientras que Fur jugaría un papel menor. Se ha demostrado el rol de Fur en *R. leguminosarum* y *S. meliloti* en la modulación de genes necesarios para la internalización del manganeso a la vez que su mecanismo de acción responde a manganeso y no a hierro, lo que llevó a que algunos autores denominaran al homólogo de Fur en estos sistemas como Mur (*Manganese uptake regulator*) (Rev. por: O'Brian y Fabiano, 2010).

La proteína reguladora Irr (*Iron responsive regulator*) pertenece a la familia de Fur, pero su distribución se reduce a miembros de la familia de las α -proteobacterias (Rev. por: Rudolph, Hennecke *et al.*, 2006). Irr participa en la regulación de una serie de genes bajo condiciones limitantes de hierro. El control de la expresión de Irr se da a nivel post-transcripcional. Se trata de una proteína estable, que en presencia de hierro se degrada (Rev. por: O'Brian y Fabiano, 2010). Esta degradación se da mediante la unión de hemo férrico a un motivo regulatorio, bajo condiciones de suficiencia de hierro. La regulación de la expresión de *irr* también se da a nivel transcripcional en *B. japonicum* y es mediada por Fur. Inicialmente Irr fue descrita en *B. japonicum* como un regulador dependiente de hierro de la biosíntesis de hemo, pero estudios basados en microarrays indican que se trata de un regulador global de respuesta a hierro en esa bacteria. Irr actúa mediante unión a una secuencia presente en la región promotora de los genes que controla, denominada ICE (*Iron Control Element*). Dependiendo de la ubicación de este motivo con respecto a la región promotora del gen regulado por Irr, la regulación puede ser positiva o negativa, bajo condiciones limitantes de hierro (Rev. por: Rudolph, Hennecke *et al.*, 2006).

La proteína reguladora RirA se describió como el principal regulador dependiente de hierro en *R. leguminosarum* (Rev. por: Johnston, Todd *et al.*, 2007). Esta proteína no presenta similitud de secuencia con la proteína Fur, sino que pertenece a la familia de reguladores transcripcionales Rrf2. Se han encontrado homólogos de RirA de *R. leguminosarum* en especies de los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Agrobacterium*, *Mesorhizobium*, *Brucella* y *Bartonella*, pero no existen homólogos en *B. japonicum*. En *S. meliloti* y *R. leguminosarum* se ha demostrado que actúa como represor y activador de los genes que regula, siendo su expresión regulada negativamente en condiciones limitantes de hierro. En *R. leguminosarum* se demostró que su expresión se autoregula negativamente en condiciones de suficiencia de hierro, y es reprimida por Irr en condiciones limitantes de hierro (Rev. por: Rudolph, Hennecke *et al.*, 2006). Se postula que RirA actuaría mediante unión a una secuencia conservada presente en la región promotora de los genes que controla denominada IRO. Bajo condiciones de baja disponibilidad de hierro RirA no se uniría a las secuencias IRO, por lo tanto no se reprime la expresión génica. Sin embargo, en condiciones de suficiencia de hierro se promovería la unión de RirA a las secuencias IRO, reprimiendo la expresión génica (Rev. por:

Johnston, Todd *et al.*, 2007). La proteína RirA necesitaría de un cluster Fe-S para su actividad, lo que la convierte en una proteína muy lábil para ensayos *in vitro* por lo cual su mecanismo de acción aún no pudo ser comprobado.

Almacenamiento de hierro en procariontas

Debido a la insolubilidad y toxicidad del hierro en presencia de oxígeno es probable que todos los organismos aerobios hayan desarrollado sistemas de almacenamiento de hierro, capaces de secuestrar átomos de hierro en una forma no tóxica, soluble y biodisponible (Rev. por: Briat, 1992). Esto les permite a las células contar con reservas intracelulares de hierro, que pueden ser utilizadas para satisfacer sus necesidades, cuando el suministro externo es escaso.

Las ferritinas son proteínas de almacenamiento de hierro cuya presencia ha sido reportada en todo tipo de organismos, tanto aerobios como anaerobios, desde bacterias hasta mamíferos. A pesar de que sus secuencias aminoacídicas no son muy conservadas, todas las ferritinas poseen una estructura tridimensional y simetría altamente similar (Rev. por: Le Brun, Crow *et al.*, 2010). Las ferritinas conforman una familia que pertenece a una superfamilia de proteínas tipo ferritina. Esta superfamilia incluye 12 familias que cumplen diversas funciones celulares, pero presentan en común un dominio constituido por un ramillete de cuatro hélices (Rev. por: Andrews, 2010).

La primera evidencia de la existencia de ferritinas fue proporcionada por Schmiedeberg en 1894, quien descubrió su presencia en mamíferos, denominándola ferratina. Luego, en 1937, Laufberger logró purificar ferritina a partir de bazo de caballo. En 1963 Hyde describió la presencia de ferritina en plantas y en 1971 David y Easterbrook identificaron su presencia en hongos (Rev. por: Andrews, 1998).

En bacterias, se reconocen tres tipos de proteínas de almacenamiento de hierro: las ferritinas, similares a las presentes en eucariotas, las bacterioferritinas, encontradas únicamente en bacterias y las Dps (*DNA-binding Protein from Starved cells*) presentes sólo en procariontas (Rev. por: Andrews, Robinson *et al.*, 2003).

Si bien están relacionadas distantemente, las proteínas tipo ferritina comparten muchas similitudes estructurales y funcionales. Estructuralmente, las tres proteínas de almacenamiento de hierro encontradas en procariontas

son similares: están compuestas por 24 subunidades en el caso de ferritina y bacterioferritina, o 12 subunidades en el caso de Dps. Las subunidades pueden ser idénticas o similares, y se ensamblan para formar una cáscara proteica esférica que rodea una cavidad central donde se almacena el hierro (Rev. por: Andrews, Robinson *et al.*, 2003). En la Fig. 1 se muestran estructuras cristalográficas de ferritina, bacterioferritina y Dps. En la ferritina y la bacterioferritina cada subunidad se compone de dos pares de hélices α , cada una de ellas denominada de A a D, donde las hélices B y C están conectadas por un largo lazo que atraviesa la longitud del ramillete. En el extremo C terminal hay una quinta hélice más corta, denominada E (Rev. por: Andrews, 1998). En Dps la quinta hélice se denomina BC, debido a su ubicación en el lazo que une las hélices B y C (Rev. por: Chiancone y Ceci, 2010). La Fig. 2 muestra las estructuras de subunidades de proteínas tipo ferritina de distintos organismos.

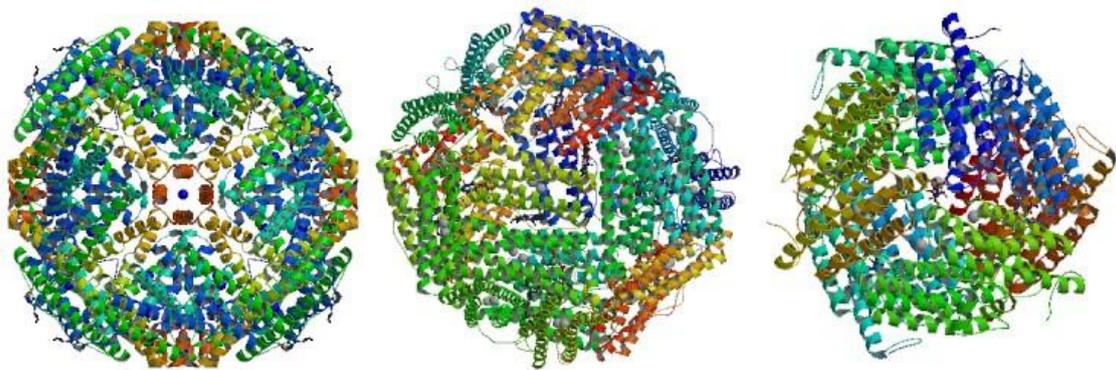


Fig. 1: Estructura cristalográfica de ferritinas bacterianas. A la izquierda se representa la estructura de la ferritina de *P. aeruginosa* (PDB 3RH2). Centro, bacterioferritina de *E. coli* (PDB 2HTN). Derecha, Dps de *E. coli* (PDB 1L8H).

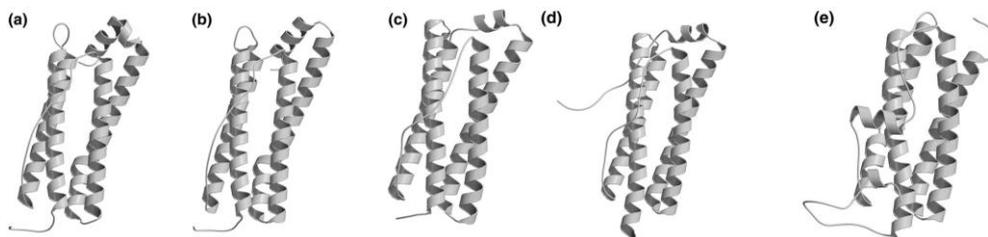


Fig. 2: Diagrama de cintas de las subunidades de diferentes ferritinas. (a) y (b) subunidades H y L de ferritina de mamífero respectivamente; (c) ferritina bacteriana de *E. coli*; (d) bacterioferritina de *D. desulfuricans*; (e) Dps de *D. radiodurans*. La figura fue tomada de "X-ray structures of ferritins and related proteins" (Crichton y Declercq, 2010).

El alineamiento de las secuencias de diferentes ferritinas y bacterioferritinas indica similitudes generalmente menores a 15%, con excepción de los

aminoácidos que constituyen el sitio reactivo de estas proteínas, los cuales se encuentran altamente conservados. Éstos se ubican en el centro del ramillete de hélices y corresponden al centro ferroxidasa, lugar donde ocurre la oxidación de hierro a expensas de oxígeno como agente oxidante.

Los roles fisiológicos que cumplen las proteínas de almacenamiento de hierro son diversas en los diferentes organismos. Algunas de las funciones que cumplen las proteínas tipo ferritinas son: unión de hierro, fuente intracelular de hierro, protección frente al estrés oxidativo y unión a ADN en el caso de Dps (Rev. por: Smith, 2004).

Ferritinas

La primera evidencia de la presencia de ferritina en bacterias fue dada por el descubrimiento en *E. coli* de un marco abierto de lectura que codificaba un polipéptido de 165 aminoácidos. La secuencia de éste demostró ser similar a la subunidad H de la ferritina humana, pero tenía grandes diferencias con la secuencia de la subunidad de la bacterioferritina de *E. coli* (Rev. por: Andrews, 1998; Smith, 2004). Este marco abierto de lectura fue nombrado como *ftnA*. Además se encontró en el genoma de *E. coli* el gen *ftnB*, que codifica una proteína tipo ferritina, pero su función es desconocida, ya que a diferencia de la FtnA, su estructura carece de centros ferroxidasa (Rev. por: Smith, 2004).

En *E. coli* la expresión de *ftnA* es inducida en presencia de hierro por el complejo Fe-Fur, mediante interacción directa del complejo con la región promotora de *ftnA*. El complejo Fe-Fur se une a una zona localizada corriente arriba de la región promotora, en un sitio que contiene cinco cajas Fur dispuestas en tándem. Además se reportó la acción represora de la proteína tipo histona H-NS, al unirse a múltiples sitios localizados dentro o corriente arriba de la región promotora de *ftnA*, impidiendo su expresión. De esta manera, Fur compete con H-NS por la unión a la región reguladora de *ftnA*, desplazándola en presencia de hierro, y permitiendo así su expresión (Nandal, Huggins *et al.*, 2010).

El centro ferroxidasa de la ferritina de *E. coli* posee tres sitios de unión a hierro, denominados A, B y C respectivamente, localizándose el sitio C a una distancia de 6 a 7 Å de los sitios A y B (Rev. por: Crichton y Declercq, 2010). En la ferritina de *E. coli* los ligandos de los sitios A y B son Glu17, His53, Glu50,

Glu94 y Glu130 (Fig. 3). En esta ferritina el mecanismo de mineralización del hierro ocurre de la siguiente manera: los iones ferrosos se unen al centro ferroxidasa y al sitio C y son oxidados en presencia de oxígeno, generando un intermediario di ferroso inestable en el centro ferroxidasa. Los iones férricos así formados en el sitio C y en el centro ferroxidasa son luego transferidos a la cavidad interna, donde se incorporan en el núcleo mineral (Rev. por: Le Brun, Crow *et al.*, 2010). En la Fig. 4 se muestra un esquema que representa el mecanismo de mineralización del hierro en FtnA de *E. coli*.

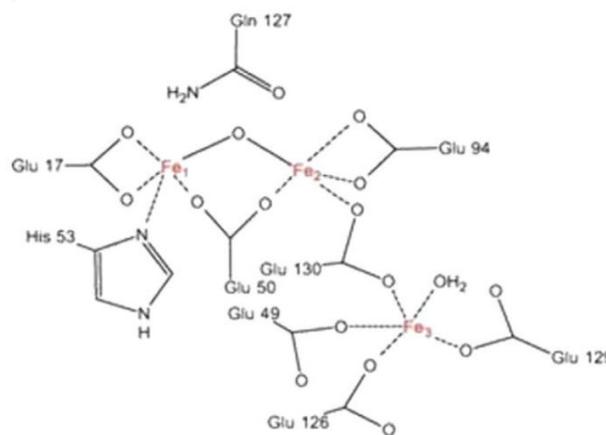


Fig. 3: Representación esquemática del centro ferroxidasa de la ferritina de *E. coli* (FtnA). Se muestran los tres sitios de unión a hierro y sus ligandos (Crichton y Declercq, 2010).

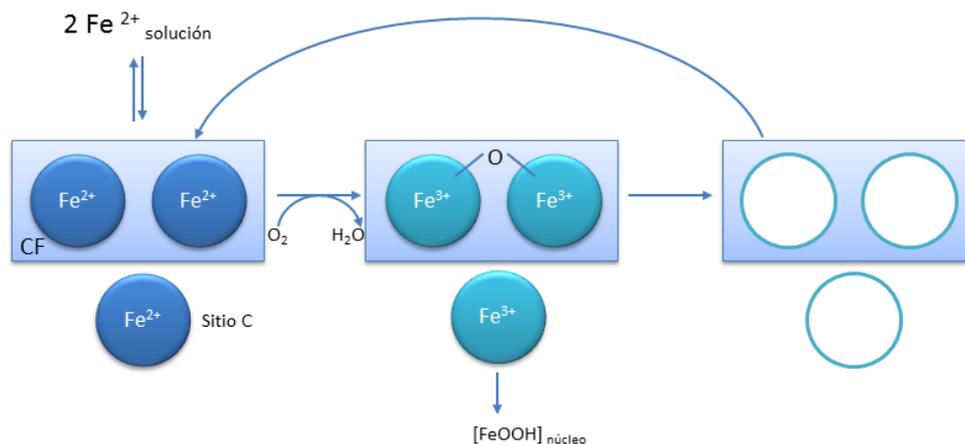


Fig. 4: Representación esquemática del mecanismo de mineralización de la ferritina de *E. coli* (FtnA). Figura adaptada de Le Brun, Crow *et al.*, 2010. Los detalles del proceso son mencionados en el texto.

La función de la ferritina bacteriana se estudió en diversos organismos, como ser *Campylobacter jejuni*, *Porphyromonas gingivalis*, *Helicobacter pylori*. Los datos obtenidos al utilizar mutantes carentes de ferritina indican que el rol fisiológico de estas proteínas varía de especie a especie. En *E. coli* la función

de FtnA es acumular hierro durante la fase de crecimiento exponencial cuando la bacteria se encuentra en presencia de un exceso de hierro en el medio. El hierro así acumulado, que puede llegar a 4500 átomos, puede ser usado en condiciones de deficiencia del metal (Rev. por: Andrews, Robinson et al., 2003).

En *E. coli* no se han encontrado un rol definido en la resistencia al estrés oxidativo (Abdul-Tehrani, Hudson *et al.*, 1999) pero sí se ha descrito un rol protector de la ferritina contra el estrés oxidativo en *C. jejuni*. La función de unión de hierro es bastante conservada entre las especies en las que se ha estudiado, pero no siempre el hierro almacenado en la ferritina parecería ser usado como fuente de hierro (Rev. por: Smith, 2004).

Dps

La primera proteína Dps descrita fue encontrada por Kolter y colaboradores en un cultivo de *E. coli* en fase de crecimiento estacionaria. Kolter observó que esta proteína se unía al ADN sin especificidad de secuencia, por lo que la llamó “DNA-binding protein from starved cells”. Esta unión al ADN impide la acción de ADNasas y protege frente al estrés oxidativo (Almirón, Link *et al.*, 1992; Rev. por: Chiancone y Ceci, 2010). Su expresión se induce en la fase de crecimiento estacionario por el factor de transcripción σ^S . Además se da un control en su expresión a nivel postranscripcional, debido a la inhibición de la degradación por parte de la proteasa ClpXP, en condiciones de escasez de nutrientes o estrés oxidativo (Rev. por: Smith, 2004).

En la proteína Dps los residuos del centro ferroxidasa no están conservados, como sucede con las ferritinas y bacterioferritinas. En este caso el centro ferroxidasa se encuentra en la interface entre dos subunidades. En la Fig. 5 se muestra una representación del centro ferroxidasa de las Dps. En las diferentes Dps el centro ferroxidasa es altamente conservado, con la excepción de las archeas *Pyrococcus furiosus* y *Sulfolobus solfataricus*, cuyos centros ferroxidasa se encuentran en el centro de la subunidad, de forma similar a las ferritinas y bacterioferritinas (Rev. por: Chiancone y Ceci, 2010). En la Dps de *E. coli* el H_2O_2 es unas cien veces más eficiente que el oxígeno en la oxidación de los iones ferrosos del centro ferroxidasa, a diferencia de lo ocurrido en la ferritina y la bacterioferritina, capaces de utilizar oxígeno o H_2O_2 indistintamente. Luego de la oxidación, los iones férricos migran a la

cavidad central, dando lugar a la formación del núcleo cristalino, que puede contener de 400 a 500 átomos de hierro (Rev. por: Chiancone y Ceci, 2010).

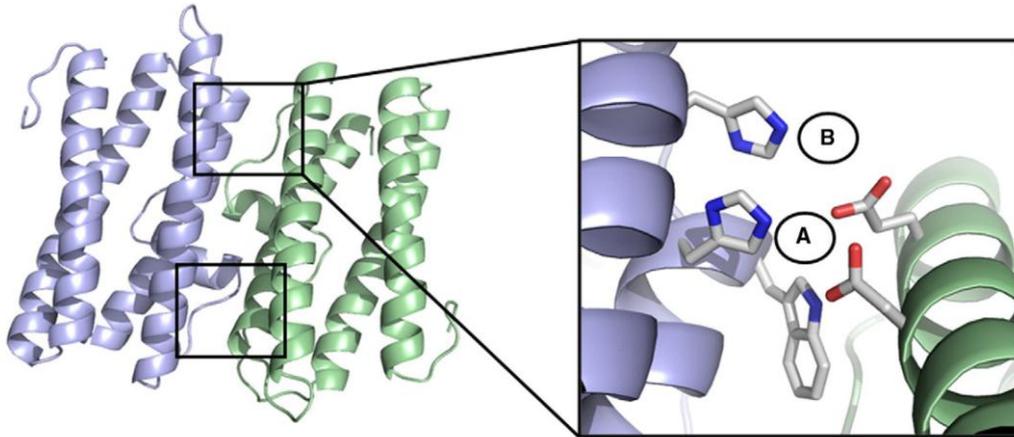


Fig. 5: A la derecha, representación de la interfaz entre dos subunidades de Dps. A la izquierda se muestra un acercamiento a la región de la interfaz donde se localiza el centro ferroxidasa. A y B representan los sitios de unión a hierro. Los ligandos de éstos son dos residuos de His, dos de Glu, y uno de Arg (Chiancone y Ceci, 2010).

En cuanto a las funciones que cumplen las Dps en diferentes organismos, se ha demostrado que la unión a ADN no es universal: por ejemplo, no se ha detectado esta característica en las Dps de *C. jejuni*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus anthracis* y *Agrobacterium tumefaciens* (Rev. por: Smith, 2004). Por otro lado, la capacidad de protección contra H_2O_2 sí ha demostrado ser una característica muy común y representa un mecanismo de evasión de la respuesta inmune por parte de microorganismos patógenos, al contribuir en la supervivencia de éstos en macrófagos y neutrófilos (Rev. por: Chiancone y Ceci, 2010).

Bacterioferritinas

La primera proteína tipo ferritina identificada en bacterias fue la bacterioferritina de la bacteria fijadora de nitrógeno *Azotobacter vinelandii*, purificada por Stiefel y Watt en 1979. Sin embargo en 1973 Bulen y colaboradores ya habían purificado esta proteína, describiéndola como un citocromo b que contenía grandes cantidades de hierro no hemínico (Rev. por: Andrews, 1998). Desde entonces se han aislado bacterioferritinas de una amplia variedad de bacterias.

Todas las bacterioferritinas conocidas contienen 12 grupos hemo, normalmente bajo la forma de protoporfirina IX. Sin embargo, en *D. desulfuricans* se describió la forma de Fe-coproporfirina III. Estos grupos hemo

se encuentran en la interface entre dos subunidades de bacterioferritina simétricamente relacionadas, localizados en un bolsillo sobre la cara interna de la cáscara proteica, de manera que cada grupo hemo se encuentra expuesto a la cavidad central (Rev. por: Andrews, Robinson *et al.*, 2003). Cada grupo hemo es coordinado por dos residuos de Met, provenientes cada uno de una subunidad de bacterioferritina (Rev. por: Andrews, 1998), en una forma de coordinación bis-tioéter axial, muy inusual (Rev. por: Le Brun, Crow *et al.*, 2010). En la Fig. 6 se muestra una representación del grupo hemo en la bacterioferritina de *E. coli*.

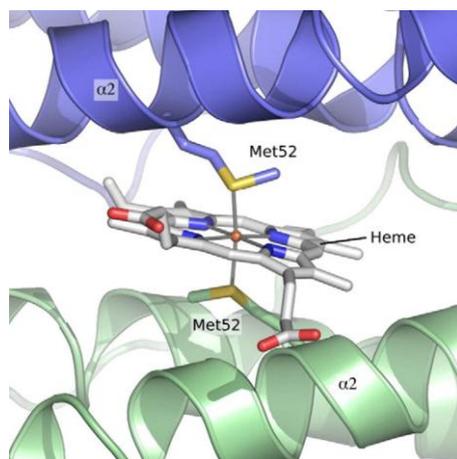


Fig. 6: Representación del grupo hemo de la Bfr de *E. coli*, ubicado en la interface entre dos subunidades simétricamente relacionadas, coordinado por dos residuos de Met pertenecientes uno a cada subunidad (Le Brun, Crow *et al.*, 2010).

Se demostró que los grupos hemo cumplen un importante rol tanto en la cinética como en la termodinámica del proceso de liberación del hierro de la cavidad de la bacterioferritina, siendo la transferencia de electrones hacia la cavidad el paso limitante. El centro ferroxidasa no está involucrado en la liberación del hierro de la bacterioferritina, por lo tanto la mineralización y la liberación del hierro son procesos que utilizan diferentes vías (Rev. por: Yasmin, Andrews *et al.*, 2010).

Las bacterioferritinas contienen centros ferroxidasa intra-subunidad. En la Bfr de *E. coli* el Fe del sitio 1 se encuentra coordinado por Glu18 e His54, y los ligandos del sitio 2 son Glu94 e His130. Además los residuos Glu51 y Glu127 actúan como puente entre los dos sitios (Rev. por: Le Brun, Crow *et al.*, 2010). En la Fig. 7 se muestra una representación del centro ferroxidasa de la Bfr de *E. coli*. Un dominio que se encuentra conservado en las bacterioferritinas es el poro ferroxidasa. Se trata de una abertura

aproximadamente circular en la cavidad proteica, formada por residuos hidrofílicos, que permite la entrada de iones de hierro y agua hacia el centro ferroxidasa desde el exterior de la bacterioferritina (Rev. por: Carrondo, 2003). En la Bfr de *E. coli* el mecanismo de mineralización de hierro ocurre en tres fases. En la primera fase el ión ferroso se une al centro ferroxidasa y es oxidado durante la segunda fase. Esta oxidación ocurre mediante un intermediario peroxo-diférrico, con oxígeno molecular como agente oxidante. En la tercera fase el ión ferroso unido en la superficie interna de la bacterioferritina es oxidado con electrones provenientes del centro ferroxidasa. Este mecanismo continúa en la formación del núcleo mineral, donde los iones ferrosos entrantes son oxidados en la superficie del núcleo y los electrones resultantes son enviados al centro ferroxidasa (Rev. por: Le Brun, Crow *et al.*, 2010). Ver Fig. 8.

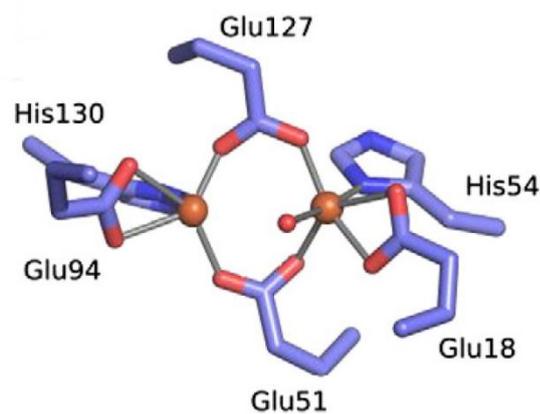


Fig. 7: Representación esquemática del centro ferroxidasa de la Bfr de *E. coli*. Las esferas rojas representan los átomos de hierro. Se muestran los ligandos de estos átomos de hierro. Estos son: para el sitio Fe 1 Glu18 e His 54. Para el sitio Fe 2, Glu 94 e His130. Los residuos Glu127 y Glu 51 actúan como puente entre los dos átomos de hierro (Le Brun, Crow *et al.*, 2010).

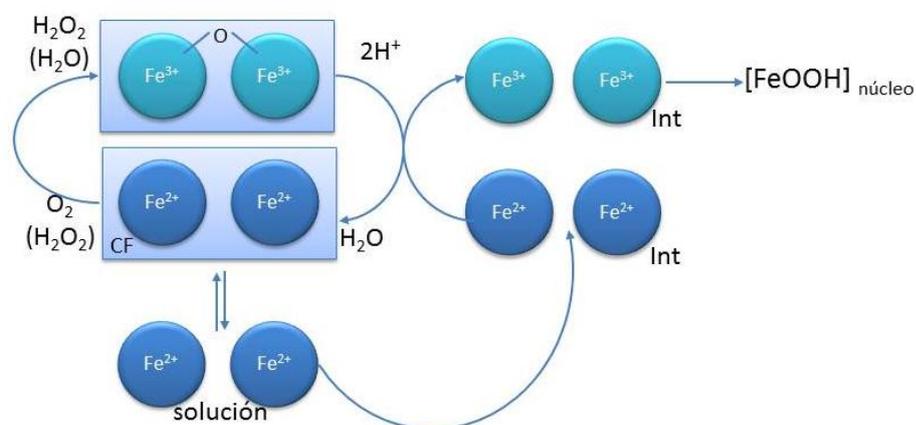


Fig. 8: Representación del mecanismo de mineralización del hierro en la Bfr de *E. coli*. En una primera etapa el ión ferroso unido al centro ferroxidasa es oxidado a férrico, con O₂ o H₂O₂ como agentes oxidantes. Luego, los iones férricos pasan a la cavidad interna de la Bfr, donde reaccionan con los iones ferrosos que se encuentran en la cavidad de la Bfr. Éstos se oxidan en el núcleo mineral autocatalítico. (Le Brun, Crow *et al.*, 2010)

Un rasgo común que presentan los genes que codifican bacterioferritinas es la asociación al gen *bfd*, que codifica una ferredoxina denominada Bfd (“*bacterioferritin associated ferredoxin*”). Esta proteína es similar a la proteína FhuF, la cual estaría involucrada en la reducción intracelular del ferricromo. En *E. coli* la expresión de Bfd es inducida bajo condiciones limitantes de hierro. Existen evidencias de que Bfr y Bfd interactúan específicamente, y dado el bajo potencial redox que posee Bfd, se sugiere que ésta actúa como una reductasa de Bfr inducida cuando el hierro es limitante, mediando la liberación del hierro (Weeratunga, Gee *et al.*, 2009).

A pesar de que las bacterioferritinas son más comunes que las ferritinas en bacterias y de que fueron descubiertas unos diez años antes, los roles que cumplen las bacterioferritinas son menos claros (Rev. por: Andrews, Robinson *et al.*, 2003):

En la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 existen dos tipos de bacterioferritinas, denominadas BfrA y BfrB. En BfrA se ha perdido el residuo Met52, responsable de la unión a hemo, mientras que en BfrB no se encuentran todos los residuos necesarios para la formación del centro ferroxidasa. En este organismo se descubrió la importancia de ambas proteínas, mediante la generación de mutantes *bfrA* y *brfrB*, dando como resultado que las Bfr son responsables del almacenamiento de hasta un 50% del hierro intracelular, y una deficiencia en el crecimiento de las mutantes en condiciones limitantes del metal, indicando que el hierro contenido en las Bfrs es utilizado como fuente de hierro en estas condiciones (Keren, Aurora *et al.*, 2004).

En *H. pylori* la bacterioferritina, denominada Pfr, le permite a la bacteria multiplicarse en condiciones de insuficiencia de hierro y la protege frente a toxicidad de hierro exacerbada por un medio ácido. Las funciones de Pfr en *H. pylori* son esenciales para la sobrevivencia de este organismo en la mucosa gástrica, ya que se demostró que mutantes Pfr son incapaces de colonizarla en un modelo animal (Waidner, Greiner *et al.*, 2002).

En *Brucella abortus* se demostró que la Bfr protege a la bacteria contra el estrés oxidativo. Además el hierro almacenado en Bfr puede ser utilizado como fuente intracelular de hierro cuando éste es escaso, contribuyendo en un 70% a las reservas intracelulares de hierro (Almirón y Ugalde, 2010).

Mycobacterium tuberculosis contiene dos genes que codifican proteínas de almacenamiento de hierro: *bfrA* y *bfrB*, donde *bfrA* codifica una bacterioferritina y *bfrB* codifica una proteína tipo ferritina. Estudios de la doble mutante *bfrAbfrB* indicaron la importancia de los productos de estos genes, ya que se demostró una deficiencia en el crecimiento bajo condiciones limitantes de hierro, indicando que estas proteínas actúan como fuente intracelular de hierro. Se encontró además una mayor sensibilidad al estrés oxidativo, un menor porcentaje de supervivencia en macrófagos y una menor patogenicidad en un modelo animal (Reddy, Puri *et al.*, 2011).

Los rizobios y el hierro

Los rizobios tienen una demanda de hierro especial. Como se explicó anteriormente, durante la interacción simbiótica con sus leguminosas hospederas, los rizobios sintetizan enzimas necesarias para la reducción del dinitrógeno atmosférico, que contienen compuestos con hierro como cofactor. Además los bacteroides tienen una demanda respiratoria muy alta debido a la cantidad de energía necesaria para la reducción del dinitrógeno, por lo que requieren una gran cantidad de citocromos y otras ferro-proteínas involucradas en el metabolismo energético. Entonces, los rizobios no sólo necesitan competir con otros organismos del suelo por el hierro para propagarse en su estado de vida libre, sino también para satisfacer la gran demanda de hierro que ocurre durante la simbiosis (Chao, Buhrmester *et al.*, 2005)

ANTECEDENTES

Durante su etapa de vida endosimbiótica las bacterias deben adquirir del hospedador la mayoría de los nutrientes necesarios para su metabolismo y reproducción. Los rizobios tienen una gran demanda de hierro para realizar la reducción del dinitrógeno en su etapa de bacteroide. Debido a la abundancia de leghemoglobina en las células del nódulo donde se encuentran los bacteroides, se pensó que este compuesto era la fuente de hierro para los rizobios en su etapa simbiótica (Noya, Arias *et al.*, 1997). Si bien se ha demostrado su uso por parte de las bacterias en vida libre, los estudios realizados en *R. leguminosarum* (Wexler, Yeoman *et al.*, 2001), *B. japonicum* (Nienaber, Hennecke *et al.*, 2001) y *S. meliloti* (Battistoni, Platero *et al.*, 2002; Amarelle, O'Brian *et al.*, 2008) han mostrado que los sistemas implicados en la captación de hemo como fuente de hierro expresados en vida libre, no eran necesarios para el establecimiento de una simbiosis efectiva. Además, cepas mutantes de *S. meliloti* incapaces de sintetizar el sideróforo rhizobactina tampoco tuvieron un fenotipo diferencial *in planta* (Lynch, O'Brien *et al.*, 2001). Hasta el momento es desconocido el mecanismo por el cual los rizobios adquieren el hierro necesario para los mecanismos involucrados en la vida endosimbiótica.

Si bien se conoce la importancia de las proteínas de almacenamiento de hierro para la sobrevivencia de algunas bacterias patógenas en su organismo hospedador, como es el caso de *H. pylori* (Waidner, Greiner *et al.*, 2002), *B. abortus* (Almirón y Ugalde, 2010) y *M. tuberculosis* (Reddy, Puri *et al.*, 2011), en el caso de los rizobios y según la bibliografía disponible no hay ningún trabajo que haya estudiado la presencia y función de este grupo de proteínas.

HIPÓTESIS

Nuestra hipótesis es que durante la simbiosis con la planta hospedadora los rizobios utilizan el hierro que fue internalizado durante su etapa de vida libre y almacenado en proteínas tipo ferritinas.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Conocer la importancia de proteínas de almacenamiento del hierro en rizobios en vida libre y en simbiosis, utilizando el modelo *S. meliloti* 1021.

Objetivos específicos de este trabajo:

- Identificar mediante análisis *in silico* del genoma de *S. meliloti* 1021, posibles genes responsables del almacenamiento de hierro
- Diseñar una estrategia de mutagénesis de forma de bloquear la expresión del (o de los) gen(es) identificado(s).
- Construir una mutante carente de la (o las) proteína(s) identificada(s)

La mutante construida podrá ser usada en trabajos futuros como herramienta para evaluar la función del (o de los) gen(es) mutado(s).



Análisis *in silico*

Se tomaron como referencia para la búsqueda de secuencias homólogas presentes en el genoma de *S. meliloti* 1021, las siguientes secuencias aminoacídicas: ferritina bacteriana (ECK1904), bacterioferritina (ECK3323) y Dps (ECK0801) de *E. coli* K12 MG1655, bacterioferritina (PPUBIRD1_1132) y Dps (PPUBIRD1_1247) de *Pseudomonas putida* BIRD-1, Dps (KPK_3728), ferritina (KPK_1880) y bacterioferritina (KPK_0396) de *Klebsiella pneumoniae* 343, ferritina (CJM1_1475) de *C. jejuni jejuni* M1, ferritina (SP670_1657) de *Streptococcus pneumoniae* 670-6B, bacterioferritina (RHECIAT_CH0004371) y Dps (RetlC8_010100003337) de *Rhizobium etli* CIAT 894, fueron comparadas contra el genoma traducido de *S. meliloti* 1021, utilizando la herramienta BLAST disponible en el sitio web <http://iant.toulouse.inra.fr/bacteria/annotation/cgi/rhime.cgi>. Se utilizó un Expect value cutoff de 0,0001, sin realizar cambios en los demás parámetros.

Se realizaron búsquedas de dominios conservados mediante la herramienta de búsqueda de dominios conservados de BLAST de la base de datos del NCBI.

Además se realizó un alineamiento de las secuencias traducidas de las bacterioferritinas de las bacterias mencionadas antes, utilizando la herramienta ClustalW del programa MEGA5 (Tamura, Peterson *et al.*, 2011).

Para el diseño de los cebadores utilizados en las reacciones de amplificación se utilizó el programa PrimerSelect del paquete Lasergene.

Cultivos bacterianos

La cepas bacterianas y los plásmidos usados en este trabajo se detallan en la Tabla 1. Las cepas de *E. coli* se crecieron a 37°C en medio rico LB (Sambrook, Fritsch *et al.*, 1989). Las cepas de *S. meliloti* 1021 se crecieron a 30°C en medio rico TY (Beringer, 1974). La composición de los medios se detalla en el

Anexo. En el caso de suplementarse los medios de cultivo con antibiótico su concentración final ($\mu\text{g/ml}$) se indica en subíndice. Los medios sólidos fueron preparados con una concentración de agar de 18 g/l.

Tabla 1: Cepas bacterianas y plásmidos utilizados

Características relevantes		Referencias
Cepas		
<i>S. meliloti</i> 1021	Derivado de <i>S. meliloti</i> 2011 resistente a Stp	Meade, Long <i>et al.</i> , 1982
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Douglas, 1983
Plásmidos		
pBluescript SK	Vector de clonación, Amp ^R	Alting-Mees y Short, 1989
pRK2013	Replicón ColE1 conteniendo los genes <i>tra</i> de RK2. Usado para movilizar plásmidos del tipo IncP e IncQ. Km ^R	Ditta, Stanfield <i>et al.</i> , 1980
pK18mobsac	Vector suicida en <i>S. meliloti</i> , con el gen <i>sacB</i> , Km ^R	Schäfer, Tauch <i>et al.</i> , 1994
pAB2001	Plásmido conteniendo el cassette <i>lacZGm</i> ^R . Amp ^R	Becker, Schmidt <i>et al.</i> , 1995
pBSK- <i>bfr</i> ₁₂	pBSK conteniendo el amplicón de 2,6 kb que contiene el gen <i>bfr</i> de <i>S. meliloti</i> 1021 y sus regiones flanqueantes, obtenido con los cebadores <i>bfr</i> ₁ y <i>bfr</i> ₂	Este trabajo
pBSK- <i>bfr</i> ₃₄	pBSK conteniendo el amplicón de 900 pb obtenido con los cebadores <i>bfr</i> ₃ y <i>bfr</i> ₄	Este trabajo
pBSK- <i>bfr</i> Δ	pBSK conteniendo el amplicón <i>bfr</i> ₃₄ con una delección de 216 pb y un sitio EcoRV en la región central	Este trabajo
pBSK- <i>bfr</i> :: <i>lacZGm</i> ^R	La construcción anterior el cassette <i>lacZGm</i> ^R clonado en el sitio EcoRV	Este trabajo
pK18- <i>bfr</i> :: <i>lacZGm</i> ^R	pK18mobsac conteniendo el gen <i>bfr</i> interrumpido por el cassette <i>lacZGm</i> ^R	Este trabajo

Extracción de ADN genómico de *S. meliloti* 1021

La extracción del ADN genómico se realizó según el protocolo propuesto por Ausubel y colaboradores (Ausubel, 1987), con algunas modificaciones. A partir de un cultivo puro de *S. meliloti* 1021 en medio sólido TYStp₁₀₀ se tomó una colonia, la cual fue inoculada en 5 ml de TYStp₁₀₀ líquido. Se dejó crecer durante 48 horas a 30 °C con agitación. Se colocaron 1,5 ml de cultivo en un tubo eppendorf y se cosecharon las células mediante 10 min de centrifugación

a 825 xg. Se retiró el sobrenadante y se repitió el paso anterior colocando 1,5 ml adicionales del cultivo. A continuación se realizó un lavado con 1,5 ml de NaCl 1M. Se centrifugó 10 min a 825 xg, descartando el sobrenadante. Seguidamente se realizó otro lavado con 1,5 ml de T₁₀E₂₅ pH8 (ver Anexo), resuspendiendo las células con la ayuda de un vortex, y se centrifugó 10 min a 825 xg. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 700 µl de T₁₀E₂₅ pH8. Para la lisis celular se agregó 100 µl de lisozima 2 mg/ml y para la degradación del ARN se utilizó 30 µl de ARNasa A 100 mg/ml, se homogeneizó mediante inversión y se incubó 30 min a 37°C. A continuación se agregaron 20 µl de proteinasa K 20 mg/ml y 100 µl sarcosil 12 % (p/v) y se incubó una hora a 37°C. Se realizaron luego una serie de extracciones orgánicas para eliminar impurezas del ADN, para ellas se agregó igual volumen de fenol, mezclando para que se forme la emulsión, y se centrifugó 5 min a 13200 xg. Se tomó la fase acuosa con la ayuda de una pipeta, trasladándola a un tubo limpio. Se agregó igual volumen de una mezcla de fenol - cloroformo 1:1, centrifugando 5 min a 13200 xg. Se pasó la fase acuosa a otro tubo, y se realizó una última extracción con igual volumen de cloroformo. Se centrifugó 5 min a 13200 xg, conservando la fase acuosa. Para precipitar el ADN presente en la fase acuosa se agregaron 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 0,6 volúmenes de isopropanol. Se incubó 10 min a temperatura ambiente y luego se centrifugó 10 min a 9200 xg. El ADN se lavó con etanol 70% (v/v) y el etanol remanente se eliminó secando el pellet por centrifugación al vacío en Speedvac. Por último se resuspendió el pellet en 100 µl de agua bidestilada libre de ADNasas y se incubó toda la noche a 37°C para permitir la solubilización del ADN.

Extracción de ADN plasmídico

Las extracciones de ADN plasmídico se realizaron según el método de lisis alcalina, descrito por Sambrook y colaboradores (Sambrook, Fritsch *et al.*, 1989), de la siguiente manera: A partir de una colonia aislada se sembraron 5 ml de medio LB con el antibiótico adecuado, incubándose durante toda la noche con agitación a 30°C. Se tomaron 1,5 ml del cultivo y se cosecharon las células mediante 30 seg de centrifugación a 12000 xg y 4°C. Se resuspendió el pellet en 100 µl de solución I fría y se agregaron 200 µl de solución II recién preparada y 150 µl de solución III fría, mezclando por inversión (ver la composición de las soluciones en el Anexo). Se mantuvo 5 minutos en hielo y se realizó una extracción, colocando en el tubo 200 µl de cloroformo,

centrifugando en frío 5 min a 12000 xg. El ADN plasmídico se precipitó de la fase acuosa con el agregado de 0,6 volúmenes de isopropanol seguido de una incubación de 2 min a temperatura ambiente y posterior centrifugación de 5 min a 12000 xg. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol 70% (v/v). Se centrifugó 10 min a 13000 xg, se dejó secar el pellet y por último se resuspendió en 49 µl de agua bidestilada libre de ADNAsas y 1 µl de ARNasa 100 mg/ml. Se incubó la mezcla 15 min a 37°C para permitir la degradación del ARN.

Preparación de células competentes

El protocolo seguido para la preparación de células competentes fue adaptado del descrito por Ausubel y colaboradores (Ausubel, 1987). Se partió de una colonia de *E. coli* DH5α a partir de un cultivo joven crecido en medio sólido de LB sin antibióticos la cual se sembró en 5 ml de LB líquido, incubando toda la noche con agitación a 30°C. Se repicó una dilución 1/100 en LB y se dejó crecer hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0,2 a una longitud de onda de 630 nm. A continuación se cosecharon las células en tubos estériles fríos mediante centrifugación de 5 min a 2300 xg y 4°C. Se resuspendió el pellet en 20 ml de CaCl₂ 0,1 M frío y las células se mantuvieron en hielo 20 min. Luego se centrifugó en frío 5 min a 2300 xg, descartándose el sobrenadante, y las células se resuspendieron en 0,5 ml de CaCl₂ 0,1 M frío, dando pequeños golpes alternando con períodos de hielo. Las células competentes así obtenidas se almacenaron a -80°C en glicerol 25% (v/v) para su posterior uso, fraccionadas en alícuotas de 100 µl.

Transformación

La inserción de ADN foráneo a las células se realizó mediante el método de shock térmico, descrito por Sambrook y colaboradores (Sambrook, Fritsch *et al.*, 1989), de la siguiente manera: a los tubos que contenían 100 µl de células competentes se les agregó una solución del plásmido, de manera que la concentración de ADN no superase los 50 ng/10µl. A continuación se dio un golpe de calor a 42°C durante 90 seg en un baño de agua y el tubo se colocó rápidamente en hielo 2 min. Se agregó 1 ml de medio LB a cada tubo y se dejó incubando una hora con agitación a 37°C. Pasado este tiempo se plaquearon alícuotas de 100 µl en medio LB sólido con el antibiótico adecuado, incubándose durante toda la noche a 37°C.

Digestión con enzimas de restricción

Las digestiones con enzimas de restricción fueron realizadas de acuerdo a las sugerencias del fabricante. En todos los casos se utilizó una concentración enzimática de 0,3 a 0,5 U/ μ l y el buffer de reacción suministrado con la enzima. Una unidad de enzima de restricción se define como la cantidad de enzima necesaria para digerir completamente 1 μ g de ADN λ en una hora a 37°C en 50 μ l de buffer conteniendo BSA acetilada, en una concentración final de 0,1 mg/ml. Dependiendo de los requerimientos se utilizaron distintas concentraciones de ADN en las distintas digestiones.

Reacciones de ligación

Las reacciones de ligación se realizaron según las especificaciones del fabricante. Se utilizó la enzima T4 DNA ligasa (New England Biolabs) a una concentración de 400 U/ μ l y el buffer de reacción suministrado. Se define una unidad de enzima Ligasa como la cantidad de enzima necesaria para el 50% de ligación de fragmentos de ADN λ digerido con HindIII (concentración de extremos 5' de 300 μ g/ml) en 20 μ l de buffer 1x en 30 min a 16°C. Esta enzima cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos 5' y 3' del ADN, pudiendo unir tanto extremos cohesivos como romos. Se utilizó una relación vector : inserto de 1:10 empleando la concentración óptima de vector de ADN sugerida. Se incubó la reacción durante 12 horas a 16°C.

Reacciones de amplificación por PCR

Las reacciones de PCR permitieron la amplificación selectiva de una región de una molécula de ADN molde, mediante hibridación y extensión de los cebadores específicamente diseñados para la tarea (ver Tabla 2). La enzima utilizada en las reacciones de PCR fue la Pfu ADN polimerasa, la cual se caracteriza por tener actividad correctora de pruebas 3' \rightarrow 5', y no poseer actividad nucleotidil transferasa terminal, por lo que los productos de amplificación obtenidos con Pfu se pueden utilizar directamente para su clonado en vectores con extremos romos. Las mezclas de reacción consistieron en 5 μ l de buffer conteniendo sulfato de magnesio 20 mM, 2 μ l de dNTPs 5 mM, 1 μ l de cada cebador de concentración 30 mM, 1,25 unidades de enzima Pfu ADN polimerasa (Fermentas) y agua bidestilada c. s. p. 50 μ l. Se define una unidad de Pfu ADN polimerasa como la cantidad de enzima que cataliza la incorporación de 10 nmol de desoxirribonucleótidos en una fracción de polinucleótidos en 30 min a 72°C. La reacción de amplificación se realizó

en un termociclador Thermo Px2®. Los programas utilizados variaron en cada caso, como se detalla en la Tabla 3.

Tabla 2. Secuencias de los cebadores utilizados

Cebador	Secuencia
bfr ₁	GGCGCACCCCGTTTCCTTC
bfr ₂	AGCCGCAATGCCGTCCTG
bfr ₃	CAGAGCGTTGCGTATGATGGACAC
bfr ₄	CAAGGCAGAGCGGCGTGT
bfr ₅	TCCGATATCGACGCGGCACGGCCTATAAG
bfr ₆	TCCGATATCTACGGCACCGAGTTCGAGATAGAGC

Tabla 3. Programas utilizados en las reacciones de PCR.

Cebadores	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Hibridación	Extensión	Ciclos	Extensión final
bfr ₁ y bfr ₂	5 min a 95°C	30 seg a 95°C	1 min a 54,6°C	8 min a 72°C	30	10 a min 72°C
bfr ₃ y bfr ₄	5 min a 95°C	30 seg a 95°C	30 seg a 57°C	1 min a 72°C	30	10 a min 72°C
bfr ₅ y bfr ₆	5 min a 95°C	30 seg a 95°C	30 seg en un gradiente de temperaturas entre 50 y 62°C	7,5 min a 72°C	30	10 a min 72°C

Visualización y cuantificación de ADN

Para la visualización de las muestras de ADN se realizaron corridas electroforéticas en geles de agarosa 0,80% (p/v) en TAE (ver Anexo). Las corridas se realizaron durante 45 - 60 minutos a 90mV. Para la detección se empleó el agente intercalante bromuro de etidio a una concentración de 0,5 g/ml sumergiendo el gel durante 10 minutos y la detección del ADN se realizó bajo luz U.V.

La cuantificación y estimación de los tamaños de las muestras fueron llevadas a cabo mediante comparación con un estándar comercial de concentración conocida correspondiente a 1kb DNA ladder y 1kb DNA ladder Plus (Fermentas).

Extracción de ADN a partir de geles de agarosa

Mediante el uso del kit ApplyChem DNA isolation.

La extracción se realizó según el protocolo sugerido por los fabricantes: primero se recortó la banda de interés, colocándola en un eppendorf. Se agregaron 3 volúmenes de NaI 6M, incubando durante 5 min a 55°C. Una vez disuelta la agarosa se agregaron 10 µl de solución de polvo de vidrio, suministrado en el kit. Se mezcló la suspensión con la ayuda de un vortex y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Seguidamente se centrifugó 10 seg a 12000 xg, descartando el sobrenadante. Se realizaron tres lavados sucesivos con 500 µl de buffer de lavado suministrado en el kit, centrifugando 1 min a 12000 xg en cada paso. Una vez removido completamente el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 20 µl de agua bidestilada. El ADN se eluyó incubando la suspensión 5 min a 55°C, mezclando ocasionalmente. Finalmente se centrifugó 1 min a 12000 xg, y se trasvasó el sobrenadante a un tubo limpio.

Mediante el método de extracción con fenol.

Una vez recortada la banda de interés y fragmentada en pequeños trozos, éstos se colocaron en un tubo eppendorf y se agregó igual volumen de fenol. Se incubó 15 min a -80°C, y se centrifugó 10 min a 9200 xg. Se pasó la fase acuosa a un tubo limpio, agregando igual volumen de fenol - cloroformo 1:1, y se centrifugó 10 min a 9200 xg. A la fase acuosa se le agregó 1/10 volúmenes de acetato de sodio y 2 volúmenes de etanol 70% (v/v) frío. Se dejó incubando durante toda la noche a -20°C, y al día siguiente se centrifugó 10 min a 9200 xg. Finalmente se realizó un lavado con etanol 70% (v/v) frío y se dejó secar el pellet, el cual fue resuspendido en 20 µl de agua bidestilada.

Construcción de la mutante

Obtención del plásmido recombinante pBSK-*bfr*₁₂

Primeramente se extrajo el ADN genómico de *S. meliloti* 1021, según la técnica descrita anteriormente. A continuación se realizó una corrida electroforética para verificar la eficiencia de la extracción. El ADN así obtenido fue utilizado como molde para la amplificación por PCR de una región de 2600 pb que contiene el posible gen *bfr* usando los cebadores sintéticos *bfr*₁ y *bfr*₂ (ver Tabla 2), empleando el programa descrito en la Tabla 3. Se realizó una corrida electroforética en un gel de agarosa 0,8% (p/v) en TAE para separar el amplicón de interés de otros productos de

amplificación inespecíficos. La extracción de la banda correspondiente se realizó utilizando el kit ApplyChem y paralelamente mediante el método de extracción con fenol. El ADN así purificado fue ligado mediante T4 ADN ligasa en el vector pBSK previamente digerido con EcoRV. Esta estrategia es posible ya que el producto de amplificación generado por la enzima Pfu contiene extremos romos al igual que el producto de digestión generado por la enzima EcoRV.

El plásmido resultante fue usado para transformar células competentes *E. coli* DH5 α . La selección de las colonias transformadas con el plásmido recombinante se realizó en el medio LBamp₅₀XGal₂₅. Luego de incubar las placas a 37°C durante toda la noche, las colonias transformadas con el plásmido recombinante fueron seleccionadas por su resistencia a la ampicilina y su coloración blanca, debido a la imposibilidad de hidrolizar el sustrato cromogénico X-Gal.

Las colonias transformadas con el plásmido recombinante pBSK-*bfr*₁₂ obtenidas fueron reaisladas en placas de LBamp₅₀XGal₂₅ y repicadas en 5 ml de medio líquido LBamp₅₀. Pasadas 24 horas se procedió a la extracción de ADN plasmídico y se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa 0,8 % (p/v) en TAE para comprobar la presencia del inserto, comparando la banda resultante con la correspondiente al vector sin inserto.

Para conocer la orientación del inserto en el vector se realizó un perfil de restricción con las enzimas BamHI y EcoRI, y los productos de digestión obtenidos fueron analizados mediante electroforesis

Obtención del plásmido recombinante pBSK-*bfr*₃₄

Se amplificó una región de 900 pb que abarca el gen *bfr* y parte del ORF adyacente SMC03787, mediante PCR, utilizando como molde la construcción pBSK-*bfr*₁₂ y los cebadores específicos *bfr*₃ y *bfr*₄.

Se realizó una electroforesis de los productos de la amplificación y se extrajo el ADN correspondiente al amplicón de interés de la misma forma que se procedió en la construcción anterior. El ADN purificado se clonó en el sitio EcoRV de pBSK, y la construcción resultante se empleó para transformar células de *E. coli* DH5 α competentes. Se realizó una minipreparación del ADN plasmídico de las colonias transformadas con el plásmido recombinante y se obtuvo el perfil de restricción del mismo con la enzima Sall para determinar

la orientación del inserto. Los fragmentos obtenidos de la digestión se analizaron mediante electroforesis.

Obtención del plásmido recombinante pBSK-*bfr*Δ

Se realizó una PCR inversa utilizando los cebadores sintéticos *bfr*₅ y *bfr*₆, los cuales contienen secuencias adaptadoras que incluyen un sitio de restricción EcoRV. Se utilizó como molde el plásmido recombinante pBSK-*bfr*₃₄, de manera que el amplicón resultante contuviese un extremo del gen *bfr*, el gen para la proteína conservada hipotética SMc03787, pBSK en la parte central y el otro extremo del gen *bfr*.

El amplicón obtenido fue digerido con EcoRV y recircularizado mediante tratamiento con T4 ADN ligasa. El plásmido resultante fue usado para transformar células DH5α competentes. Las colonias transformantes se seleccionaron en el medio LBamp₅₀XGal₂₅, por su coloración blanca. Para seleccionar las colonias que portaran el plásmido recombinante con la delección, se realizaron minipreparaciones del ADN y perfiles de restricción con las enzimas BamHI y HindIII. Esta digestión libera en la construcción de interés el inserto de 700 pb aproximadamente, que contiene el gen *bfr* con una delección de 216 pb en su región central, y se diferencia con el inserto del plásmido utilizado como molde, de 900 aproximadamente pb, que contiene el gen *bfr* salvaje. Se seleccionó una colonia que porta el plásmido pBSK-*bfr*Δ para almacenar en glicerol 25% (v/v) a -80°C.

Obtención de la construcción pBSK-*bfr*::*lacZGm*^R

El cassette que fue usado como reportero fue extraído del vector pAB2001 *lacZGm*^R, mediante digestión con la enzima SmaI y posterior ligación en el sitio EcoRV presente dentro de la secuencia de *bfr* en la construcción pBSK-*bfr*Δ. Primeramente se realizó una minipreparación de ADN plasmídico a partir de un cultivo fresco de *E. coli* DH5α pAB2001 en LBGm₅. El fragmento de aproximadamente 4200 pb fue purificado a partir de un gel de agarosa 0,8% (p/v) en TAE empleado el kit ApplyChem.

El fragmento de ADN purificado, que corresponde al cassette *lacZGm*^R se clonó en el sitio EcoRV de la construcción pBSK-*bfr*Δ. Se utilizó el producto de la ligación para transformar células de *E. coli* DH5α competentes y se seleccionaron las colonias transformadas con la construcción pBSK-*bfr*::*lacZGm*^R debido a su capacidad de crecer en LBamp₅₀Gm₁₀X-Gal₂₅ y la

presencia de coloración azul. Una vez extraído el ADN plasmídico, éste se sometió a una digestión con la enzima de restricción XhoI para comprobar la orientación del cassette en la construcción.

Obtención del vector pK18**bfr::lacZGm^R**

Para obtener la construcción que actuará como vehículo para la movilización del alelo mutante de *bfr* al rizobio se partió de la construcción pBSK-*bfr::lacZGm^R*, de la que se escindió el inserto mediante digestión con las enzimas de restricción BamHI y HindIII. Se comprobó la digestión mediante electroforesis y se purificó el ADN de la banda correspondiente al inserto de 4800 pb. Dicho fragmento fue ligado al vector pK18mobsac previamente digerido con BamHI y HindIII.

Movilización del vector pK18-*bfr::lacZGm^R* a *S. meliloti* 1021 mediante conjugación triparental.

La movilización de la construcción portadora del alelo *bfr* interrumpido por el cassette *lacZGm^R* desde *E. coli* hacia *S. meliloti* se realizó mediante conjugación triparental, en la que la cepa *E. coli* DH5α pRK2013 actuó como helper, *S. meliloti* 1021 como aceptora y *E. coli* DH5α pK18-*bfr::lacZGm^R* como dadora. Primeramente se inocularon varias colonias aisladas de *S. meliloti* 1021 en 5 ml de medio TYStp₁₀₀. Al día siguiente se realizaron los cultivos primarios de *E. coli* DH5α pK18-*bfr::lacZGm^R* en LBKm₅₀Gm₁₀ y *E. coli* DH5α pRK2013 en LBKm₃₅. Pasadas 24 horas se pasaron 100 µl del cultivo de *S. meliloti* 1021 a 5 ml de TY, y dos horas más tarde se pasaron 100 µl de cada cultivo de *E. coli* a 5 ml de LB. Unas horas después se procedió al filtrado de las cepas en membranas estériles de nitrocelulosa de 45 nm de diámetro de poro. En los filtros se depositaron cultivos de *E. coli* DH5α pRK2013 y pK18-*bfr::lacZGm^R* y *S. meliloti* 1021 en relación de volúmenes 1:1:5 y 2:2:5 respectivamente. Además se realizaron controles de cada cepa de *E. coli* y de *S. meliloti* 1021, colocando en los diferentes filtros 100 y 500 µl de cada cultivo, respectivamente. Los filtros conteniendo las células bacterianas, fueron colocados en medio TY sólido sin antibiótico, con la superficie que contiene las células hacia arriba y se incubó durante toda la noche a 30°C. A continuación se resuspendieron las células en TY y se plaquearon fracciones de 100 µl en placas conteniendo TYStp₂₀₀Nm₁₀₀Gm₅ sólido y se crecieron a 30°C 48 horas o hasta observar la aparición de colonias.

Selección del doble evento de recombinación homóloga.

Se repicaron las colonias transconjugantes *S. meliloti* 1021 *bfr::lacZGm^R* en medio TYStp₂₀₀Nm₁₀₀Gm₅ sólido. Se tomaron colonias aisladas de dichas placas y se inocularon en TY líquido sin antibiótico. Se incubaron a 30°C con agitación y pasadas 24 horas se midió la densidad óptica en espectrofotómetro a una longitud de onda de 620 nm. Se realizó una dilución de manera de obtener una suspensión de aproximadamente 2×10^6 u.f.c. en 100 µl de cultivo. Se inocularon placas conteniendo TYStp₂₀₀Sac15%Gm₅ sólido con alícuotas de 100 µl de los cultivos diluidos y se incubaron a 30°C hasta la aparición de colonias. Como comprobación primaria del acontecimiento del doble evento de recombinación homóloga se repicaron las colonias resultantes en TYStp₂₀₀Nm₁₀₀Gm₅ sólido: En este medio se espera ausencia de crecimiento debido a la pérdida del gen de resistencia a la Nm codificado en el plásmido pK18mobsac.

Verificación de la mutación mediante Southern blot

El ensayo se realizó utilizando el kit NEBlot®Phototope® (New England Biolabs). En este kit el marcado de la sonda de hibridación se realiza por incorporación de biotina mediante una reacción de amplificación con cebadores aleatorios. La detección del ADN blanco se realiza mediante una reacción catalizada con la enzima fosfatasa alcalina, en la que el agente quimioluminiscente es desestabilizado al desfosforilarse. Para la detección se utilizó el kit Phototope®-Star Detection (New England Biolabs).

Primeramente se obtuvo el ADN genómico de las mutantes obtenidas *S. meliloti* 1021 *bfr::LacZGm^R* y de la cepa salvaje mediante el protocolo de extracción de ADN con fenol, descrito anteriormente. El ADN fue digerido con la enzima EcoRI. Los fragmentos obtenidos de la digestión fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8 % (p/v) en TAE. La sonda de hibridación utilizada fue el fragmento de ADN de 900 pb purificado obtenido a partir de la amplificación con los cebadores *bfr₃* y *bfr₄* utilizando como molde el ADN genómico de *S. meliloti* 1021. Para el marcado de la sonda mediante biotinización se partió de 10 ng de ADN, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Para la desnaturalización y la transferencia se modificó el protocolo según se detalla a continuación: Se cortó una membrana de nitrocelulosa de un tamaño algo más grande que el gel de agarosa, humedeciéndola en agua desionizada y

buffer de transferencia (ver composición en el Anexo) durante 5 minutos. La transferencia se realizó utilizando un aparato de vacío, en el cual se colocó la membrana, y sobre ésta el gel. Se cubrió el gel con solución despurinizante dejando durante 3 minutos a 30 mbar. Se retiró el excedente de la solución anterior y se agregó solución desnaturizante, dejándola actuar durante 7 minutos a 30 mbar. Posteriormente se retiró el exceso de la solución desnaturizante y se neutralizó durante 7 minutos a la misma presión. Se realizó la transferencia durante una hora a 50 mbar utilizando buffer de transferencia. Se colocó la membrana entre dos hojas de papel de Wattman 3MM y se secó en estufa a 70°C durante 15 minutos. Se expuso la membrana a luz UV durante dos minutos para entrecruzar el ADN a la membrana. Posteriormente se continuó con la hibridación según lo indica el protocolo suministrado por los fabricantes del kit utilizado. La detección se realizó por revelado mediante autoradiografía.

El ORF SMc03786 (correspondiente al probable gen *bfr*) abarca las posiciones 3.451.466 a 3.451.951 de la hebra (-) del cromosoma de *S. meliloti* 1021. Parcialmente solapado a SMc03786, se encuentra el ORF SMc03787, que abarca las posiciones 3.451.917 a 3.452.228, y codifica una proteína hipotética conservada. En la Fig. 9 se muestra un esquema del entorno génico en el que se encuentra *bfr*.

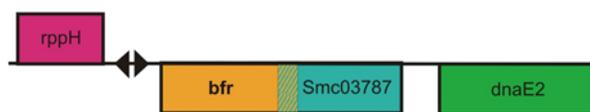


Fig. 9: Entorno genético del gen *bfr*, que codifica una probable bacterioferritina. El mismo se encuentra en la hebra (-) del cromosoma de *S. meliloti* 1021, parcialmente solapado corriente arriba con la proteína conservada hipotética SMc03787.

Mediante el uso de la herramienta de búsqueda de dominios conservados disponible en la página web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> se encontró en la secuencia traducida del gen *bfr* la presencia de motivos de unión a hemo, centros ferroxidasa, y poros ferroxidasa. En la Fig. 10 se muestra el resultado obtenido de la búsqueda de dominios conservados en la secuencia aminoacídica de Bfr. Además, al realizar la búsqueda de dominios conservados en la secuencia SMc03787 se encontró una región que presenta homología con la superfamilia de ferredoxinas asociadas a bacterioferritina (Bfd) (Fig. 11).

Se realizó el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los genes que demostraron homología con la Bfr de *S. meliloti* 1021. El resultado de dicho alineamiento se muestra en la Fig. 12, donde se resaltan los residuos asociados a los diferentes dominios conservados encontrados en las bacterioferritinas.

A partir de la secuencia aminoacídica de la Bfr de *S. meliloti* 1021 se obtuvo la estructura predicha de la proteína, utilizando la herramienta disponible en la base de datos de Swiss Prot (Fig. 13).

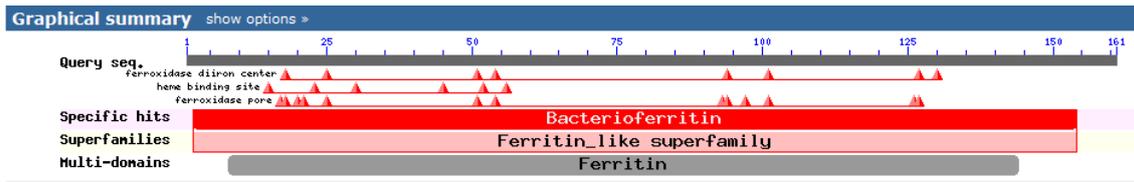


Fig. 10: Imagen obtenida de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>, donde se muestra el resultado de la búsqueda de dominios conservados de la secuencia Smc03786 del genoma de *S. meliloti* 1021. Se encontraron dominios ferroxidasa, de unión a hemo y poros ferroxidasa, los cuales son típicos de las bacterioferritinas.

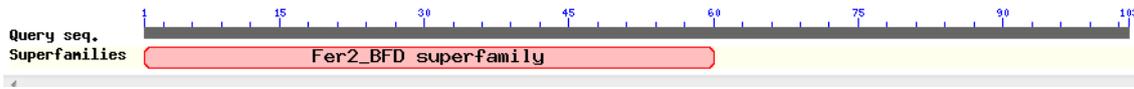


Fig. 11: Imagen obtenida de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>, donde se muestra el resultado de la búsqueda de dominios conservados de la secuencia SMc03787 del genoma de *S. meliloti* 1021. Se encontró similitud a la familia de proteínas tipo Bfd.

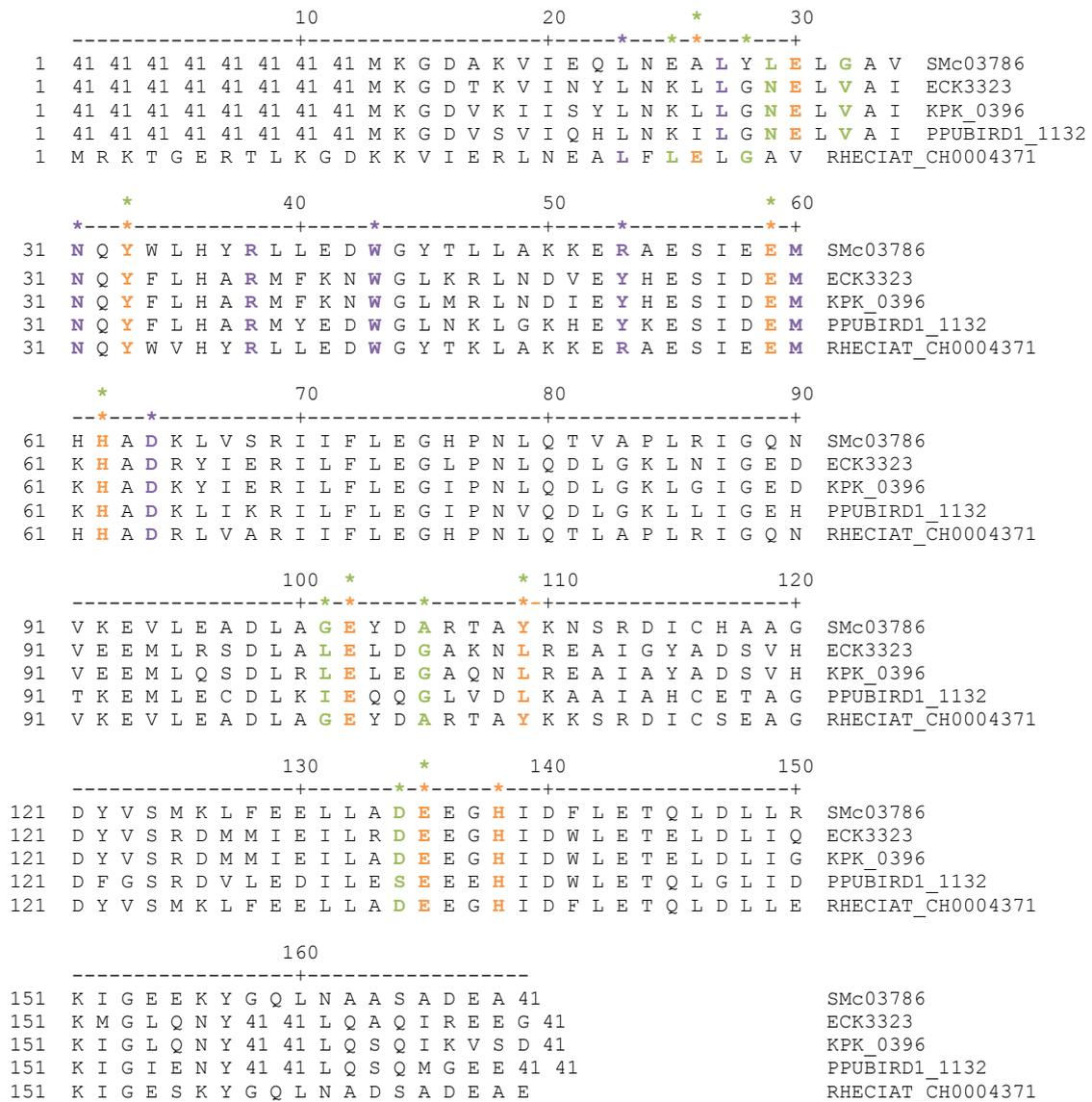


Fig. 12. Resultado del alineamiento entre las secuencias traducidas de los genes *bfr* de diferentes bacterias. En naranja se muestran los residuos que forman parte del centro ferroxidasa, En púrpura los de unión a hemo y en verde los del poro ferroxidasa.

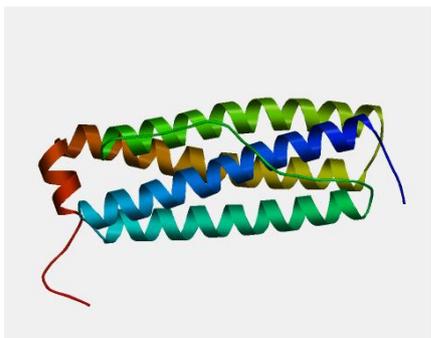


Fig. 13: Estructura predicha a partir de la secuencia aminoacídica de Bfr de *S. meliloti* 1021. Se observan los rasgos característicos del dominio ferritina, compuesto un ramillete de dos pares de hélices y un largo lazo que recorre la longitud del ramillete que conecta dos hélices.

Construcción de la mutación *bfr::lacZGm^R*

Obtención del plásmido recombinante pBSK-*bfr*₁₂

El primer paso para la construcción de la mutación en el gen *bfr* de *S. meliloti* 1021 consistió en clonar una región del genoma de aproximadamente 2600 pb, que contiene el gen *bfr* completo y el ORF SMC03787, en el plásmido pBSK. Se decidió clonar este fragmento que abarca las regiones adyacentes al gen *bfr* (su región promotora y el posible gen *bfd*) de forma de generar una construcción que permitiera estudios futuros en el laboratorio ya que resulta más sencillo manipular un fragmento de ADN clonado en un plásmido que todo el genoma. Se realizó una reacción de PCR utilizando la enzima Pfu ADN polimerasa, en la que se emplearon los cebadores *bfr*₁ y *bfr*₂, diseñados específicamente para la amplificación del fragmento que se esquematiza en la Fig. 14, utilizando como molde ADN genómico de *S. meliloti* 1021. Se requiere una gran fidelidad en el proceso de amplificación, por lo cual es necesario el uso de una enzima ADN polimerasa cuya tasa de errores sea mínima. Este requisito es cumplido por la enzima Pfu ADN polimerasa, la cual posee actividad correctora de pruebas 3'→5', de manera que la tasa de incorporación de nucleótidos erróneos se ubica en 1,3 nucleótidos por millón de bases incorporadas por ciclo. Además, debido a que carece de actividad nucleotil transferasa terminal, esta enzima genera fragmentos con extremos romos, lo cual permite su clonación en vectores digeridos con enzimas de restricción que generan el mismo tipo de extremos, sin ser necesario un paso de digestión previo (Cline, Braman *et al.*, 1996)

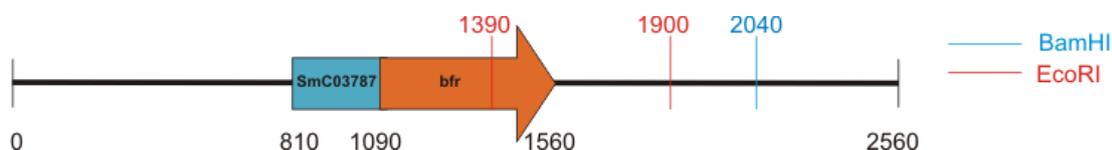


Fig. 14: Mapa de restricción teórico del producto de amplificación esperado a partir de los cebadores *bfr*₁ y *bfr*₂ sobre el ADN genómico de *S. meliloti* 1021. En rojo se muestran las posiciones de los sitios de corte para EcoRI y en celeste los sitios de corte para BamHI.

En la Fig. 15 se muestra el gel de agarosa 0,8 % (p/v) en TAE en el que se realizó la corrida electroforética de los productos de PCR obtenidos, observándose una banda del peso molecular esperado para la amplificación realizada, mientras que en el control negativo, en el que no se adicionó ADN a la mezcla de reacción, no se detectó la presencia de bandas.

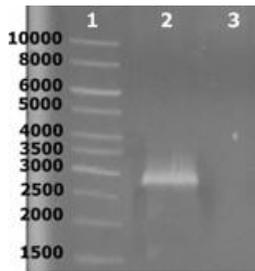


Fig. 15: Gel de agarosa 0,8 % (p/v) en TAE, donde se muestran los productos de amplificación por PCR con los cebadores específicos bfr_1 y bfr_2 . El primer carril corresponde al marcador de peso molecular 1Kb DNA ladder. El segundo carril corresponde a los productos de amplificación usando como molde ADN genómico de *S. meliloti* 1021. El tercer carril corresponde al control negativo en el que no se adicionó ADN a la mezcla de reacción.

El paso siguiente fue la purificación de la banda de 2600 pb del gel de agarosa, con el fin de evitar la contaminación por fragmentos de ADN producto de amplificación inespecífica. Una vez obtenido el fragmento purificado, el mismo fue clonado en el vector pBSK previamente digerido con la enzima de restricción EcoRV, enzima que genera extremos romos.

La construcción resultante de la ligación entre pBSK y el producto de amplificación de 2600 pb (bfr_{12}) fue utilizada para transformar, mediante el método de shock térmico, células de *E. coli* DH5 α competentes. El vector pBSK es un fagémido replicable en *E. coli*, de alto número de copias que contiene el gen *bla*, que codifica una lactamasa que confiere resistencia a Amp, y su sitio de clonado múltiple interrumpe el fragmento 5' terminal del gen *lacZ*, que codifica la región N-terminal (fragmento α) de la β -galactosidasa, bajo el control de un promotor constitutivo (Alting-Mees y Short, 1989). Las células que recibirán los plásmidos recombinantes deben ser carentes de dicho fragmento, pero sí codificar en su genoma el fragmento ω , el cual no es funcional en ausencia del fragmento α . De esta manera, al carecer del fragmento α , la enzima β -galactosidasa no es funcional, pero adquiere su funcionalidad al recibir el fragmento en trans, como parte de un plásmido por ejemplo, en el fenómeno conocido como α -complementación (Langley, Villarejo *et al.*, 1975). Si un inserto de ADN interrumpe la secuencia del fragmento α en el plásmido, no se producirá β -galactosidasa funcional. Entonces, para seleccionar las colonias transformantes portadoras del plásmido recombinante se diferenciará entre las colonias que expresen β -galactosidasa funcional de las que no lo hacen. Así, las células transformadas con el plásmido recombinante pBSK- bfr_{12} fueron seleccionadas en base a su color blanco en el medio LB Amp₅₀ XGal₂₅, constatándose la obtención de un gran número de colonias azules en comparación con el de colonias blancas.

Para verificar la presencia del plásmido recombinante, se realizaron seleccionó una colonia blanca y una colonia azul, de las cuales se extrajo el

ADN plasmídico. La Fig. 16 muestra el resultado de una electroforesis en gel de agarosa 0,8% (p/v) en TAE de preparaciones de ADN plasmídico de la colonia blanca y la azul respectivamente, demostrando un mayor peso molecular del ADN plasmídico de la colonia blanca (aproximadamente 5500 pb) en comparación con el ADN plasmídico extraído de la colonia azul (2900 pb). Este resultado sugiere la presencia del plásmido recombinante pBSK-*bfr*₁₂ en las colonias blancas, mientras que en las colonias azules corresponderían a células conteniendo el plásmido pBSK sin el inserto.

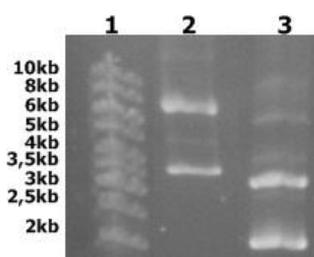


Fig. 16: Gel de electroforesis de agarosa 0,8% (p/v) en TAE donde se nota la diferencia de tamaños entre el plásmido obtenido de una colonia blanca (carril 2) y el obtenido de una colonia azul (carril 3), producto de la transformación de células *E. coli* DH5 α competentes con la construcción pBSK-*bfr*₁₂. Se nota una diferencia de tamaños en los plásmidos, siendo mayor en el caso del ADN extraído de la colonia blanca, sugiriendo la presencia del inserto. El primer carril corresponde al marcador de peso molecular 1kb DNA ladder.

Para verificar la orientación del inserto en el vector se realizaron perfiles de restricción utilizando las enzimas BamHI y EcoRI. En la Fig. 17 se muestran esquemas que representan las orientaciones en las que se puede hallar el inserto con respecto al vector. Para el caso de la conformación *a* se esperan fragmentos de 500, 1400 y 3500 pb para la digestión con EcoRI y de 2000 y 3500 pb para la digestión con BamHI; mientras que para la conformación *b* se esperan fragmentos de 500, 600 y 4300 pb para la digestión con EcoRI y de 500 y 5000 pb para la digestión con BamHI. El resultado de las digestiones del ADN plasmídico extraído de la colonia blanca y la azul respectivamente con las enzimas BamHI y EcoRI se muestra en la Fig. 18. La digestión con EcoRI del plásmido obtenido a partir de un cultivo de la colonia blanca dio dos fragmentos de 500 y 600 pb aproximadamente y un fragmento mayor, de 4300 pb. La digestión del mismo plásmido con BamHI resultó en un fragmento de 500 pb y uno de 5000 pb aproximadamente. Las digestiones del plásmido obtenido a partir de un cultivo de la colonia azul, tanto con EcoRI como con BamHI dieron como resultado una única banda que corresponde a 3000 pb, consistente con el tamaño esperado para el plásmido pBSK en su forma lineal. Estos resultados demuestran que la colonia blanca seleccionada consiste en células transformadas con la construcción pBSK-*bfr*₁₂, siendo la orientación del inserto en el plásmido la representada en la conformación *b* de la Fig. 17.

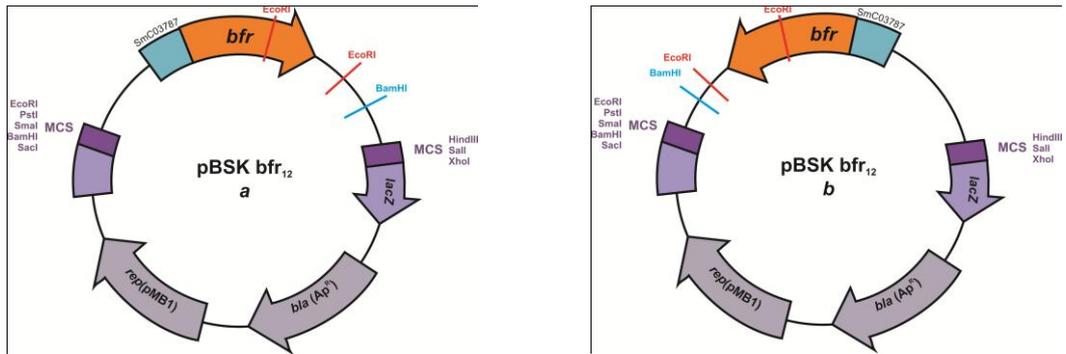


Fig. 17: Posibles productos de la ligación entre el fragmento de amplificación *bfr*₁₂ y el vector pBSK digerido con EcoRV. Para conocer la orientación del inserto en el vector se realizaron perfiles de restricción con las enzimas EcoRI y BamHI. En el caso de la conformación *a* se esperaban fragmentos de 500, 1400 y 3500 pb para la digestión con EcoRI y de 2000 y 3500 pb para la digestión con BamHI. Para la conformación *b* se esperaban fragmentos de 500, 700 y 4300 pb para la digestión con EcoRI y de 500 y 5000 pb para la digestión con BamHI.

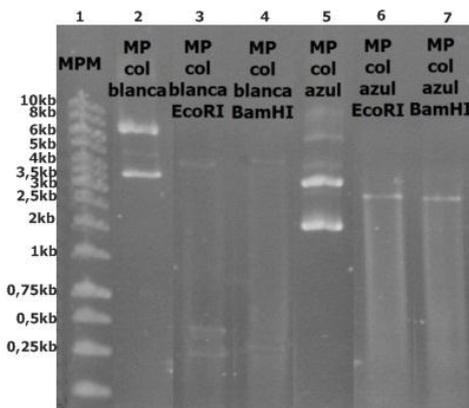


Fig. 18: Gel de agarosa 0,8 % (p/v) en TAE donde se muestra el resultado de las digestiones con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI del ADN plasmídico extraído de la colonia azul y blanca respectivamente, seleccionadas luego de la transformación de células *E. coli* DH5 α competentes con el producto de ligación entre pBSK y el producto de amplificación *bfr*₁₂. El orden de sembrado fue el siguiente: *carril 1* marcador de peso molecular 1kb DNA ladder; *carril 2* ADN plasmídico de la colonia blanca; *carril 3* productos de digestión de ADN plasmídico de la colonia blanca con EcoRI; *carril 4* productos de digestión de ADN plasmídico de la colonia blanca con BamHI; *carril 5* ADN plasmídico de la colonia azul; *carril 6* productos de digestión de ADN plasmídico de la colonia azul con EcoRI; *carril 7* productos de digestión de ADN plasmídico de la colonia azul con BamHI.

Obtención del plásmido recombinante pBSK-*bfr*₃₄

El siguiente paso para la construcción de la mutación consistió en amplificar por PCR una región interior del inserto clonado en la construcción pBSK-*bfr*₁₂. Para ello se utilizaron la enzima Pfu ADN polimerasa, los cebadores específicos *bfr*₃ y *bfr*₄ y como ADN molde la construcción pBSK-*bfr*₁₂, obtenida anteriormente. El producto de amplificación esperado, de 890 pb se esquematiza en la Fig. 19. Es importante resaltar que en esta región no se encuentra ningún sitio de corte para la enzima BamHI.

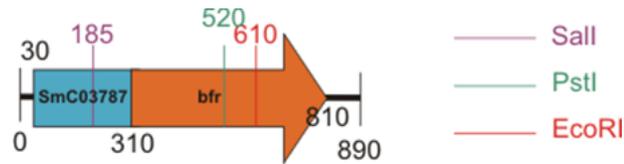


Fig. 19: Mapa de restricción del producto de amplificación esperado a partir de los cebadores bfr_3 y bfr_4 sobre la construcción pBSK bfr_{12} . En rojo, morado y verde se muestran los sitios de corte para las enzimas EcoRI, Sall y PstI respectivamente.

La Fig. 20 muestra el gel de agarosa 0,8 % (p/v) en TAE en donde se corrieron los productos de amplificación obtenidos. Se observa la presencia de bandas producto de amplificación inespecífica en la reacción que usó como molde el ADN plasmídico de colonias azules, que corresponden al vector pBSK sin inserto, mientras que se obtuvo el producto de amplificación esperado, de 900 pb aproximadamente, al utilizar como molde el ADN plasmídico obtenido de la colonia blanca (pBSK- bfr_{12}). En el caso que no se agregó ADN molde a la mezcla de reacción no se observó la presencia de bandas.

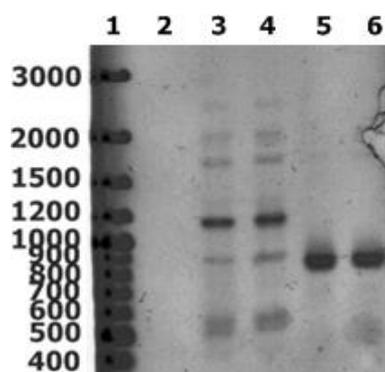


Fig. 20: Gel de agarosa 0,8 % (p/v) en TAE de los productos de amplificación con los cebadores bfr_3 y bfr_4 . El primer carril corresponde al marcador de peso molecular 1Kb DNA ladder. El segundo carril corresponde al control negativo, en el que no se adicionó ADN a la mezcla de reacción. El tercer y cuarto carril muestran productos de amplificación inespecíficos obtenidos de la reacción de PCR con los cebadores bfr_3 y bfr_4 sobre el ADN plasmídico obtenido de una colonia azul de la transformación anterior. El quinto y el sexto carril muestran el producto de amplificación específico esperado, de aproximadamente 900 pb obtenido de la PCR sobre el ADN plasmídico de la colonia blanca.

Una vez obtenido el producto de amplificación específico de 900 pb, éste fue purificado a partir de un gel de agarosa 0,8% (p/v) en TAE y clonado en el sitio EcoRV de pBSK. El producto de la ligación fue utilizado para transformar células *E. coli* DH5 α competentes, mediante el método de shock térmico. Las células transformantes fueron seleccionadas en LBamp₅₀XGal₂₅. Nuevamente, el número de colonias azules, correspondientes al plásmido sin inserto, superó el número de colonias blancas, que corresponden al plásmido recombinante. Se seleccionó una colonia blanca y se realizó una minipreparación de ADN plasmídico, luego, éste fue digerido con la enzima Sall para conocer la orientación del inserto en el vector. En la Fig. 21 se muestran las posibles conformaciones de la construcción pBSK- bfr_{34} . Para la conformación *a* se esperaban fragmentos de 700 y 3000 pb, mientras que para la *b* se esperaban

fragmentos de 200 y 3500 pb aproximadamente. El perfil de restricción se muestra en la Fig. 22, confirmando que se obtuvo la conformación *a*.

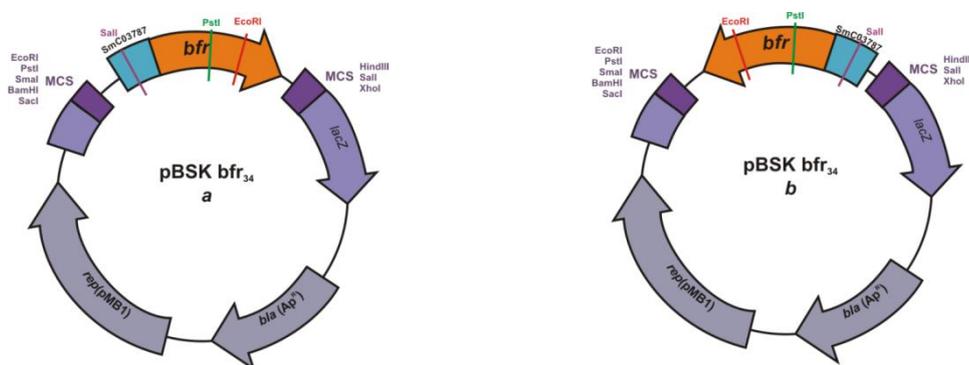


Fig. 21: Posibles productos de la ligación entre el fragmento de amplificación *bfr*₃₄ y el vector pBSK digerido con EcoRV. Para conocer la orientación del inserto en el vector se realizó un perfil de restricción con la enzima Sall. Para la conformación *a* (izquierda) se esperaban fragmentos de 700 y 3000 pb aproximadamente, mientras que para la conformación *b* (derecha) se esperaban fragmentos de 200 y 3500 pb.

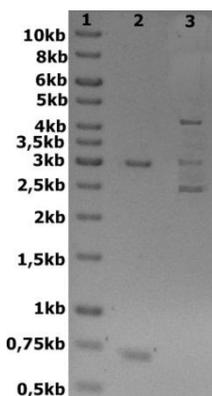


Fig. 22: Gel de agarosa 0,8 % (p/v) en TAE del resultado de la digestión de pBSK-*bfr*₃₄ con la enzima de restricción Sall. El primer carril corresponde al marcador de peso molecular 1Kb DNA ladder; El segundo carril corresponde a la digestión de pBSK-*bfr*₃₄ con Sall, observándose fragmentos de 700 y 3000 pb aproximadamente; El tercer carril corresponde a la construcción pBSK-*bfr*₃₄ sin digerir.

Obtención del plásmido recombinante pBSK-*bfr* Δ

Posteriormente se realizó una PCR inversa en gradiente de temperaturas, empleando los cebadores *bfr*₅ y *bfr*₆ y la construcción pBSK-*bfr*₃₄ como ADN molde. Los controles negativos fueron pBSK como ADN molde y una mezcla de reacción sin la adición de ADN. La realización de una PCR en gradiente de temperaturas permite conocer la temperatura de annealing que resulta en una mayor especificidad y cantidad de producto de amplificación específico en una sola reacción. Las temperaturas de annealing ensayadas fueron 58,3, 56,6, 55,1 y 52,2°C respectivamente. En la Fig. 23 se muestra un esquema donde figuran los sitios teóricos de unión de los cebadores y el amplicón

esperado. En la Fig. 24 se muestra el gel de agarosa 0,8% (p/v) en TAE donde se realizó la corrida electroforética de los productos de amplificación.

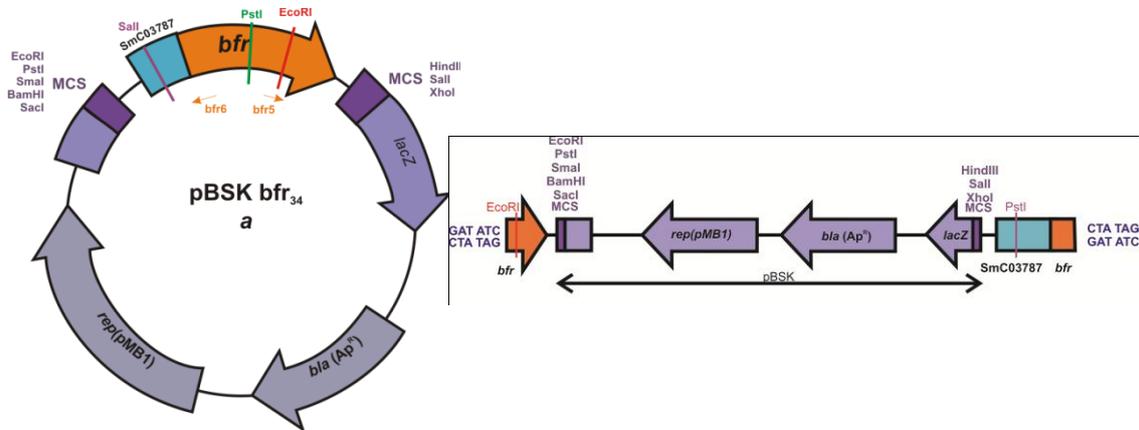


Fig. 23: A la izquierda: esquema de la construcción pBSK-*bfr*₃₄ obtenida donde se muestran los sitios de unión a los cebadores *bfr*₅ y *bfr*₆ con los que se realizó la PCR inversa. A la derecha: Esquema del amplificado esperado, el cual contiene en sus extremos sitios de reconocimiento para la enzima EcoRV (secuencia en azul), los cuales fueron incorporados como secuencias adaptadoras en los cebadores.

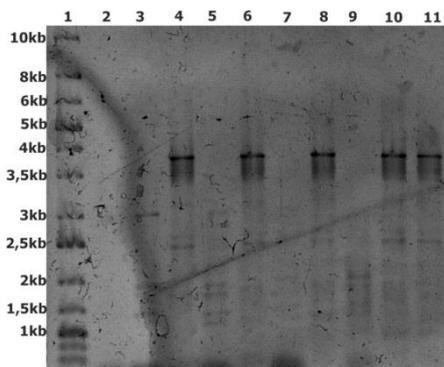


Fig. 24: Gel de electroforesis de agarosa 0,8% (p/v) en TAE, donde se muestran los productos de amplificación obtenidos en la PCR que utilizó los cebadores *bfr*₅ y *bfr*₆, los cuales contienen secuencias adaptadoras que incluyen un sitio de corte para la enzima EcoRV. El ADN utilizado como molde fue la construcción pBSK-*bfr*₃₄. El primer carril corresponde al marcador de peso molecular 1kb DNA ladder. Carril 2: control negativo sin ADN; Carriles 3, 5, 7 y 9: pBSK con temperaturas de annealing de 58,3 °C, 56,6 °C, 55,1 °C y 53,5 °C respectivamente; Carriles 4, 6, 8, 10: molde pBSK-*bfr*₃₄ con temperaturas de annealing de 58,3 °C, 56,6 °C, 55,1 °C y 53,5 °C respectivamente; Carril 11: molde pBSK-*bfr*₃₄ con temperatura de annealing de 52,2 °C. Se observa amplificación específica en todas las reacciones de PCR que usaron como molde la construcción pBSK-*bfr*₃₄, mientras que para los que se usó pBSK se observan bandas inespecíficas.

Una vez purificado el amplificado obtenido, el mismo fue digerido con EcoRV y sometido a una reacción de ligación, dando como resultado la construcción que se esquematiza en la Fig. 25. Dicha construcción, designada pBSK-*bfr* Δ debido a la delección practicada, fue usada para transformar células *E. coli* DH5 α competentes, de la misma forma en que se procedió anteriormente. Se extrajo el ADN plasmídico de las colonias transformantes seleccionadas en el medio LBamp₅₀XGal₂₅ y se sometió a digestión con las enzimas de restricción BamHI y HindIII, las cuales permiten la liberación del inserto, de 700 pb aproximadamente. La Fig. 26 muestra el resultado dicha digestión. Además se realizó una digestión del ADN plasmídico obtenido con la enzima de

restricción Sall, obteniéndose fragmentos de 500 y 3100 pb (ver Fig. 29), confirmando la construcción esquematizada en la Fig. 25.

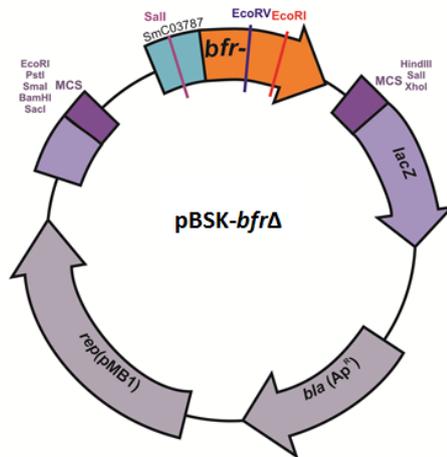


Fig. 25: Esquema de la construcción obtenida mediante autoligación del producto de amplificación pBSK-bfr₅₆. La digestión de esta construcción con las enzimas de restricción BamHI y HindIII permiten la liberación de un inserto de aproximadamente 700 pb.

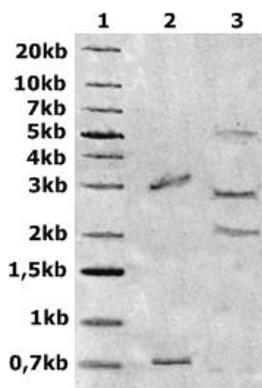


Fig. 26: Gel de electroforesis de agarosa 0,8% (p/v) en TAE, donde se muestran los productos de digestión de pBSK-bfr Δ con las enzimas de restricción BamHI y HindIII. En el primer carril se sembró el marcador de peso molecular 1kb DNA ladder plus; en el segundo carril se sembró el producto de digestión de la construcción pBSK-bfr Δ con BamHI y HindIII, observándose bandas de 700 y 3000 pb aproximadamente; en el tercer carril se sembró el vector pBSK sin digerir.

Obtención de la construcción pBSK-bfr::lacZGm^R

El siguiente paso consistió en la inserción del cassette lacZGmR en el sitio EcoRV de la construcción pBSK-bfr Δ , que actuará como gen reportero bajo el control del promotor nativo del gen *bfr* en el genoma de *S. meliloti* 1021. Este cassette fue obtenido a partir del plásmido pAB2001, digerido con SmaI, la cual genera extremos romos. En la Fig. 27 se muestra un esquema del plásmido pAB2001 y del producto de 4200 pb obtenido mediante su digestión con SmaI. En la Fig. 29 se muestra el gel de agarosa donde se separaron los fragmentos de ADN producto de la digestión de pAB2001 con SmaI. Previo a la ligación se purificaron las bandas producto de las digestiones correspondientes al cassette lacZGm^R (4200 pb) y a pBSK-bfr Δ en su forma lineal (3700 pb). Un esquema de la construcción esperada para el producto de ligación entre el

fragmento obtenido por digestión de pBSK-*bfr* Δ con EcoRV y el cassette *lacZGm^R* se muestra en la Fig 28.

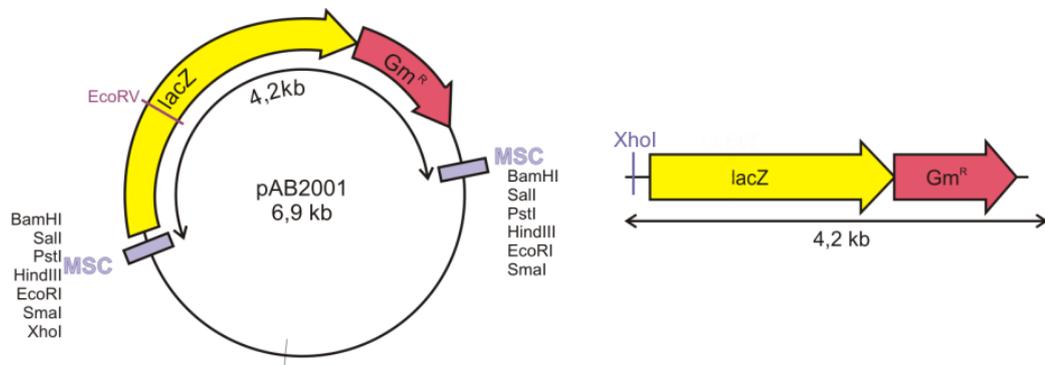


Fig. 27: Esquema del plásmido pAB2001 (izquierda), del cual se extrajo mediante digestión con la enzima de restricción SmaI el cassette *lacZGm^R* (derecha) de 4200 pb. El resultado de dicha digestión se muestra en la Fig. 29.

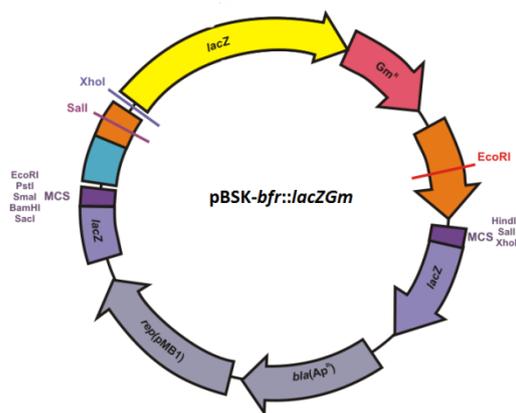


Fig. 28: Esquema de la construcción pBSK-*bfr*::*lacZGm^R*, resultado de la ligación entre el cassette obtenido de pAB2001 y la construcción pBSK-*bfr* Δ digerida con EcoRV. El perfil de restricción de esta construcción con la enzima XhoI mostrado en la Fig. 30 confirma la conformación representada en esta figura.

La orientación del cassette en la construcción fue determinada mediante digestión con la enzima de restricción XhoI, que dio como resultado la generación de fragmentos de 3200 y 4500 pb respectivamente, como se muestra en la Fig. 30. Estos tamaños de fragmentos de ADN eran los esperados para la digestión de la construcción pBSK-*bfr*::*lacZGm^R* con el inserto en la orientación mostrada en la Fig. 28. Dado que el cassette fue insertado en *bfr* en la misma orientación, al inducirse la expresión de *bfr* se expresará el gen reportero *lacZ*, generándose β -galactosidasa.

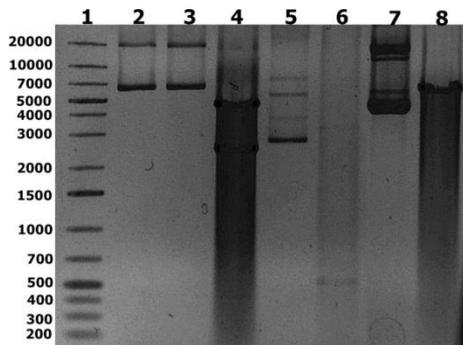


Fig. 29: Gel de agarosa 0,8% (p/v) en TAE, donde se muestran los productos de digestión de los plásmidos pAB2001, pBSK-*bfr*Δ y pK18 con las enzimas de restricción SmaI, Sall y BamHI y HindIII respectivamente. El orden de sembrado fue el siguiente: Carril 1: marcador de peso molecular 1kb DNA ladder plus; Carriles 2 y 3: pAB2001 sin digerir; Carril 4: productos de la digestión de pAB2001 con SmaI. La banda de 4200 pb aproximadamente corresponde al cassette *lacZGm^R*; Carril 5: construcción pBSK-*bfr*Δ; Carril 6: productos de digestión de pBSK-*bfr*Δ con Sall. Esta digestión se realizó para conocer la orientación de *bfr*Δ en el plásmido, correspondiéndose a la mostrada en la Fig. 28; Carril 7: pK18 sin digerir y Carril 8: pK18 digerido con BamHI y HindIII. El vector pK18 será usado para la movilización de la construcción *bfr::lacZGm^R* a *S. meliloti* 1021 mediante conjugación triparental.

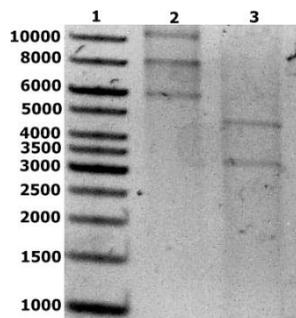


Fig. 30: Gel de agarosa 0,8% (p/v) en TAE donde se muestra en el primer carril el marcador de peso molecular 1kb DNA ladder; Carril 2: pBSK-*bfr::lacZGm^R*; Carril 3: resultado de la digestión de pBSK-*bfr::lacZGm^R* con la enzima XhoI, dando como resultado fragmentos de 3200 y 4500 pb aproximadamente, tal como era esperado para la construcción esquematizada en la Fig. 28.

Hasta el momento no se ha desarrollado ninguna metodología que permita la obtención de células de rizobio competentes aptas para la transformación con eficiencia aceptable. La estrategia que se emplea para introducir plásmidos en rizobios es mediante la conjugación. Esto hace que deban usarse plásmidos conjugativos. El vector pBKS no es un plásmido conjugativo, por lo que es necesario transferir el inserto que contiene la versión mutada del gen *bfr* a un vector adecuado. El plásmido pK18mobsac es un buen candidato para actuar como dador del gen mutado en la conjugación triparental, ya que no es replicable en rizobio y contiene dos elementos que permiten la selección. Uno es un gen de resistencia a Km, y otro es el gen *sacB*, que confiere sensibilidad a la sacarosa (Schäfer, Tauch *et al.*, 1994). Una vez obtenido el alelo *bfr* mutado mediante la inserción del cassette *lacZGm^R*, el mismo fue transferido al vector pK18mobsac. Para ello se digirió la construcción pBSK-*bfr::lacZGm^R* con las enzimas de restricción BamHI y HindIII para la liberación del inserto, y el fragmento correspondiente, de 4800 pb aproximadamente fue purificado a partir de un gel de agarosa 0,8 % (p/v) en TAE. Una vez purificado, dicho

fragmento fue clonado en pK18mobsac previamente digerido con BamHI y HindIII. Las enzimas utilizadas para la liberación del inserto de la construcción pBSK-*bfr::lacZGm^R* y en la linealización de pK18mobsac generan extremos cohesivos, con lo cual la ligación entre el vector y el inserto será unidireccional. Se transformaron células *E. coli* DH5α competentes con el producto de ligación, seleccionando las colonias transformantes en LBKm₅₀Gm₁₀. Se emplearon para la selección estos antibióticos ya que el plásmido pK18mobsac confiere resistencia a Km y el cassette que interrumpe al gen *bfr* en la construcción le da resistencia a Gm a las colonias que fueron transformadas con la construcción pK18-*bfr::lacZGm^R*. En la Fig. 31 se muestra el gel de agarosa 0,8 % (p/v) en TAE donde se realizó la corrida electroforética del ADN plasmídico obtenido de las colonias transformantes, donde se muestran además los fragmentos producto de la digestión de pK18-*bfr::lacZGm^R* con la enzima de restricción EcoRI, para comprobar la orientación del inserto en el vector, esperándose fragmentos de 4600 y 5900 pb respectivamente. En la Fig. 32 se muestra un esquema de la construcción obtenida.

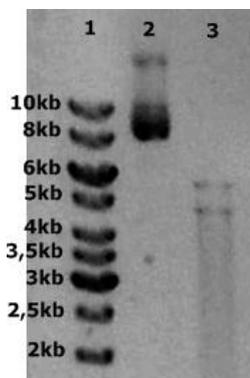


Fig. 31: Gel de agarosa 0,8% (p/v) en TAE, donde se sembró: Carril 1: marcador de peso molecular 1kb DNA ladder; Carril 2: pK18-*bfr::lacZGm^R*; Carril 3: resultado de la digestión de pK18 *bfr::lacZGm^R* con la enzima EcoRI, dando como resultado fragmentos de 4600 y 5900 pb aproximadamente, tal como era esperado para la construcción esquematizada en la Fig. 32.

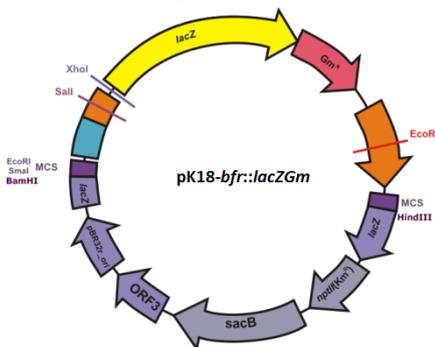


Fig. 32: Esquema de la construcción pK18-*bfr::lacZGm^R*, obtenida mediante ligación del vector pK18mobsac digerido con BamHI y HindIII a la construcción *bfr::lacZGm^R*, obtenida mediante digestión con BamHI y HindIII y purificación a partir de pBSK-*bfr::lacZGm^R*.

La transferencia del alelo mutado *bfr::lacZGm^R* hacia *S. meliloti* 1021 se realizó mediante conjugación triparental, en la que *E. coli* DH5α pK18-*bfr::lacZGm^R* actuó como cepa dadora, *E. coli* DH5α pRK2013 como helper y *S. meliloti* 1021 como aceptora. Las colonias transconjugantes se seleccionaron en TYStp₂₀₀Nm₃₅Gm₅. Las células de *S. meliloti* que adquieran el plásmido y lo incorporen en su genoma serán resistentes a los antibióticos Nm y Gm debido a los genes de resistencia adquiridos, permitiendo la selección de las transconjugantes y eliminando la cepa *S. meliloti* salvaje. La Stp permite eliminar las células de *E. coli*, ya que son sensibles a este antibiótico. La recombinación es posible debido a la presencia de regiones homólogas en el genoma de *S. meliloti* y la construcción pK18-*bfr::lacZGm^R*. El doble evento de recombinación homóloga se seleccionó luego en medio sólido TYStp₁₀₀Gm₅Sac15%, donde se inocularon 2 x 10⁶ u.f.c. de las transconjugantes previamente obtenidas. Debido a la presencia del gen *sacB* en el plásmido pK18 *bfr::lacZGm^R*, las células que lo incorporaron son sensibles a sacarosa. De esta manera, las células que eliminan la región que contiene este gen serán seleccionadas. Esto implica que se revierta la recombinación o que se produzca un doble evento de recombinación. Debido a la presencia de Gm en el medio se espera seleccionar las células en las que ocurrió el doble evento de recombinación homóloga, eliminando las células que revirtieron al genotipo salvaje. Hay que tener en cuenta que pueden aparecer, aunque con muy baja frecuencia, algunas colonias espontáneamente resistentes a Gm. Se obtuvo un muy bajo número de colonias en el medio donde se seleccionó el doble evento de recombinación homóloga. Estas fueron transferidas a medio sólido TYStp₂₀₀Gm₅ y TYStp₂₀₀Nm₁₀₀Gm₅, para eliminar aquellas que expresaran resistencia a Nm, seleccionándose finalmente una colonia que creció en TYSac15%Stp₂₀₀Gm₅ pero no en TYStp₂₀₀Nm₁₀₀Gm₅, indicando que sería sensible a Nm y resistente a Gm, Stp y sacarosa.

Verificación de la mutación obtenida mediante Southern blot

Para confirmar el doble evento de recombinación homóloga se realizó un Southern blot. Para ello se extrajo el ADN genómico de células *S. meliloti* 1021 salvajes y de la colonia obtenida en TYSac15%Stp₂₀₀Gm₅. Posteriormente se sometió el ADN obtenido a una digestión con la enzima de restricción EcoRI, la cual posee sitios de corte dentro de la región que porta la mutación, permitiendo discriminar la ocurrencia de un doble evento de recombinación en oposición a un simple evento o al genotipo salvaje. La sonda utilizada fue

el producto de PCR bfr_{34} , obtenido mediante el empleo de los cebadores bfr_3 y bfr_4 con ADN genómico de *S. meliloti* 1021 como molde. En la Fig. 33 se muestra el sitio de hibridación de la sonda bfr_{34} sobre el ADN genómico de *S. meliloti* salvaje, para la cual se esperaban señales que corresponden a fragmentos de 500 y 1800 pb; para el simple evento esquematizado en la parte superior de la Fig. 34 se esperaban señales de 500, 600, 5800 y 6000 pb; para el simple evento representado en la parte inferior de la misma figura, las señales esperadas luego del revelado eran de 500, 2000, 4500 y 5900 pb; finalmente, para el doble evento de recombinación homóloga, los tamaños de los fragmentos esperados que generan señal eran de 500 y 6000 pb (ver Fig. 35)

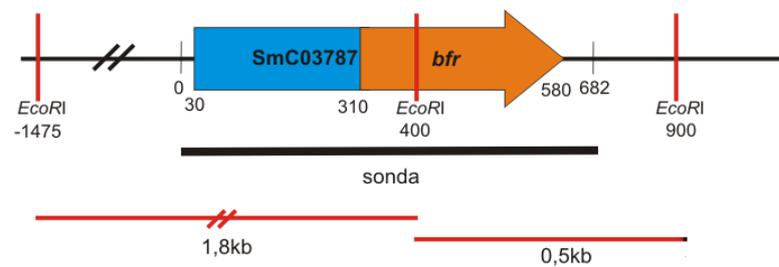
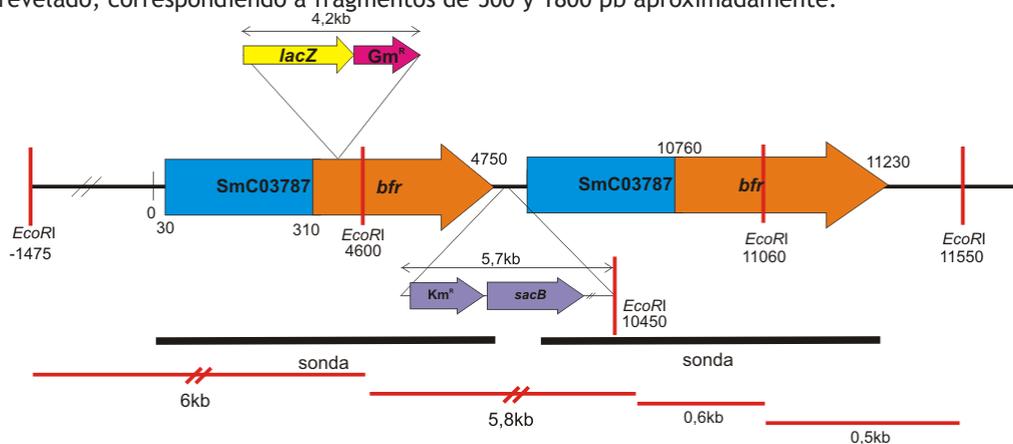


Fig. 33: Esquema que representa el sitio de unión de la sonda al ADN genómico de la cepa *S. meliloti* 1021 salvaje. Se muestran en rojo los sitios de corte para la enzima EcoRI y las señales esperadas luego del revelado, correspondiendo a fragmentos de 500 y 1800 pb aproximadamente.



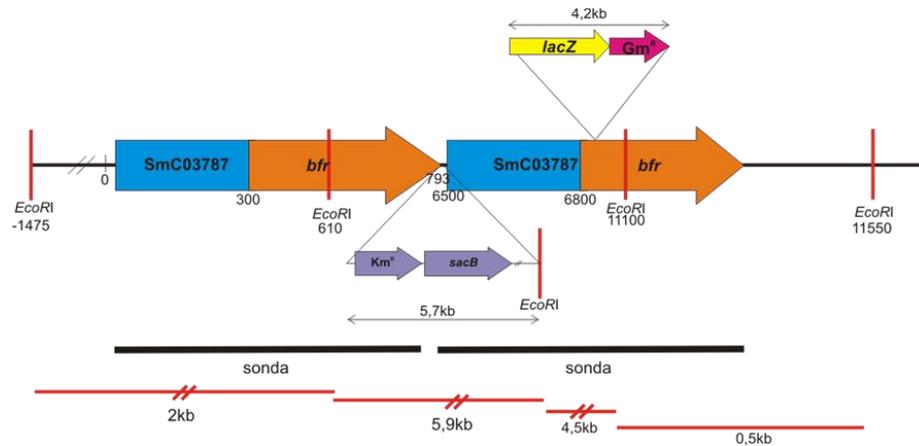


Fig. 34: Esquema que representa las posibles configuraciones del simple evento de recombinación homóloga. Se muestran en negro los sitios de hibridación de la sonda al ADN genómico. Se muestran en rojo los sitios de corte para la enzima *EcoRI* y las señales esperadas luego del revelado. Para la conformación representada arriba se espera que la sonda hibride a los fragmentos de 500, 600, 5800 y 6500 pb. Para la conformación representada abajo, se esperan señales correspondientes a fragmentos de 500, 2500, 4500 y 5900 pb respectivamente.

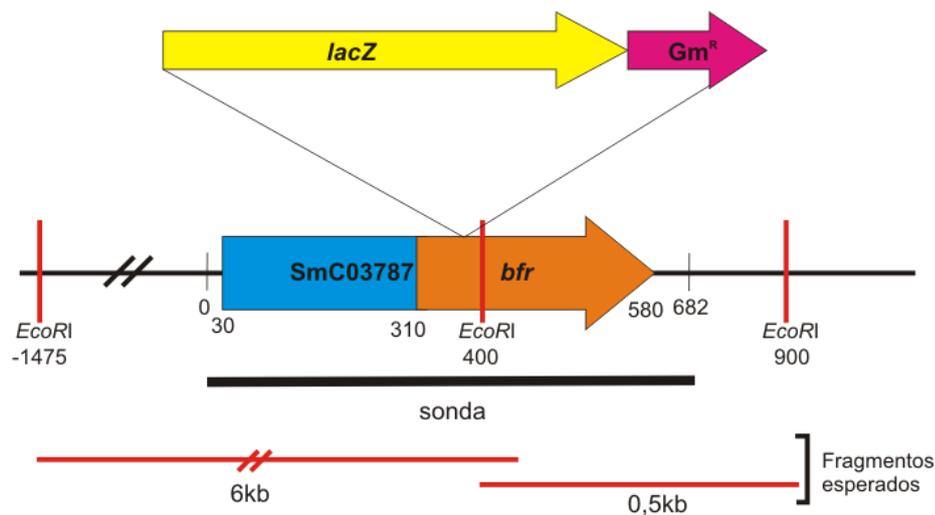


Fig. 35: Esquema que representa el resultado de un doble evento de recombinación homóloga entre el genoma de *S. meliloti* 1021 y el alelo *bfr::lacZGm^R*. El sitio de unión de la sonda al ADN genómico de la cepa se representa en negro. Se muestran en rojo los sitios de corte para la enzima *EcoRI* y las señales esperadas luego del revelado, que corresponden a fragmentos de 500 y 6000 pb aproximadamente.

En la Fig. 36 se muestra los resultados obtenidos del análisis por Southern blot, en el que se ven señales correspondientes a 500, 2000, 5000 y 6000 pb aproximadamente, sugiriendo que la mutante obtenida tiene el perfil característico del simple evento de recombinación representado en la parte inferior de la Fig. 34, en el que el alelo mutado se encuentra corriente abajo con respecto al alelo salvaje.

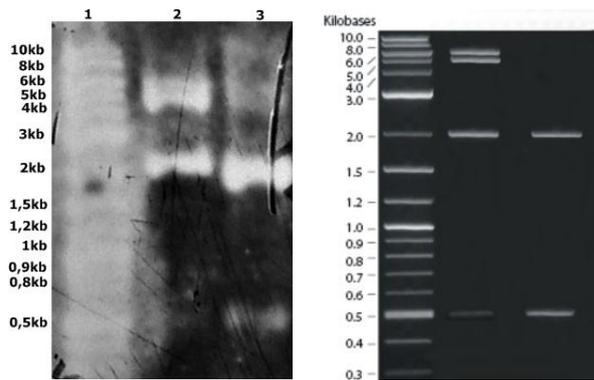


Fig. 36: Resultado de la verificación de la mutante obtenida mediante análisis por Southern blot. Se utilizó como control ADN genómico de la cepa salvaje. A la izquierda se muestra la foto de la placa fotográfica revelada. Debido a la gran cantidad de manchas y señales de ruido observadas en esta foto, en la imagen de la derecha se muestra un esquema que corresponde a una representación más clara de la foto de la izquierda. El primer carril corresponde al marcador de peso molecular log2 DNA ladder prebiotinado. El segundo carril muestra el perfil de la mutante obtenida, el cual se correspondería con las señales esperadas para un simple evento de recombinación, en el que el alelo mutado se encuentra corriente abajo con respecto al alelo salvaje. El tercer carril corresponde al perfil de la cepa salvaje, el cual fue empleado como control.



El hierro constituye un nutriente esencial para casi todos los organismos, formando parte de proteínas involucradas en prácticamente todos los procesos celulares, desde el metabolismo hasta la reproducción. En el caso particular de los rizobios, forma parte de los sitios catalíticos de las enzimas involucradas en el proceso de FBN, Nitrogenasa y Nitrogenasa Reductasa. Estas enzimas son expresadas durante la fase de vida endosimbiótica de estos organismos, aumentando en varios órdenes la demanda de hierro. Hasta el presente se desconoce cómo es que se satisface esta demanda durante la simbiosis rizobio-leguminosa. La hipótesis planteada en este trabajo supone el rol de proteínas de almacenamiento de hierro como fuente del metal durante la simbiosis en el modelo *S. meliloti* 1021-alfalfa.

La disponibilidad de la secuencia genómica completa de *S. meliloti* 1021 hizo posible la realización de estudios bioinformáticos, utilizándose herramientas de uso público para identificar y caracterizar la presencia de posibles genes que codifiquen para proteínas de almacenamiento de hierro en esta bacteria. Se realizó primero una búsqueda en el genoma traducido de *S. meliloti* 1021 de secuencias homólogas a las de proteínas de almacenamiento de hierro Bacterioferritina, Ferritina Bacteriana y Dps presentes en diferentes bacterias, relacionadas y no relacionadas a *S. meliloti*. Cabe resaltar que no todas las secuencias elegidas corresponden a proteínas de función demostrada, como es el caso de la posible bacterioferritina de *R. etli*. A partir de este análisis se identificaron sólo secuencias homólogas con bacterioferritinas, sugiriendo que ésta sería la única proteína de almacenamiento de hierro codificada por este rizobio. Un rasgo común en los microorganismos es que se dé la presencia de más de una de las proteínas de almacenamiento de hierro. Ejemplos de ello son *E. coli* (Ftn, Bfr y Dps), *P. aeruginosa* (Ftn y Bfr), *C. jejuni* (Ftn y Dps), *B. abortus* (Ftn y Bfr), entre otros (Smith, 2004). Los E-values encontrados para cada comparación fueron

del orden de 10^{-38} para KPK_0396, PPUBIRD1_1132 y ECK3323 (correspondientes a las bacterioferritinas de *K. pneumoniae* 343, *P. putida* BIRD-1 y *E. coli* K12 MG1655 respectivamente) y, mientras que para RHECIAT_CH0004371 (correspondiente a *R. etli* CIAT 894) éste fue del orden de 10^{-86} . Por otra parte, los porcentajes de identidad y los scores demostraron el mismo patrón, lo cual es esperable debido a la estrecha relación filogenética entre *S. meliloti* y *R. etli*. Todos los hits llevaron al hallazgo del ORF SMc03786 (*bfr*), que codificaría una proteína de 161 aminoácidos y está ubicado en la hebra (-) del cromosoma de *S. meliloti* 1021, parcialmente solapado por el ORF SMc03787, que codificaría una proteína conservada hipotética de 103 aminoácidos. Tanto *bfr* como el ORF SMc03787 se encuentran en el mismo marco de lectura. El modelado de la proteína dio como resultado una estructura altamente conservada con la de otras proteínas tipo ferritina, presentado las cuatro hélices características del ramillete y el lazo conector que atraviesa su longitud. Al realizar la búsqueda de dominios conservados sobre la secuencia aminoacídica de Bfr, se identificó la presencia del posible centro ferroxidasa y del poro ferroxidasa, así como la metionina 52 responsable de la unión a hemo (Rev. por: Le Brun, Crow *et al.*, 2010). Por otra parte los dominios donde se encuentran estos residuos se encuentran altamente conservados. También se realizó la búsqueda de dominios conservados de la proteína hipotética codificada por SMc03787, indicando que pertenece a la superfamilia de Ferredoxinas Asociadas a Bacterioferritinas (Bfd). En muchos organismos es frecuente la localización contigua de los genes *bfd* y *bfr*, y ha sido demostrada su co-transcripción en *Yersinia pestis*, *E. coli* y *Erwinia chrysanthemi* (Rev. por: Chen, Bleam *et al.*, 2010). En *P. aureginosa* se demostró que la expresión de Bfd aumenta 200 veces en condiciones limitantes de hierro y que se une específicamente a Bfr, sugiriendo que mediaría la movilización del metal desde el núcleo mineral de Bfr (Weeratunga, Gee *et al.*, 2009). En el caso de *S. meliloti* 1021, el alineamiento de la secuencia del SMc03787 no indica una homología suficiente como para su anotación como *bfd*.

Para evaluar la función del gen identificado como *bfr* en *S. meliloti* 1021, nos propusimos en este trabajo construir una mutante carente en Bfr que permitiera luego comparar los fenotipos de la cepa salvaje y de la cepa mutante. Se eligieron dos estrategias diferentes a fin de construir dos tipos de mutantes. En una de ellas la propuesta era reemplazar el gen salvaje por un

gen donde se habría deletado la región central sin afectar el marco de lectura. La estrategia de realizar mutaciones apolares es muy útil en la construcción de mutaciones en genes que forman parte de un operón, ya que éstas no afectan la expresión de genes ubicados corrientes abajo. En este caso, esta propiedad no sería tan relevante ya que no se encontrarían genes cercanos codificados en la misma hebra corriente abajo.

La otra estrategia elegida consistió en reemplazar el gen salvaje por un cassette que contenía al gen reportero *lacZ* y el marcador de selección Gm^R . El uso del cassette *lacZGm^R* interrumpiendo la secuencia codificante de *bfr* tiene un propósito dual, ya que permite la selección de las células portadoras de la fusión génica debido a la resistencia a Gm adquirida, y permite la realización de ensayos de expresión del gen interrumpido, debido a la presencia del gen reportero *lacZ*. Este gen codifica una β -galactosidasa funcional, que carece de promotor pero sí contiene un sitio de unión al ribosoma. De esta manera, su expresión estará controlada por el promotor nativo del gen interrumpido por el cassette. El cassette *lacZGm^R* ha sido usado con éxito para la mutagénesis y estudios de expresión de genes en *S. meliloti* (Becker, Schmidt *et al.*, 1995).

Las metodologías empleadas para construir las mutantes se basaron principalmente en reacciones de amplificación por PCR, utilizando cebadores diseñados específicamente para la tarea, reacciones de ligación, transferencia de material genético de una bacteria a otra y selección de eventos de recombinación.

La PCR realizada a partir de ADN genómico de *S. meliloti* con los cebadores *bfr₁* y *bfr₂* resultó en la amplificación específica de un fragmento de aproximadamente 2600 pb, y la separación electroforética de los productos de PCR obtenidos no demostró la presencia de bandas de diferente peso molecular al esperado, correspondientes a productos de amplificación inespecífica. Este no fue el caso para la PCR realizada a partir de la construcción pBSK-*bfr₁₂* como ADN molde con los cebadores *bfr₃* y *bfr₄*, en el que se obtuvieron bandas correspondientes a fragmentos de longitud diferente al esperado, además del fragmento específico de aproximadamente 900 pb. Estos fragmentos productos de amplificación inespecífica fueron observados también en la reacción que utilizó el plásmido pBSK como ADN molde, sugiriendo que se deben a la unión inespecífica de los cebadores al

vector. La intensidad de las bandas correspondientes a los productos de amplificación esperados resultó ser mucho mayor que las bandas correspondientes a los productos de amplificación inespecífica, lo cual indica que los cebadores utilizados son eficientes para la tarea bajo las condiciones ensayadas.

Para la construcción de la mutante apolar se realizó una PCR inversa. En esta técnica, los cebadores están orientados de tal manera que la extensión se produce hacia afuera de la región determinada por sus sitios de unión, permitiendo la amplificación de las regiones flanqueantes a los mismos. Esta técnica tiene múltiples aplicaciones, ya que no es necesario conocer la secuencia de las regiones que flanquean los cebadores, por lo que puede ser usado, por ejemplo, para determinar en qué región del genoma se inserta un transposón en una mutagénesis generalizada (Ochman, Gerber *et al.*, 1988). En el caso de este trabajo, los cebadores utilizados fueron diseñados para la eliminación de la región de ADN determinada por los sitios de unión de los cebadores. Esto permitió la eliminación de una región de 216 pb en la secuencia codificante de *bfr* sobre la construcción pBSK-*bfr*₃₄, y la obtención del amplicón pBSK-*bfr*₅₆, que luego de su digestión y autoligación dio lugar a la construcción pBSK-*bfr* Δ . Dado que el número de pb eliminado es múltiple de tres se mantiene el marco de lectura, generándose una mutación apolar por deleción.

La PCR inversa realizada a partir de la construcción pBSK-*bfr*₃₄ utilizando los cebadores *bfr*₅ y *bfr*₆ se realizó en gradiente de temperaturas de annealing para determinar cuáles permitieran una amplificación más eficiente y específica. El resultado mostrado en la Fig. 24 demostró la presencia de bandas producto de amplificación inespecífica bajo todas las temperaturas de annealing ensayadas, que al igual a lo ocurrido en la amplificación del fragmento *bfr*₃₄, podrían deberse a la hibridación inespecífica de los cebadores al vector.

Existen varias estrategias para aumentar la especificidad de las reacciones de PCR. Por ejemplo, cambios en la mezcla de reacción pueden hacer más difícil la unión inespecífica de los cebadores al ADN molde, incluyendo la adición de glicerol, formamida o DMSO, bajar la concentración de cebadores o de dNTPs. También pueden realizarse cambios en la temperatura de annealing o en la duración de los ciclos de annealing y extensión, ya que mayores temperaturas

y menores tiempos de annealing y extensión confieren una mayor especificidad. Una reducción en el número de ciclos también puede dar como resultado una mejor especificidad en las reacciones de amplificación por PCR (Rev. por Cha y Thilly, 1993). En este trabajo se utilizaron las condiciones sugeridas por los fabricantes de la polimerasa utilizada, variando únicamente los parámetros inherentes a los ciclos de las reacciones de PCR realizadas. De todas formas, aunque había fragmentos producto de amplificación inespecífica, siempre se obtuvo cantidad suficiente del amplicón esperado como para purificar a partir del gel y realizar las construcciones deseadas.

En ninguno de los casos se constató la presencia de productos de amplificación en los controles negativos, en los que no se agregó ADN a la mezcla de reacción, indicando que la contaminación no se debe a la presencia de moléculas de ADN contaminantes que actuaran como molde.

Aun en los casos en que se obtuvo una banda única, se realizó una purificación a partir de los geles de agarosa de las bandas de interés, ya que, aunque no pudieran visualizarse, podrían haber fragmentos de ADN contaminantes presentes en una concentración por debajo del límite de detección de la tinción con el agente intercalante bromuro de etidio, utilizado para el revelado.

Una vez purificados, los productos de PCR bfr_{12} y bfr_{34} fueron clonados, mediante tratamiento con la enzima T4 ADN ligasa, en el sitio EcoRV del vector pBSK. Esto fue posible debido a que tanto la polimerasa como la enzima de restricción empleadas generan extremos romos. Como se explicó anteriormente, los productos de estas ligaciones fueron usados para transformar células DH5 α competentes, mediante el método de shock térmico, y las colonias transformantes fueron seleccionadas en LB suplementado con Amp y X-Gal. Esto permitió distinguir entre las colonias portadoras del plásmido recombinante de las que contienen el pBSK sin inserto, debido a la imposibilidad de las primeras de llevar a cabo la α -complementación, por la presencia del inserto interrumpiendo a *lacZ*. Esto fue comprobado mediante el análisis de los perfiles de restricción del ADN plasmídico obtenido de colonias blancas y azules respectivamente. Si bien la eficiencia de las transformaciones fue alta, dado el gran número de colonias obtenidas en el medio selectivo empleado, la proporción entre el número de colonias blancas con respecto a las azules obtenidas resultó ser muy bajo.

Esto se debió a una baja eficiencia en las ligaciones entre inserto y vector, obteniéndose una mayor proporción de autoligaciones del vector. Una estrategia para aumentar el número de colonias transformadas con el plásmido recombinante es la utilización de dos enzimas de restricción diferentes para las digestiones del inserto y del vector, que generen extremos cohesivos. Esto aumentará la eficiencia de la ligación deseada y a su vez la clonación será unidireccional. Con tal finalidad se podrían diseñar cebadores que incluyan en sus extremos sitios de restricción de enzimas elegidas.

Para la construcción de la mutante apolar se insertó en la región codificante de *bfr* un cassette conteniendo un marcador de resistencia a antibiótico y un gen reportero. La inactivación de secuencias codificantes mediante la inserción de marcadores de resistencia a antibióticos en una estrategia muy usada para la construcción de mutaciones. La adición de una fusión transcripcional permite el estudio de la expresión del gen interrumpido por la secuencia insertada en el gen de interés. En este trabajo se utilizó el cassette *lacZGm^R*, obtenido mediante digestión a partir del plásmido pAB2001, el cual fue clonado en el sitio EcoRV de la construcción pBSK-*bfr*Δ, generando la construcción pBSK-*bfr*::*lacZGm^R*. Esto fue posible ya que tanto las enzimas EcoRV como SmaI, utilizadas para la linealización de pBSK-*bfr*Δ y para la liberación del cassette *lacZGm^R* respectivamente, generan extremos romos. Esto supone un inconveniente, ya que la ligación de fragmentos de extremos romos permite que la clonación sea bidireccional, y para la acción de *lacZ* como gen reportero es necesario que se encuentre en la misma orientación que el gen interrumpido. Por esta razón se realizó una comprobación de la orientación del cassette en la construcción mediante perfiles de restricción, seleccionándose la construcción apropiada para su propósito.

Para la transferencia de la versión alélica *bfr*::*lacZGm^R* desde *E. coli* a *S. meliloti* 1021 se realizó una conjugación triparental. Esto implica la utilización de un sistema de plásmidos que permitan la transferencia génica hacia la cepa aceptora. Se ha descrito que esta técnica facilita el intercambio alélico en organismos en los que los métodos de transformación no son efectivos, como por ejemplo *S. meliloti* (Ditta, Stanfield *et al.*, 1980). El sistema utilizado en este trabajo implicó el uso del plásmido pK18*mobsacB* como vehículo de transferencia de la mutación y el plásmido pRK2013 como helper. El plásmido pK18 y su análogo pK19 son derivados del plásmido

pBR322, basados en el replicón pMB1 y su rango de huésped se restringe a *E. coli*, de donde puede aislarse en un gran número de copias. Poseen el origen de transferencia *oriT*, que permite su movilización por conjugación y el origen de replicación *oriV*. Además contienen el marcador de selección que confiere resistencia a Km (Schäfer, Tauch *et al.*, 1994). El vector utilizado, pK18*mobsacB*, contiene además una versión recombinante del gen *sacB*, que codifica una levansacarosasa (sacarosa 2,6-P-D-fructo 6-3-D-fructosil transferasa), una enzima de 50 kDa que es secretada por *Bacillus subtilis* luego de su inducción con sacarosa. Esta enzima cataliza la transfructurización desde la sacarosa hacia varios sustratos, resultando en la síntesis de levano y la hidrólisis de la sacarosa. Se ha descubierto que la presencia de levansacarosa en *S. meliloti* es letal en presencia concentraciones desde 5% de sacarosa en medio sólido, causando lisis celular o inhibición del crecimiento (Gay, Le Coq *et al.*, 1985). El plásmido pRK2013 se ha utilizado con éxito como helper en conjugaciones triparentales, ya que posee los genes *tra* necesarios para permitir la movilización del vector que contiene el sitio *mob* (en este caso portador de la variante alélica) a la cepa aceptora, además no se mantiene de forma estable en *S. meliloti* (Ditta, Stanfield *et al.*, 1980). Las células de *S. meliloti* que recibieron la construcción pK18-*bfr::lacZGm^R* y lo incorporaron en su genoma fueron seleccionadas en el medio TYStp₂₀₀Nm₁₀₀. Esto fue posible debido la presencia de homología en la construcción *bfr::lacZGm^R* con el gen *bfr* y parte del ORF SMc03787 de *S. meliloti*, permitiendo que ocurra un evento de recombinación homóloga, en la que el vector pK18-*bfr::lacZGm^R* es insertado en su totalidad en el genoma. Así se obtienen mutantes de *S. meliloti* capaces de crecer en presencia de Stp, Nm y Gm, portadoras de dos alelos del gen *bfr*: el salvaje y la versión mutada introducida. Durante el evento de recombinación homóloga existen dos posibilidades en cuanto a la disposición de los alelos con respecto al promotor, que ocurren bajo la misma frecuencia: en una de ellas, la recombinación ocurrió en un sitio de pK18-*bfr::lacZGm^R* situando antes de la inserción; la otra posibilidad implica la recombinación en una zona posterior a la inserción del cassette. En el primer caso se obtiene una mutante *S. meliloti* en la que la versión alélica interrumpida por el cassette se encuentra próxima al promotor, corriente arriba con respecto a la versión salvaje. La ocurrencia de este simple evento de recombinación homóloga puede ser útil para la realización de análisis de expresión de *bfr*, ya que la versión alélica portadora

del gen reportero se encuentra bajo el control del promotor nativo de *bfr*. La otra conformación posible no es útil para este propósito, ya que el gen reportero no se encuentra bajo el promotor del gen de interés. Dado que para los dos casos posibles las mutantes generadas contendrán los mismos marcadores de selección, no es posible su selección en cuanto a resistencia o sensibilidad a antibióticos. Por otro lado, los productos de PCR obtenidos con los cebadores *bfr*₃ y *bfr*₄ tampoco permitirán diferenciar entre ambos genotipos. En la realización de este trabajo se pretendió obtener una mutante en la que sólo estuviera presente el alelo *bfr::lacZGm^R*. Para esto se realizó una selección del doble evento de recombinación homóloga en el medio TYSac15%Stp₂₀₀Gm₅. La presencia del plásmido pK18 integrado en el genoma de *S. meliloti* contiene el gen *sacB* y el gen de resistencia a Nm, por lo que las colonias resultantes de un doble evento de recombinación deberán ser resistentes a sacarosa y sensibles a Nm. Este segundo evento de recombinación homóloga lleva a dos posibilidades: retorno al genotipo salvaje o reemplazo del gen. La presencia del marcador de resistencia a Gm en el cassette permite seleccionar positivamente a las células resistentes a Gm, eliminando las salvajes.

La verificación de la mutación realizada sobre la colonia seleccionada debido a que no creció en TYStp₂₀₀Nm₁₀₀Gm₅, pero sí en TYSac15%Stp₂₀₀Gm₅, se realizó mediante la técnica de Southern blot. Este método, desarrollado por E. M. Southern, permite la visualización de fragmentos de restricción específicos capaces de hibridar con una sonda de ADN o ARN marcada y su posterior revelado por autoradiografía. (Southern, 1975; Rev. por: Ausubel, 1987; Sambrook, Fritsch *et al.*, 1989). El resultado obtenido mediante el análisis de Southern blot indicó que la mutación que se obtuvo corresponde a un simple evento de recombinación homóloga entre la construcción pK18-*bfr::lacZGm^R* y el genoma de *S. meliloti* 1021, en el que la versión alélica correspondiente al gen *bfr* interrumpido por el cassette reportero se encuentra corriente abajo con respecto al gen salvaje (ver Fig. 34). Como se explicó anteriormente, esta mutación no es útil para el propósito de medir la expresión de *bfr*. El hecho de que la mutante obtenida no creció en el medio ensayado TYStp₂₀₀Gm₅Nm₁₀₀ no concuerda con el resultado obtenido en la verificación de la mutación.

Las dificultades encontradas en la obtención de un doble evento de recombinación pueden deberse a la presencia de motivos estructurales en el

ADN que dificulten la recombinación. Por otro lado, al ser la Bfr la única proteína de almacenamiento de hierro en *S. meliloti*, su carencia puede tener consecuencias altamente deletéreas para las células, en las condiciones en las que se realizó el experimento, por lo que el crecimiento se vería afectado en las mutantes que sufrieron reemplazamiento génico.

PERSPECTIVAS

La metodología utilizada en este trabajo para la obtención de mutantes dirigidas ha sido empleada con éxito por otros investigadores, permitiendo conocer el rol fisiológico del producto del gen de interés mediante análisis fenotípicos. Dado que el rol fisiológico de la bacterioferritina es variable entre diferentes organismos, la generación de mutantes es imprescindible para la adjudicación de su función. Debido a los resultados de los análisis *in silico* realizados, en los que no se encontraron secuencias codificantes de otras proteínas de almacenamiento de hierro, puede inferirse su rol como fuente intracelular de hierro bajo condiciones limitantes del metal, pero para confirmarlo es necesaria la realización de análisis fenotípicos sobre una mutante que carezca del gen *bfr* funcional. Por esta razón se hace necesario mejorar la estrategia de obtención de la mutación, optimizándose los procedimientos de selección del doble evento de recombinación, tomando como material de partida las construcciones logradas en este trabajo. Por ejemplo, se podría ensayar seleccionar los clones recombinantes en presencia de mayores concentraciones de sacarosa a fin de inhibir completamente el crecimiento de las colonias portadoras de gen *sacB*. También se podría intentar seleccionar la mutante en medios con diferente disponibilidad de hierro en caso que la mutación sea deletérea para el crecimiento de la cepa en presencia de hierro debido quizás a un exceso de estrés oxidativo.

Un aspecto interesante a analizar una vez obtenida la mutante de interés es cómo se controla la expresión de *bfr*. Como se explicó en la introducción, los reguladores globales de la homeostasis del hierro en rizobios son Irr y RirA. Análisis *in silico* demostraron la presencia de sitios IRO e ICE en el operón *bfd-bfr*, sugiriendo que ambos reguladores están involucrados en su expresión (Rodionov, Gelfand *et al.*, 2006; Johnston, Todd *et al.*, 2007). A partir de análisis del transcriptoma de la mutante *R. leguminosarum* RirA, en la que los sistemas de adquisición de hierro están desregulados, se encontró que la expresión de *bfd-bfr* aumenta significativamente tanto en la mutante como en la cepa salvaje bajo condiciones limitantes de hierro (Chao, Buhrmester *et al.*, 2005). Estos resultados indican que al igual que con los genes involucrados en la captación de hierro, RirA participaría en la represión de *bfr* en condiciones de suficiencia de hierro. En cuanto al regulador Irr, hasta el momento se desconoce su función en *S. meliloti*. Nuestro grupo ha obtenido una mutante donde se ha deletado el gen *irr*, pero hasta el momento no se ha

observado un fenotipo diferencial con respecto a la cepa salvaje. Para conocer cómo afecta Irr la expresión de *bfr* bajo diferentes condiciones de disponibilidad de hierro, se propuso la construcción de la doble mutante *S. meliloti* Irr *bfr::lacZGm^R*, en cuya obtención se está trabajando actualmente.

Otro aspecto a ser analizado es la función de Bfr en el establecimiento de una simbiosis efectiva de la mutante *S. meliloti* Bfr- con su leguminosa hospedera *Medicago sativa*, para lo cual se hacen necesarios estudios *in planta*. Estudios del transcriptoma durante la simbiosis indican que la expresión de *bfr* disminuye significativamente en esta etapa (Ampe, Kiss *et al.* 2003). Una vez construidas las mutantes carentes de Bfr, éstas se usarán para inocular plantas crecidas en medios sin el agregado de fuentes nitrogenadas para favorecer el proceso de fijación biológica de nitrógeno. El fenotipo simbiótico se comparará con el de plantas inoculadas con la cepa salvaje en cuanto a la formación y morfología de los nódulos (presencia de leghemoglobina, tamaño, número), promoción del crecimiento vegetal y medidas de actividad nitrogenasa.

ANEXO

Composición de medios utilizados:

LB

Bactotriptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agua desionizada	csp 1000 ml

TY

Triptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
CaCl ₂ anhidro 2,5%	2 ml
Agua desionizada	1000 ml

Soluciones utilizadas:

Solución I para minipreparación de ADN plasmídico

- 50 mM glucosa
- 25 mM Tris.Cl (pH 8)
- 10 mM EDTA

Esterilizar por autoclave.

Guardar a 4°C.

Solución II para minipreparación de ADN plasmídico

- 0,2 N NaOH
- 1% SDS

Utilizar la solución recién preparada.

Solución III para minipreparación de ADN plasmídico

- Acetato de potasio 5 M 60 ml

- Ácido acético glacial 11.5 ml
- H₂O 28.5 ml

Solución de depurinificación para transferencia:

- HCl 0,25N

Solución neutralizante para transferencia:

- NaCl 1,5M; Tris-HCl 1M; pH 7,5

Solución desnaturalizante para transferencia

- NaCl 1,5M; NaOH 0,5N

Buffer T₁₀E₂₅:

- Tris 10mM; EDTA 25mM; pH 8

Buffer de transferencia (SSC 10x):

- NaCl 1,5M; citrato de sodio 0,15M; pH 7

Buffer de electroforesis (TAE 1x)

- Tris-acetato 0,04M
- EDTA 0,01M

Abreviaturas utilizadas

Amp	Ampicilina
EDTA	ácido etilendiamino tetra-acético
Gm	Gentamicina
kb	kilo pares de bases
Km	Kanamina
LB	Luria-Bertani
Nm	Neomicina
pb	pares de bases
Rev.	revisado
Sac	sacarosa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
Stp	Streptomicina
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
TY	Tryptone Yeast extract medium
UV	Ultravioleta
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido



- Abdul-Tehrani, H., A. J. Hudson, *et al.* (1999). "Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and *fur* mutants are iron deficient." Journal of Bacteriology **181**(5): 1415-1428.
- Almirón, M., A. J. Link, *et al.* (1992). "A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*." Genes & Development **6**(12b): 2646-2654.
- Almirón, M. y R. A. Ugalde (2010). "Iron homeostasis in *Brucella abortus*: the role of bacterioferritin." The Journal of Microbiology **48**(5): 668-673.
- Alting-Mees, M. A. y J. M. Short (1989). "pBluescript II: gene mapping vectors." Nucleic Acids Research **17**(22): 9494.
- Amarelle, V., M. R. O'Brian, *et al.* (2008). "ShmR is essential for utilization of heme as a nutritional iron source in *Sinorhizobium meliloti*." Applied and Environmental Microbiology **74**(20): 6473-6475.
- Ampe, F., E. Kiss, *et al.* (2003). "Transcriptome analysis of *Sinorhizobium meliloti* during symbiosis." Genome Biology **4**(2): R15.
- Andrews, S. C. (1998). "Iron storage in bacteria." Advances in Microbial Physiology **40**: 281-351.
- Andrews, S. C. (2010). "The Ferritin-like superfamily: Evolution of the biological iron storeman from a rubrerythrin-like ancestor." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects **1800**(8): 691-705.
- Andrews, S. C., A. K. Robinson, *et al.* (2003). "Bacterial iron homeostasis." FEMS Microbiology Reviews **27**(2-3): 215-237.
- Archibald, F. (1983). "*Lactobacillus plantarum*, an organism not requiring iron." FEMS Microbiology Letters **19**(1): 29-32.
- Ausubel, F. M. (1987). Current protocols in molecular biology. New York, Published by Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience : J. Wiley.

- Battistoni, F., R. Platero, *et al.* (2002). "Identification of an iron-regulated, hemin-binding outer membrane protein in *Sinorhizobium meliloti*." Applied and Environmental Microbiology **68**(12): 5877-5881.
- Becker, A., M. Schmidt, *et al.* (1995). "New gentamicin-resistance and *lacZ* promoter-probe cassettes suitable for insertion mutagenesis and generation of transcriptional fusions." Gene **162**(1): 37-39.
- Briat, J. F. (1992). "Iron assimilation and storage in prokaryotes." Journal of General Microbiology **138**(12): 2475-2483.
- Bwringler, J. E. (1974). "R Factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*." Journal of General Microbiology **84**(1): 188-198.
- Carrondo, M. A. (2003). "Ferritins, iron uptake and storage from the bacterioferritin viewpoint." EMBO J **22**(9): 1959-1968.
- Cescau, S., H. Cwerman, *et al.* (2007). "Heme acquisition by hemophores." Biometals **20**(3): 603-613.
- Cline, J., J. C. Braman, *et al.* (1996). "PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases." Nucleic Acids Research **24**(18): 3546-3551.
- Crichton, R. R.y J. R. Boelaert (2001). Inorganic biochemistry of iron metabolism : from molecular mechanisms to clinical consequences. Chichester, Wiley.
- Crichton, R. R.y J. P. Declercq (2010). "X-ray structures of ferritins and related proteins." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects **1800**(8): 706-718.
- Cha, R. S.y W. G. Thilly (1993). "Specificity, efficiency, and fidelity of PCR." Genome Research **3**(3): S18-S29.
- Chao, T. C., J. Buhrmester, *et al.* (2005). "Role of the Regulatory Gene *rirA* in the Transcriptional Response of *Sinorhizobium meliloti* to Iron Limitation." Applied and Environmental Microbiology **71**(10): 5969-5982.
- Chen, S., W. F. Bleam, *et al.* (2010). "Molecular analysis of two bacterioferritin genes, *bfra* and *bfrB*, in the model rhizobacterium *Pseudomonas putida* KT2440." Applied and Environmental Microbiology **76**(16): 5335-5343.
- Chiancone, E.y P. Ceci (2010). "The multifaceted capacity of Dps proteins to combat bacterial stress conditions: Detoxification of iron and hydrogen peroxide and DNA binding." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects **1800**(8): 798-805.
- Ditta, G., S. Stanfield, *et al.* (1980). "Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*." Proceedings of the National Academy of Sciences **77**(12): 7347-7351.

- Dixon, R.y D. Kahn (2004). "Genetic regulation of biological nitrogen fixation." Nature Reviews Microbiology **2**(8): 621-631.
- Donadio, S., P. Monciardini, *et al.* (2007). "Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics." Natural Product Reports **24**(5): 1073-1109.
- Douglas, H. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." Journal of Molecular Biology **166**(4): 557-580.
- Flitter, W., D. A. Rowley, *et al.* (1983). "Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts: What is the physiological iron chelator?" FEBS Letters **158**(2): 310-312.
- Galibert, F., T. M. Finan, *et al.* (2001). "The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*." Science **293**(5530): 668-672.
- Gay, P., D. Le Coq, *et al.* (1985). "Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria." Journal of Bacteriology **164**(2): 918-921.
- Gruber, N.y J. N. Galloway (2008). "An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle." Nature **451**(7176): 293-296.
- Haber, F.y J. Weiss (1934). "The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts." Proceedings of the Royal Society of London. Series A - Mathematical and Physical Sciences **147**(861): 332-351.
- Harrison, P. M.y P. Arosio (1996). "The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation." Biochimica et Biophysica Acta **1275**(3): 161-203.
- Hu, Y.y M. W. Ribbe (2011). "Biosynthesis of the metalloclusters of molybdenum nitrogenase." Microbiology and Molecular Biology Reviews **75**(4): 664-677.
- Johnston, A. W., J. D. Todd, *et al.* (2007). "Living without Fur: the subtlety and complexity of iron-responsive gene regulation in the symbiotic bacterium *Rhizobium* and other alpha-proteobacteria." Biometals **20**(3-4): 501-511.
- Keren, N., R. Aurora, *et al.* (2004). "Critical roles of bacterioferritins in iron storage and proliferation of Cyanobacteria." Plant Physiology **135**(3): 1666-1673.
- Langley, K. E., M. R. Villarejo, *et al.* (1975). "Molecular basis of beta-galactosidase alpha-complementation." Proceedings of the National Academy of Sciences U S A **72**(4): 1254-1257.
- Le Brun, N. E., A. Crow, *et al.* (2010). "Iron core mineralisation in prokaryotic ferritins." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects **1800**(8): 732-744.

- Long, S. R. (1996). "Rhizobium symbiosis: nod factors in perspective." Plant Cell **8**(10): 1885-1898.
- Long, S. R. (2001). "Genes and Signals in the Rhizobium-Legume Symbiosis." Plant Physiology **125**(1): 69-72.
- Lynch, D., J. O'Brien, *et al.* (2001). "Genetic organization of the region encoding regulation, biosynthesis, and transport of Rhizobactin 1021, a siderophore produced by *Sinorhizobium meliloti*." Journal of Bacteriology **183**(8): 2576-2585.
- Masson-Boivin, C., E. Giraud, *et al.* (2009). "Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes?" Trends in Microbiology **17**(10): 458-466.
- Meade, H. M., S. R. Long, *et al.* (1982). "Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis." Journal of Bacteriology **149**(1): 114-122.
- Monza, J.y J. Palacios (2004). Fijación biológica de nitrógeno en la simbiosis rizobio-leguminosa. El metabolismo del nitrógeno en las plantas. A. M. Jorge Monza. Córdoba, Almuzara.
- Nandal, A., C. C. O. Huggins, *et al.* (2010). "Induction of the ferritin gene (*ftnA*) of *Escherichia coli* by Fe²⁺-Fur is mediated by reversal of H-NS silencing and is RyhB independent." Molecular Microbiology **75**(3): 637-657.
- Nienaber, A., H. Hennecke, *et al.* (2001). "Discovery of a haem uptake system in the soil bacterium *Bradyrhizobium japonicum*." Molecular Microbiology **41**(4): 787-800.
- Noya, F., A. Arias, *et al.* (1997). "Heme compounds as iron sources for nonpathogenic Rhizobium bacteria." Journal of Bacteriology **179**(9): 3076-3078.
- O'Brian, M. R.y E. Fabiano (2010). Mechanisms and regulation of iron homeostasis in the rhizobia. Iron Uptake and Homeostasis in Microorganisms. S. C. A. Pierre Cornelis, Caister Academic Press.
- Ochman, H., A. S. Gerber, *et al.* (1988). "Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction." Genetics **120**(3): 621-623.
- Perret, X., C. Staehelin, *et al.* (2000). "Molecular basis of symbiotic promiscuity." Microbiology and Molecular Biology Reviews **64**(1): 180-201.
- Posey, J. E.y F. C. Gherardini (2000). "Lack of a role for iron in the Lyme Disease pathogen." Science **288**(5471): 1651-1653.

- Reddy, P. V., R. V. Puri, *et al.* (2011). "Iron storage proteins are essential for the survival and pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis* in the THP-1 macrophages and guinea pig model of infection." Journal of Bacteriology.
- Rodionov, D. A., M. S. Gelfand, *et al.* (2006). "Computational reconstruction of iron- and manganese-responsive transcriptional networks in α -Proteobacteria." PLoS Computational Biology 2(12): e163.
- Rudolph, G., H. Hennecke, *et al.* (2006). "Beyond the Fur paradigm: iron-controlled gene expression in rhizobia." FEMS Microbiology Reviews 30(4): 631-648.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, *et al.* (1989). Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sawada, H., L. D. Kuykendall, *et al.* (2003). "Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts." The Journal of General and Applied Microbiology 49(3): 155-179.
- Schäfer, A., A. Tauch, *et al.* (1994). "Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*." Gene 145(1): 69-73.
- Smith, J. L. (2004). "The physiological role of ferritin-like compounds in bacteria." Critical Reviews in Microbiology 30(3): 173-185.
- Southern, E. M. (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." Journal of Molecular Biology 98(3): 503-517.
- Tamura, K., D. Peterson, *et al.* (2011). "MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods." Molecular Biology and Evolution.
- van Rhijn, P. y J. Vanderleyden (1995). "The Rhizobium-plant symbiosis." Microbiology Reviews 59(1): 124-142.
- Waidner, B., S. Greiner, *et al.* (2002). "Essential role of ferritin Pfr in *Helicobacter pylori* iron metabolism and gastric colonization." Infection and Immunity 70(7): 3923-3929.
- Wandersman, C. y P. Delepelaire (2004). "Bacterial iron sources: From siderophores to hemophores." Annual Review of Microbiology 58(1): 611-C-614.
- Weeratunga, S. K., C. E. Gee, *et al.* (2009). "Binding of *Pseudomonas aeruginosa* apobacterioferritin-associated ferredoxin to bacterioferritin B promotes heme mediation of electron delivery and mobilization of core mineral iron." Biochemistry 48(31): 7420-7431.

Weir, B. S. (2011). "The current taxonomy of rhizobia. New Zealand rhizobia website." de <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html>.

Wexler, M., K. H. Yeoman, *et al.* (2001). "The *Rhizobium leguminosarum tonB* gene is required for the uptake of siderophore and haem as sources of iron." Molecular Microbiology 41(4): 801-816.

Yasmin, S., S. C. Andrews, *et al.* (2010). "A new role for heme: facilitating release of iron from the bacterioferritin iron biomineral." Journal of Biological Chemistry.

Young, J. P. W. y K. E. Haukka (1996). "Diversity and phylogeny of Rhizobia." New Phytologist 133(1): 87-94.