

Determinación del rol de la bacterioferritina en la homeostasis de hierro en *Sinorhizobium meliloti* 1021

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, opción Microbiología –
PEDECIBA

Lic. Daniela Costa

Orientador: Dra. Elena Fabiano



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Aprobado: 15/02/2016



Índice de contenidos

Índice de contenidos	1
Índice de figuras	2
Índice de tablas	4
Resumen	5
Introducción	7
Presentación del modelo de estudio: Los rizobios	7
La fijación biológica del nitrógeno	7
Un poco de historia	9
La simbiosis rizobio – leguminosa	10
El hierro como elemento esencial en el metabolismo celular	13
La otra cara del hierro	14
Homeostasis del hierro en bacterias	16
Regulación de la homeostasis del hierro	29
El entorno génico de <i>bfr</i> en <i>S. meliloti</i> 1021	34
Hipótesis	37
Objetivos generales	37
Objetivos específicos	37
Capítulo I: Análisis de la expresión del gen de la bacterioferritina de <i>S. meliloti</i> 1021	38
Resumen	39
Hipótesis	41
Objetivos generales	41
Objetivos específicos	41
Materiales y métodos	42
Cepas y medios de cultivo	42
Amplificaciones por PCR	43
Extracciones de ADN genómico de <i>S. meliloti</i>	43
Extracciones de ADN plasmídico	44
Visualización de ácidos nucleicos	44
Preparación de células competentes	44
Transformaciones	45
Extracciones de ADN a partir de geles de agarosa	45
Reacciones con enzimas de restricción	45
Reacciones de ligación	45
Conjugaciones triparentales	45
Construcción de la mutante Bfr-	46
Análisis de la expresión de la bacterioferritina	50
Resultados	57
Construcción de la mutante	57
El gen <i>bfr</i> se expresa en presencia de hierro, y la proteína Irr regula su expresión en una forma dependiente del hierro	62
El análisis de la actividad de la región promotora reveló una activación en condiciones limitantes en hierro	63
Evaluación de la actividad promotora mediante citometría de flujo	70
Análisis de la expresión mediante qRT – PCR	76
Discusión	82
La proteína Irr participa en la regulación de la expresión de <i>bfr</i>	84
La proteína RirA participa en la regulación de la expresión génica de <i>bfr</i>	85
Función coordinada de Irr y RirA en la regulación de la expresión de SMc03787/SmelC759 y <i>bfr</i>	86
Modelo de expresión de SMc03787/SmelC759 y <i>bfr</i>	88
Modelo de regulación en presencia de hierro	88
Modelo de regulación en condiciones limitantes de hierro	88
Conclusiones	92
Capítulo II: Funciones fisiológicas de la bacterioferritina de <i>S. meliloti</i> 1021	93

Resumen	94
Hipótesis	96
Objetivos Generales	96
Objetivos específicos	96
Metodología	97
Cepas y medios usados en este capítulo	97
Análisis fenotípico	97
Cuantificación de hierro	97
Crecimiento bacteriano	97
Cuantificación de rizobactina 1021	98
Sensibilidad al hierro	98
Sensibilidad a hemina	98
Sensibilidad al estrés oxidativo	99
Cinética de nodulación y promoción del crecimiento vegetal	99
Resultados	100
Cuantificación de hierro	100
La mutante carente en bacterioferritina no responde a la limitación de hierro con el aumento en la síntesis de rizobactina 1021	101
La bacterioferritina no es esencial para la respuesta de tolerancia al hierro	102
Sensibilidad a Hemina	103
Ensayos de estrés oxidativo	104
Cinética de nodulación	105
Promoción del crecimiento vegetal	106
Discusión	108
Conclusiones	113
Conclusiones generales	114
Conclusiones generales	115
Anexo I: Abreviaturas utilizadas	118
Anexo II: Composición de medios de cultivo	118
Medio mínimo M3 (121)	118
Medio mínimo M9 (108)	118
TY (102)	119
LB (107)	119
Jensen (131)	119
Anexo III: Composición de soluciones y buffers	119
Buffer Z	119
Buffer fosfato de sodio pH 8	119
TAE	120
Soluciones utilizadas en el Southern blot	120
Soluciones para la minipreparación de ADN plasmídico	121
Anexo IV:	122
Cebadores diseñados	122
Anexo V:	123
Datos de expresión de GFP mediante espectrofluorimetría	123
Anexo VI	132
Datos de cuantificaciones de fluorescencia mediante citometría de flujo	132
Bibliografía	140

Índice de figuras

Fig. 1: Árbol filogenético del gen de la subunidad ribosomal 16S	7
Fig. 2: Complejo nitrogenasa	8
Fig. 3: Ilustración de nódulos en raíces de Vicia Faba, según Malpighi (1679)	9
Fig. 4: Estructura general de los factores Nod	11

Fig. 5: Enzimas que contienen hierro	14
Fig. 6: Homeostasis del hierro	16
Fig. 7: Estructura de la rizobactina 1021	18
Fig. 8: Adquisición de hierro mediada por sideróforos	19
Fig. 9: Estructura de la apoferritina	21
Fig. 10: Estructura cristalográfica de proteínas de almacenamiento de hierro	21
Fig. 11: Ensamblaje espontáneo de las ferritinas	22
Fig. 12: Mecanismos de reacción de ferroxidación	24
Fig. 13: Coordinación de grupos hemo en bacterioferritinas	25
Fig. 14: Centro ferroxidasa de la bacterioferritina	26
Fig. 15 : Mineralización de hierro en la bacterioferritina	27
Fig. 16: Estructura de Fur	30
Fig. 17: Secuencias consenso de las cajas Irr (ICE) y RirA (IRO)	32
Fig. 18: Modelo de regulación mediada por RirA	33
Fig. 19: Presencia de IRO e ICE en genes de distintas especies de rizobios	34
Fig. 20: Entorno génico de <i>bfr</i>	35
Fig. 21: Obtención del vector pK18- <i>bfr::lacZGm^R</i>	48
Fig. 22: Operón SMC03787- <i>bfr</i> y los amplicones utilizados para el estudio de los promotores	52
Fig. 23: Posibles opciones de integración del plásmido pK18- <i>bfr::lacZGm^R</i> en el genoma de la cepa aceptora <i>S. meliloti</i> 1021	58
Fig. 24: Verificación de la mutación mediante PCR	59
Fig. 25: Configuraciones del simple evento (SE) de recombinación homóloga	59
Fig. 26: Genotipo salvaje	59
Fig. 27: Genotipo doble evento de recombinación homóloga	60
Fig. 28: Southern blot	61
Fig. 29: Actividad betagalactosidasa: contexto génico salvaje	63
Fig. 30: Actividad betagalactosidasa: contexto génico salvaje vs. Irr-	64
Fig. 31: Obtención de P3787	66
Fig. 32: Obtención de los amplicones P3787, P3787 T, Pbfr y Pbfr T	66
Fig. 33: Verificación de los insertos en pOT1 en células transconjugantes de <i>S. meliloti</i> 1021 pOT1 P3787 y pOT1 P3787 T	66
Fig. 34: Expresión de GFP	68
Fig. 35: Citometría de flujo de <i>S. meliloti</i> 1021 pOT1-Fe	71
Fig. 36: Citometría de flujo de <i>S. meliloti</i> IrrRirA pOT1-P3787 +Fe	72
Fig. 37: Citometría de flujo de <i>S. meliloti</i> RirA pOT1-P3787 +Fe	72
Fig. 38: Análisis de los resultados de las emisiones de fluorescencia mediante citometría de flujo: ...	74
Fig. 39: Análisis de los resultados de las emisiones de fluorescencia mediante citometría de flujo: Aporte de fluorescencia de cada población	75
Fig. 40: Geles de agarosa desnaturizantes de las extracciones de ARN	77
Fig. 41: Amplificación mediante qPCR de los ARNs tratados y no tratados con ADNasa	78
Fig. 42: Amplificación mediante qPCR de los ARNs tratados con ADNasa	78
Fig. 43: qRT-PCR: Curvas estándar	79
Fig. 44: Expresión de los transcritos <i>srna</i> , <i>bfd</i> y <i>bfr</i> en los diferentes contextos génicos en presencia de hierro	80
Fig. 45: Expresión a partir de SMC_TSS09932 o SMC_TSS09933 generando el transcripto T1	89
Fig. 46: Expresión a partir de SMC_TSS09935 o SMC_TSS09936 generando el transcripto T2	89
Fig. 47: Expresión a partir de SMC_TSS09932 o SMC_TSS09933 generando el transcripto T3	89
Fig. 48: Modelo hipotético de expresión de la bacterioferritina en presencia de hierro	90
Fig. 49: Modelo hipotético de expresión de la bacterioferritina en ausencia de hierro	90
Fig. 50: Crecimiento bacteriano en diferentes medios de cultivo bajo condiciones de deficientes o suficientes de hierro	101
Fig. 51: Ensayos de sensibilidad a hemina	103
Fig. 52: Ensayos de inhibición del crecimiento con H ₂ O ₂	104
Fig. 53: Ensayo de estrés oxidativo por H ₂ O ₂	104
Fig. 54: Cinética de nodulación en plantas de alfalfa	105
Fig. 55: Ensayos de promoción del crecimiento vegetal	107
Fig. 56: Citometría de flujo de células de <i>S. meliloti</i> 1021 pOT1	132

Fig. 57: Citometría de flujo de células de <i>S. meliloti</i> 1021 pOT1 P3787	133
Fig. 58: Citometría de flujo de células de <i>S. meliloti</i> 1021 pOT1 P3787 T	133
Fig. 59: Citometría de flujo de células de <i>S. meliloti</i> 1021 Irr pOT1	134
Fig. 60: Citometría de flujo de células de <i>S. meliloti</i> 1021 Irr pOT1 P3787	134
Fig. 61: Citometría de flujo de células de <i>S. meliloti</i> 1021 Irr pOT1 P3787 T.....	135
Fig. 62: Citometría de flujo de células de <i>S. meliloti</i> 1021 RirA pOT1	135
Fig. 63: Citometría de flujo de células de <i>S. meliloti</i> 1021 RirA pOT1 P3787	136
Fig. 64: Citometría de flujo de células de <i>S. meliloti</i> 1021 RirA pOT1 P3787 T.....	136
Fig. 65: Citometría de flujo de células de <i>S. meliloti</i> 1021 Irr RirA pOT1.....	137
Fig. 66: Citometría de flujo de células de <i>S. meliloti</i> 1021 Irr RirA pOT1 P3787.....	137
Fig. 67: Citometría de flujo de células de <i>S. meliloti</i> 1021 Irr RirA pOT1 P3787 T.....	138

Índice de tablas

Tabla 1: Cepas bacterianas	42
Tabla 2: Plásmidos utilizados.....	42
Tabla 3: Programa de PCR para verificar las mutaciones obtenidas	49
Tabla 4: Programa de PCR utilizado para las construcciones utilizadas para el estudio de los promotores	51
Tabla 5: Programa de qPCR utilizado	56
Tabla 6: Resultados de la verificación de la mutación mediante Southern blot	61
Tabla 7: Expresión de GFP por construcción	69
Tabla 8: Relación de expresión con respecto a la cepa salvaje y normalizados por el gen de referencia 16S	81
Tabla 9: Comparación de medianas de las expresiones los diferentes transcritos con respecto al contexto génico salvaje	81
Tabla 10: Contenido de hierro intracelular	100
Tabla 11: Concentración de rizobactina 1021 en los cultivos celulares	102
Tabla 12: Datos de expresión GFP	123
Tabla 13: Datos de expresión GFP	126
Tabla 14: Datos de expresión GFP	128
Tabla 15: Datos de expresión GFP	129
Tabla 16: Análisis de las emisiones de fluorescencia mediante citometría de flujo por segmento	139

Resumen

El nitrógeno es un elemento esencial para la vida, siendo su asimilación a partir del N_2 responsabilidad de los organismos diazótrofos. Dentro de éstos juegan un papel importante los rizobios, formando estructuras en las raíces de plantas leguminosas denominadas nódulos, donde las bacterias diferenciadas llevan a cabo el proceso de fijación biológica de nitrógeno (FBN). El modelo de estudio de este trabajo es la bacteria *Sinorhizobium meliloti*, un rizobio capaz de establecer simbiosis con plantas de alfalfa. Una característica de la FBN es su dependencia del hierro, debido a la gran cantidad de este metal requerida como cofactor en el complejo enzimático involucrado, y la alta tasa metabólica de los bacteroides. Así, el hierro resulta ser un elemento esencial pero al mismo tiempo es potencialmente tóxico, debido a que su exceso en forma libre en las células puede catalizar la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS), altamente deletéreas para las células. Una forma que tienen los organismos de enfrentar esta problemática es mediante el almacenamiento del hierro en exceso en una forma no tóxica y a la vez biodisponible. Esto se logra a través de las proteínas de almacenamiento de hierro. La única proteína que muestra homología con otras proteínas de almacenamiento de hierro, codificada en el genoma de *S. meliloti* es la Bacterioferritina. Esta proteína se caracteriza por presentar una estructura tridimensional esférica, capaz de almacenar hierro en su interior. Se ha descrito en otros organismos que la bacterioferritina se expresa en condiciones de suficiencia de hierro, y se caracteriza, como otras ferritinas, de secuestrar iones ferrosos, oxidarlos y almacenarlos en su cavidad, en forma de oxihidroxifosfato férrico. Como resultado del almacenamiento de hierro, se originan otros roles que cumplen las ferritinas, como por ejemplo la protección frente al estrés oxidativo y la posibilidad de utilizar el hierro almacenado como fuente nutricional en condiciones en las que el metal resulta escaso. En los rizobios, se desconoce hasta el momento la función de las proteínas de almacenamiento de hierro. Este trabajo tiene como objetivo general determinar la función de la bacterioferritina de *S. meliloti* en la homeostasis de hierro en la bacteria en vida libre y su contribución a la simbiosis con la planta hospedera.

El primer capítulo de este trabajo está enfocado al análisis de la regulación de la expresión del gen de la bacterioferritina (*bfr*) de *S. meliloti* 1021 en vida libre, en función de la disponibilidad de hierro en el medio y de la implicancia de las proteínas Irr y RirA en su regulación. Utilizando una fusión transcripcional con el gen *lacZ* interrumpiendo la secuencia codificante de *bfr* a nivel cromosómico, se determinó que *bfr* se expresa tanto en presencia como en ausencia de hierro, si bien en este último caso la expresión es mucho menor. Utilizando la misma aproximación en

un contexto génico *irr::Ω* se observó que la expresión del gen *bfr* era mayor que en la cepa *irr*⁺ en presencia de hierro pero menor en ausencia del metal. Estos datos indicarían que la proteína Irr actúa como represor en presencia de hierro y como activador (o desrepresor) en ausencia del mismo. Debido a que en la bibliografía consultada se proponía que *bfr* es el segundo gen de un operón que contiene el ORF SMc03787, se analizó la actividad promotora de la región corriente arriba de este último ORF. Esta región contiene las secuencias consenso reconocidas como caja Irr y caja RirA. Para el análisis se realizó una fusión génica entre la región promotora en estudio y el gen reportero *gfp*, como parte del plásmido pOT1. La construcción plasmídica se introdujo en las mutantes *S. meliloti irr* y *S. meliloti rirA*. La fluorescencia producto de la expresión del gen reportero se cuantificó espectrofluorimétricamente y mediante citometría de flujo, determinándose que la región corriente arriba de SMc03787 tenía mayor actividad promotora en ausencia de hierro, que las proteínas Irr y RirA cumplen diferentes roles en función de la disponibilidad de hierro y que su regulación se encuentra interrelacionada. Los resultados obtenidos indicarían también la participación de un pequeño ARN denominado SmelC759 y de otro efector aún desconocido. Por último se buscó cuantificar la expresión de diferentes zonas del operón SMc03787-*bfr* mediante qRT-PCR, lográndose la optimización de la técnica y resultados que concuerdan en su mayoría con los obtenidos mediante las otras aproximaciones utilizadas. A partir de los datos obtenidos, se propone un modelo hipotético de regulación.

En el segundo capítulo de este trabajo se exploraron las diferentes funciones que podría cumplir la bacterioferritina de *S. meliloti* 1021, en vida libre y durante la relación simbiótica con plantas de alfalfa, comparando el fenotipo de la mutante isogénica de *S. meliloti* carente del gen *bfr* (Bfr-) con el de la cepa parental. Se realizó la cuantificación de hierro total presente en ambas cepas, crecidas en presencia y ausencia de hierro, determinándose que la bacterioferritina de *S. meliloti* participa en el almacenamiento de hierro y que su presencia es necesaria para favorecer el crecimiento cuando la disponibilidad de hierro es baja. Se determinó asimismo el papel de la bacterioferritina en la defensa contra el estrés causado por hierro y por hemina en exceso, o por la presencia de H₂O₂, encontrándose que la bacterioferritina en este organismo no confiere una ventaja frente a estos tipos de estrés. En el caso de la respuesta al H₂O₂, se encontró, contrariamente a lo esperado, que la bacterioferritina estaría afectando negativamente la supervivencia de las bacterias. Los ensayos en planta demostraron que la cepa Bfr- presentaba una nodulación más temprana y que la presencia de la bacterioferritina de *S. meliloti* no es esencial para el establecimiento de una simbiosis efectiva.

Introducción

Presentación del modelo de estudio: Los rizobios

Se denominan rizobios a las bacterias capaces de establecer relaciones simbióticas con plantas pertenecientes a la familia Fabaceae. En sus raíces los rizobios inducen la formación de órganos especializados denominados nódulos, en donde llevan a cabo el proceso de fijación biológica del nitrógeno (FBN)(Rev. por 1). Los rizobios no son un grupo filogenéticamente discreto, sino que por el contrario, se encuentran distribuidos en las subclases α y β de las Proteobacterias. Se han encontrado rizobios pertenecientes a 98 especies diferentes distribuidos en 13 géneros, que contienen tanto especies rizobiales como no rizobiales y nuevas especies siguen identificándose año a año (Rev. por 2). Los géneros descritos hasta el presente son: *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* (más recientemente denominado *Ensifer*), *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Phyllobacterium*, *Microvirga*, *Azorhizobium*, *Cupriavidus*, *Ochrobactrum*, *Methylobacterium*, *Devosia* y *Shinella*. En la Fig. 1 se muestra el árbol filogenético de los rizobios, basado en la secuencia del gen que codifica la subunidad ribosomal 16S.

La fijación biológica del nitrógeno

El nitrógeno es el elemento más abundante en la atmósfera, siendo su forma mayoritaria la de dinitrógeno molecular, que representa el 78% de la atmósfera (Rev. por 3). Esta forma es muy estable, de hecho, es la más inerte de las moléculas diatómicas. La energía de unión de su triple enlace es muy alta (asciende a 225 kcal/mol), por lo que la reacción requerida para romper esta molécula tiene una energía de activación muy alta en condiciones normales de presión y

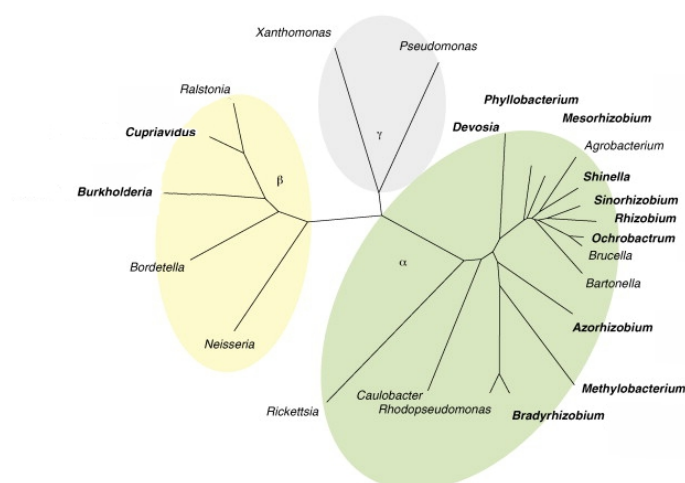


Fig. 1: Árbol filogenético del gen de la subunidad ribosomal 16S

Este árbol filogenético se basa en la secuencia del gen de la subunidad ribosomal 16S. En negrita se indican los géneros que contienen especies pertenecientes al grupo de los rizobios. Tomado de Masson-Boivin *et al.* (17)

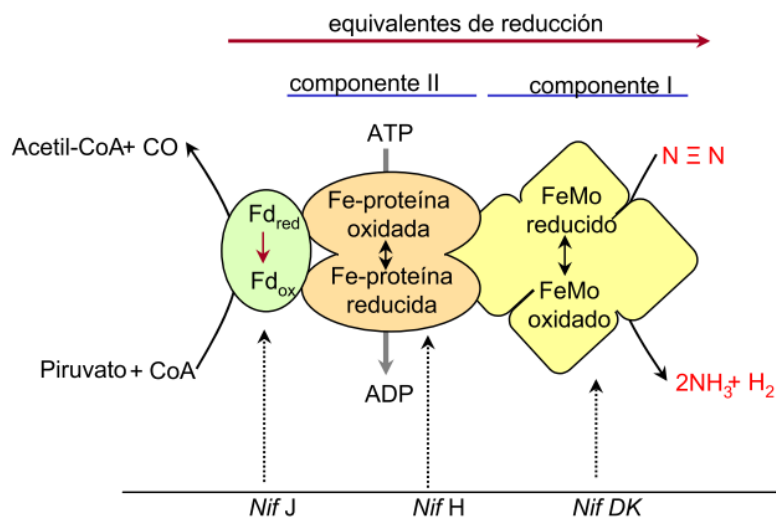


Fig. 2: Complejo nitrogenasa

Este esquema representa la estructura y función del complejo nitrogenasa y el origen génico de cada componente. El proceso comienza con la activación del componente II, mediante la unión de ATP, que permite la unión del componente I. Los electrones son transferidos desde una ferredoxina reducida hacia el componente II y desde este al sitio activo del componente I a través del clúster P. (Tomada de 6).

temperatura (4). El mayor reservorio de nitrógeno en el planeta es la atmósfera, donde se estima que hay en el orden de los 10^{21} g de nitrógeno. Al año se fijan 10^{14} g de nitrógeno, a formas asimilables por las plantas (Rev. por 5). Sin embargo, son pocos los organismos capaces de transformar el nitrógeno atmosférico a una forma reactiva, asimilable. Estos organismos se denominan diazótrofos, y corresponden a un número limitado de especies en los dominios Archaea y Bacteria, con diferentes tipos de nutrición y mecanismos de fijar nitrógeno (Rev. por 6). La maquinaria enzimática responsable de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) es el complejo dinitrogenasa. Este complejo consiste en dos proteínas: la dinitrogenasa o Componente I y la dinitrogenasa reductasa o Componente II (Fig. 2). En el Componente I se encuentra el sitio de unión al sustrato y es donde ocurre su reducción a NH_4^+ . Se han reportado diferentes tipos de dinitrogenasas, en función del heterometal presente en el sitio activo, siendo la Mo-nitrogenasa de *Azotobacter vinelandii* la mejor caracterizada. Esta proteína consiste en cuatro subunidades, $\alpha_2\beta_2$, donde las subunidades α y β son homólogas. Cada dímero $\alpha\beta$ tiene asociado un cofactor Mo-Fe y un clúster P (Rev. por 7). El clúster P consiste en dos clústeres $[Fe_4-S_4]$, que comparten un átomo de S, formando una estructura simétrica con respecto a éste. Su función es la de intermediar la transferencia de electrones entre el componente II y el sitio activo de la nitrogenasa (Rev. por 6). El cofactor Mo-Fe consiste en una estructura elongada que contiene un átomo de Mo, siete de Fe y nueve de S y es el sitio activo de la nitrogenasa, pero no se ha podido verificar cristalográficamente en qué lugar del cofactor ocurre la unión de sustrato o de inhibidores (Rev. por 5). El componente II de la nitrogenasa consta de dos subunidades idénticas que coordinan un único clúster $[Fe_4-S_4]$ y un sitio de unión a ATP en cada subunidad.

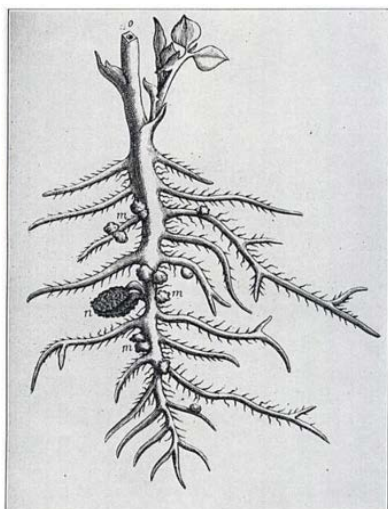
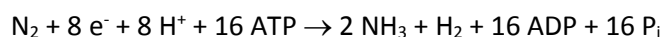


Fig. 3: Ilustración de nódulos en raíces de Vicia Faba, según Malpighi (1679)

Esta imagen fue extraída del libro "Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants" de Fred, Baldwin y McCoy, publicado en 1932 (10). Esta ilustración pertenece al libro *Anatome Plantarum*, publicado por el italiano Marcello Malpighi en 1679, quien es reconocido como el fundador de la anatomía microscópica moderna, debido a sus trabajos pioneros en la descripción detallada de la anatomía, tanto animal como vegetal, utilizando el microscopio como herramienta. En esta ilustración se indican los nódulos en las raíces de la leguminosa *Vicia faba*.

Esta proteína actúa como una reductasa dependiente de ATP, que obtiene electrones desde una ferredoxina o flavodoxina reducida y los transfiere al componente I en un proceso que consume dos ATP por electrón transferido. Por lo tanto el complejo dinitrogenasa-nitrogenasa reductasa tiene 34 átomos de hierro. Dado que para la reducción de una molécula de N_2 a NH_3 son necesarios 8 equivalentes de reducción, la reacción consume en condiciones óptimas, un mínimo de 16 moléculas de ATP por cada molécula de N_2 fijada, siendo la ecuación de la reacción la siguiente:



La reacción catalizada por la nitrogenasa es altamente sensible al O_2 . *In vitro*, tanto la nitrogenasa como la nitrogenasa reductasa son inactivadas permanentemente por O_2 . *In vivo*, se ha demostrado que la inhibición por oxígeno es reversible, y que en *A. vinelandii*, actúa como un inhibidor no competitivo (8). Por esta razón, los diazótrofos han desarrollado diferentes estrategias para proteger la nitrogenasa. La estrategia utilizada por los rizobios para evitar el efecto nocivo del O_2 consiste en la formación de una barrera física que impide la difusión del mismo hacia el simbiosoma, a través de la formación de nódulos (Rev. por 9).

Un poco de historia

Desde su descubrimiento por B. Frank en 1879, la caracterización taxonómica de los rizobios ha cambiado varias veces con el correr de los años. En un inicio, se creía que se trataba de hongos, y se denominó a los microorganismos formadores de nódulos *Schinsia leguminosarum*. Nueve años más tarde, Beijerinck aisló las bacterias de los nódulos, y las llamó *Bacillus radicola*, pero al año siguiente, Frank renombró a los simbiosomas como *Rhizobium leguminosarum*, nombre que se sigue utilizando hasta la fecha (Rev. por 1). Sin embargo, la observación de nódulos en raíces de plantas leguminosas data de mucho tiempo atrás. En 1679, en su *Anatome Plantarum*,

Malpighi describe a los nódulos como agallas producidas por larvas de insectos (ver Fig. 3), pero no fue sino hasta finales del siglo XIX que se confirmó que se trataba del producto de la asociación entre bacterias fijadoras de nitrógeno y plantas (10).

Hasta 1982, se reconocían seis especies de rizobios: *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. meliloti*, *R. japonicum*, y *R. lupin*. Su clasificación estaba fundamental pero no exclusivamente, basada en los hospedadores de los que estas bacterias eran aisladas. Esta clasificación introdujo el concepto de inoculación cruzada, que se basa en la especificidad de las relaciones simbióticas entre rizobios y plantas leguminosas (10), de forma que los rizobios podrían separarse en especies definidas basadas en sus rangos de hospederos, e inversamente, las leguminosas podrían ser agrupadas en función de sus simbioses (Rev. por 1). Pronto se propuso una nueva clasificación, según las características del crecimiento de los rizobios, distinguiéndose un nuevo grupo de crecimiento lento, denominado *Bradyrhizobium*, que pertenecen a una rama filogenéticamente separada al género *Rhizobium* (11). Luego, se propuso un género separado de *Rhizobium*, denominado *Sinorhizobium*. En éste se incluyeron y renombraron las especies *Rhizobium fredii*, *R. meliloti*, y se introdujeron nuevas especies. Más tarde se crearon los géneros *Mesorhizobium* y *Allorhizobium* (que significa “otros rizobios”) (12). En el año 2001, se reportó la identificación de bacterias noduladoras de leguminosas pertenecientes a la subclase beta de las proteobacterias, a las que denominaron beta-rizobios (13). Recientemente el género *Sinorhizobium* sufrió un cambio en su denominación, al determinarse que los géneros *Sinorhizobium* y *Ensifer* eran sinónimos, resolviéndose que el nombre *Ensifer*, por ser el primero propuesto, sería el correcto (14). La nueva denominación de género en cuestión fue poco aceptada por la comunidad científica, ya que *Sinorhizobium* es el nombre más conocido y refleja su pertenencia al orden de los Rizobiales. Por esta razón en este trabajo se mantiene el nombre *Sinorhizobium* para referirse a este género.

La simbiosis rizobio - leguminosa

Este tipo de relación simbiótica tiene la característica de que las bacterias en su estado diferenciado, viven como endosimbiontes de las células vegetales presentes en los nódulos de las leguminosas y es bajo esa forma diferenciada donde las bacterias llevan a cabo el proceso de la FBN. Pero para que esto tenga lugar, deben darse primero una serie de pasos determinantes. El primero de ellos, ocurre entre las raíces de las plantas leguminosas y los rizobios, denominado “diálogo molecular”. Las plantas liberan enormes cantidades de sustancias, a un costo energético muy alto, que permite su interacción con los microorganismos presentes en la rizósfera, atrayendo a los benéficos y combatiendo los patógenos (Rev. por 15). Entre estas sustancias se encuentran los flavonoides, metabolitos secundarios que al ser liberados por las

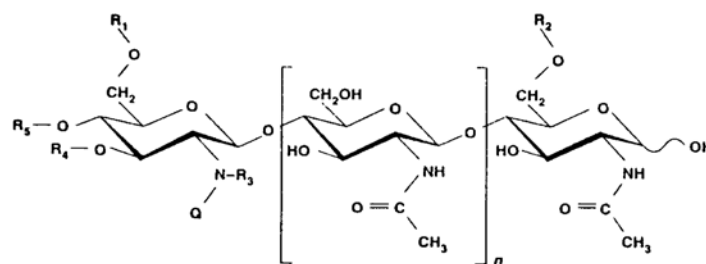


Fig. 4: Estructura general de los factores Nod

Aquí se representa la estructura básica de un factor Nod. El monómero representado entre paréntesis rectos es repetido n veces, Q representa la cadena de ácido graso, que puede variar en largo y saturación. R representan sustituciones variables. Extraído de van Rhijn y Vanderleyden 1995 (18)

raíces de las leguminosas actúan como inductores de la síntesis de los llamados factores Nod por parte de los rizobios, aún en concentraciones del orden de 1×10^{-9} M (Rev. por 16). El mecanismo mediante el cual los flavonoides excretados por las raíces de las leguminosas son capaces de inducir la expresión de los genes *nod*, es mediante la proteína reguladora NodD, producto del gen *nodD*, que se encuentra habitualmente encabezando el operón *nodABC*. NodD es un activador, que en presencia de los exudados radiculares adecuados, se une a secuencias consenso ubicadas en las regiones promotoras de los genes *nod*, denominadas cajas Nod, induciendo la expresión de los genes que serán responsables de la síntesis de los factores Nod. Otras proteínas también participan de la regulación de los genes *nod* en distintos organismos, como por ejemplo NodR, NodA, entre otros (Rev. por 17). Los genes *nod* se clasifican en dos tipos: los comunes o estructurales y los específicos. Los primeros son los responsables de la síntesis del esqueleto del factor Nod, mientras que los últimos introducen variantes en las cadenas laterales que son determinantes en la especificidad de hospedador (Rev. por 18). Los factores Nod consisten en un esqueleto de oligosacárido formado por de 2 a 6 residuos de N-acetil-D-glucosamina unidos por enlaces $\beta 1 \rightarrow 4$ con un ácido graso de estructura variable unido al extremo no reductor (Rev. por 16). En la Fig. 4 se muestra la estructura básica de un factor Nod.

La liberación por parte del rizobio de los factores Nod induce en la planta los procesos que permitirán la infección. Primeramente, se induce un aumento en la concentración intracelular de calcio, seguida de fuertes oscilaciones que permiten el enrollado del pelo radicular, quedando las bacterias 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 las bacterias quedan envueltas y luego se diferencian en 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 18, 19).

El poder reductor que utiliza el bacteroide para la FBN proviene de la planta, predominantemente en forma de ácidos dicarboxílicos, que a su vez, aportan los esqueletos carbonados que servirán como vehículo para el nitrógeno fijado. Otra forma en la que egresa el nitrógeno fijado es mediante la difusión del NH_3 a través de la membrana bacteroidal hacia el espacio peribacteroidal, donde el pH ácido promueve la protonación a NH_4^+ . Este NH_4^+ es exportado al citosol de la célula nodular mediante transportadores de cationes monovalentes dispuestos en la membrana peribacteroidea, y es asimilado vía GS/GOGAT para formar glutamato, el cual pasa al sistema vascular de la planta (Rev. por 6).

Se mencionó anteriormente que la FBN tiene un alto requerimiento energético en forma de ATP, por lo que el metabolismo de los bacteroides debe ser muy activo. Sin embargo, el O_2 necesario para cumplir tal demanda energética es perjudicial para la nitrogenasa, debido ya sea a su inactivación o la inhibición en su expresión en presencia de O_2 . La leghemoglobina es la proteína predominante en el nódulo, alcanzando un 25 a 30% del total de proteínas solubles y es necesaria para el proceso de FBN (Rev. por 20). Se trata de una hemo-proteína de transporte con una gran afinidad por el O_2 , que permite a los bacteroides contar con el O_2 necesario para satisfacer su alta tasa metabólica, al tiempo que evita su contacto con la nitrogenasa (Rev. por 6). Esta proteína es la que le aporta el color rojizo a los nódulos activos.

El promedio de vida de nódulos que no están sometidos a estrés es de 10 a 12 semanas desde su iniciación, pero puede ser menor debido a exposición continua a la oscuridad, tratamiento con NO_3^- o sequía (Rev. por 21). Entre los cambios orquestados en la senescencia del nódulo, se encuentran una caída en la capacidad de fijación de nitrógeno, que viene acompañada de la degradación de la leghemoglobina y la caída en el contenido nodular de ascorbato y glutatión. Las hormonas constituyen factores determinantes en la senescencia de los nódulos y de otros

órganos vegetales. Se ha demostrado que el etileno y el ácido abscísico (ABA) son inductores en la senescencia nodular (Rev. por 21).

El hierro como elemento esencial en el metabolismo celular

El hierro es el metal más abundante en la corteza terrestre. En la naturaleza se encuentra predominantemente en los estados de oxidación 2+ y 3+, pero pueden variar entre 2- y 4+. Puede adoptar diferentes estados de spin, tanto en su forma férrica como ferrosa, dependiendo del ligando al que se encuentre unido (Rev. por 22). La variedad de ligandos a los que puede unirse lo hacen un elemento de gran versatilidad funcional, ya que le permiten intervenir en numerosos procesos celulares, convirtiéndolo en un metal esencial para la mayoría de los seres vivos. Sin embargo existen algunas excepciones en bacterias del género *Lactobacillus*, capaces de utilizar iones de cobalto y manganeso en su lugar (23). Además de participar en el proceso de FBN, el hierro participa en reacciones bioquímicas muy diversas, actuando como parte estructural o catalítica de las enzimas que gobiernan procesos como la síntesis de aminoácidos, pirimidinas, ácidos orgánicos, ADN, la fotosíntesis, la metanogénesis, la fijación biológica del carbono, la producción y el consumo de hidrógeno, la degradación de compuestos aromáticos, y la regulación de la expresión génica, entre muchos otros (Rev. por 22). La función biológica del hierro depende de su incorporación a proteínas como parte de sus grupos prostéticos, en forma de especies mono o bi-nucleares, clústeres Fe-S, o grupos hemo, entre otros, siempre bajo la forma de Fe²⁺. La Fig. 5 muestra algunas enzimas encontradas en organismos aerobios que contienen hierro y sus respectivas vías metabólicas.

El hecho de que las enzimas prefieran el ion ferroso no es casual, ya que éstas evolucionaron con la proliferación de la vida anaerobia en nuestro planeta, en tiempos en los que el ion 2+ era la forma estable y biodisponible del hierro. Con el advenimiento de una atmósfera reductora, que surgió a partir de los primeros organismos fotosintéticos, el hierro se volvió un elemento poco biodisponible, debido a que la forma predominante 3+ es prácticamente insoluble en agua a pH neutro, siendo su $K_{ps} = 10^{-39}$ M (Rev. por 24, 25).

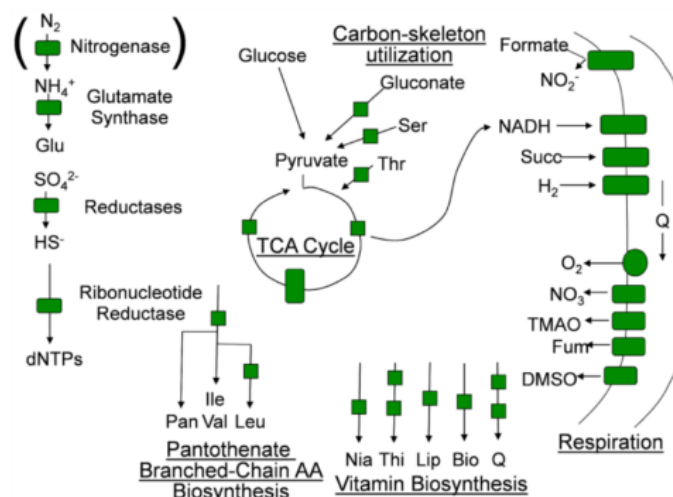
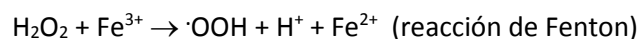
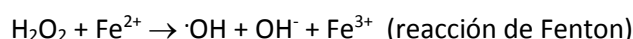


Fig. 5: Enzimas que contienen hierro

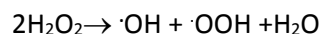
En esta figura se muestran las enzimas que contienen hierro, pertenecientes a las principales vías metabólicas comúnmente encontradas en microorganismos aerobios. (Tomada de 24)

La otra cara del hierro

Se describieron anteriormente los roles fisiológicos que cumple el hierro en los organismos, que determinan una dependencia casi universal. Sin embargo, las mismas características que lo hacen necesario lo vuelven potencialmente tóxico. La capacidad de los iones de hierro de participar en transferencias de un electrón a aceptores fuertes como el oxígeno, producen especies altamente deletéreas para las células, denominadas especies reactivas del oxígeno (ROS). Las ROS producidas por las células como consecuencia del propio metabolismo celular producen daños que van desde la peroxidación de los lípidos de las membranas, inactivación de proteínas, hasta daños en los ácidos nucleicos. La presencia de hierro induce la formación de ROS, debido a la catálisis mediada por las siguientes reacciones:



En suma :



Para evitar la generación de ROS, los organismos aerobios han desarrollado sistemas de detoxificación, como superóxido dismutasa, para evitar la producción de H_2O_2 a partir de aniones O_2^- , y de peroxidasas y catalasas para eliminar el H_2O_2 (Rev. por 26). Otro mecanismo para impedir la generación del tóxico radical $\cdot OH$, consiste en controlar las concentraciones del catalizador de la reacción de Fenton, es decir, del hierro (27).

Por esta razón, los mecanismos que regulan los sistemas de adquisición, utilización, almacenamiento y exportación de hierro deben estar coordinados, para garantizar la presencia de hierro disponible necesario para mantener las funciones celulares, a la vez que evitar su exceso potencialmente tóxico.

El hierro y la simbiosis rizobio – leguminosa

Los rizobios, además del hierro necesario para las funciones mencionadas anteriormente, requieren de este metal como una parte esencial del complejo nitrogenasa, y debido a la alta demanda respiratoria durante la etapa de vida endosimbiótica.

En la rizósfera, los microorganismos compiten por la colonización de las raíces de plantas. En el suelo, el suministro de hierro es limitado, de forma que la presencia de sistemas especializados para la adquisición de hierro le confiere a los microorganismos una ventaja adaptativa. Entre estos sistemas se destaca la producción y el uso de sideróforos, moléculas orgánicas pequeñas con gran afinidad por el hierro (ver *Estrategias de adquisición de hierro*). La bacteria *S. meliloti* 1021 produce el sideróforo rizobactina 1021 en respuesta a condiciones de baja disponibilidad de hierro en el medio. Se demostró que el contenido intracelular de hierro afecta la competitividad de células de *S. meliloti* en la infección, resaltándose la importancia de los sistemas de adquisición del metal que operan en vida libre (28), ya que se encontró que los genes que codifican estos sistemas están reprimidos durante la simbiosis (29).

El alto requerimiento de hierro durante la simbiosis rizobio-leguminosa induce en la planta una respuesta al déficit de hierro, siendo el nódulo el tejido vegetal con mayor contenido de hierro (30). En nódulos determinados de soja, antes de producirse la infección, las raíces comienzan a acumular la ferritina donde se almacenará el hierro hasta alcanzar la madurez de los nódulos, en el día 12 post inoculación (p.i.), momento en que comienza a decaer, concomitantemente con la expresión de leghemoglobina y nitrogenasa (30). Sin embargo, en nódulos indeterminados de *Medicago truncatula*, se planteó en un trabajo más reciente un modelo en el que el hierro presente en los nódulos proviene de la vasculatura en forma de citrato férrico, siendo internalizado al citosol de células en la zona de infección a través de transportadores. Luego, el hierro citosólico sería transportado al simbiosoma, probablemente a través del transportador SEN1. Una vez dentro del espacio peribacteroidal, la forma en que los bacteroides reciben el hierro necesario para cumplir las funciones metabólicas durante la simbiosis, aún se desconoce (31).

Por otro lado se ha reportado que los sistemas de adquisición de hemo y de sideróforos no son necesarios para el establecimiento de una simbiosis efectiva, aunque se ha descrito la

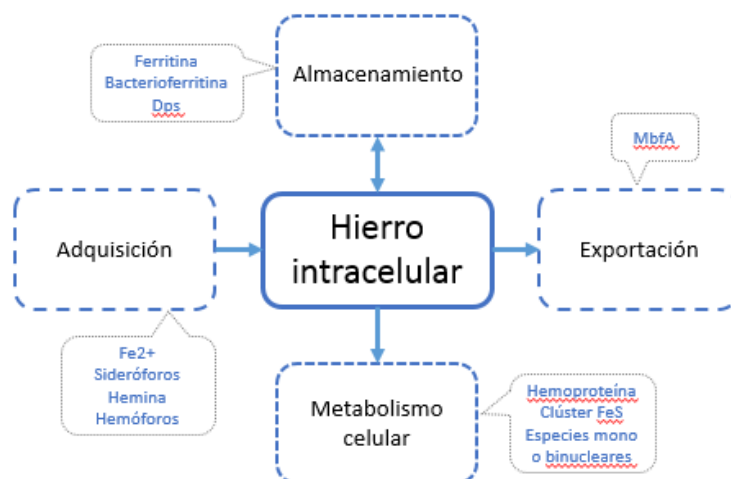


Fig. 6: Homeostasis del hierro

En esta figura se muestra un esquema representativo de la homeostasis del hierro. Se muestran los procesos que influyen sobre la concentración de hierro intracelular, y los principales sistemas implicados en cada proceso

importancia del hierro en relaciones hospedador-huésped del tipo patagénico, ya que mutaciones en los reguladores centrales de la homeostasis del hierro afectan la virulencia de algunos patógenos (32, 33). Sin embargo, hasta el momento no ha sido posible establecer la importancia de estos reguladores en la simbiosis rizobio-leguminosa, debido a que mutantes carentes de los mismos no demostraron un fenotipo diferencial *in planta* (34–36), por lo que los mecanismos involucrados en la homeostasis de hierro durante la simbiosis serían controlados por reguladores aún desconocidos.

Homeostasis del hierro en bacterias

Los sistemas que participan en la homeostasis de hierro se pueden dividir en cuatro categorías: sistemas de adquisición, de utilización, de exportación y de almacenamiento (Fig. 6). La regulación coordinada entre ellos es de suma importancia para mantener los niveles de hierro favorables para la célula.

A continuación, se describirán brevemente los sistemas de adquisición de alta afinidad por el hierro que son activos cuando en el medio las condiciones de disponibilidad del metal son limitantes, luego se presentarán los sistemas implicados en el almacenamiento de hierro, y por último los mecanismos regulatorios implicados en la homeostasis de hierro.

Estrategias de adquisición de hierro

Como se mencionó anteriormente, el abastecimiento de hierro conlleva a un problema debido a su baja disponibilidad biológica, que los organismos deben sortear. Entre las estrategias que utilizan los microorganismos para captar el hierro necesario para sus funciones celulares, la más

simple es la expresión en la membrana de transportadores. En ambientes anaerobios, la forma de hierro predominante es la ferrosa, lo cual no supone un problema en la biodisponibilidad como sucede en aerobiosis. Sin embargo, en ambientes aerobios la forma férrica es la dominante, por lo que para permitir la internalización a pHs neutro o alcalino, es necesaria la expresión de sistemas especializados, de alta afinidad por el hierro que permitan su transporte. En el caso de los iones ferrosos, se piensa que éstos pueden difundir libremente a través de porinas en la membrana externa de bacterias Gram negativas (Rev. por 37) y luego el transporte a través de la membrana interna ocurre mediante transportadores. En *E. coli*, ésto se logra a través del sistema de transporte FeoABC, donde FeoB es una proteína integral de la membrana interna y FeoA y FeoC son proteínas pequeñas citoplasmáticas. En este sistema, el transporte de iones ferrosos es dependiente de GTP (Rev. por 22). Cabe resaltar que no se encontraron genes con homología al sistema Feo en los genomas de *S. meliloti* y *R. leguminosarum* (Rev. por 38). Otro sistema implicado en la adquisición de metales divalentes es el sistema tipo ABC, por ejemplo SfuABC, SitABCD, YfeABCD, FbpABC y FutABC. Sin embargo, no están implicados exclusivamente en la adquisición de hierro. Por ejemplo, se demostró en *S. meliloti* que el sistema SitABC está implicado en el transporte de manganeso (39). Este sistema está compuesto por SitA, una proteína de unión periplasmática, SitCD, la permeasa de membrana interna, mientras que SitB es una ATPasa (Rev. por 40). Otro sistema de tipo ABC reportado con una función en la adquisición del hierro en *S. meliloti* y otras especies relacionadas es Fbp (41). FbpA es una proteína de unión a iones férricos ubicada en el espacio periplasmático, que presenta una gran homología estructural y funcional con la transferrina de mamíferos, por lo que se la ha llamado “transferrina bacteriana” (Rev. por 42).

Otra estrategia ampliamente utilizada tanto por bacterias como por plantas y hongos, es mediada por sideróforos, moléculas de bajo peso molecular que funcionan como quelantes con gran afinidad por el hierro férrico, que son secretados al ambiente en respuesta a una baja disponibilidad de hierro.

Los pasos requeridos para la adquisición de hierro mediada por sideróforos incluyen su síntesis en el citoplasma, secreción, el reconocimiento del complejo ferrisideróforo, la internalización del mismo y por último, la liberación del hierro en el citoplasma.

Los sideróforos se clasifican según el grupo quelante de hierro en: hidroxamatos, catecolatos, carboxilatos, mixtos y otros (Rev. por 43). Otra forma de clasificación basada en su vía de síntesis, los diferencia en dependientes o no de sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS por sus siglas en inglés) (44, Rev. por 45). La cepa *S. meliloti* 1021 sintetiza el sideróforo denominado

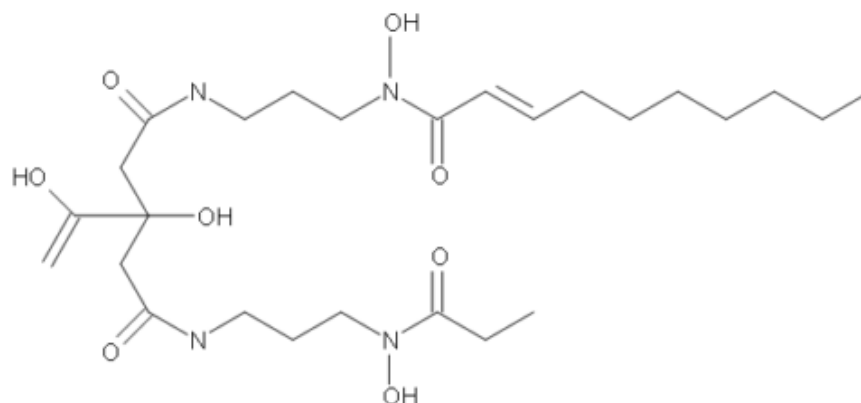


Fig. 7: Estructura de la rizobactina 1021

En esta figura se muestra la estructura del sideróforo producido por la cepa 1021 de *S. meliloti*, rizobactina 1021. Se trata de un sideróforo tipo hidroxamato derivado del citrato, al que se unen dos cadenas acílicas a través de grupos amida. Contiene dos grupos hidroxamatos, unidos a diferentes sustituyentes, uno de cadena corta, y otro de cadena larga. La estructura anfipática de esta molécula permite roles importantes en la interacción con las membranas biológicas. (Tomada de 38, 132)

rizobactina 1021, cuya designación permite diferenciarlo de la rizobactina, un sideróforo estructuralmente diferente que es sintetizado por la cepa DM4 de *S. meliloti*. La rizobactina 1021 (ver Fig. 7) es un sideróforo de tipo hidroxamato derivado del citrato, con dos sustituyentes acílicos (Rev. por 38). La síntesis de la rizobactina es llevada a cabo por proteínas codificadas por los genes agrupados en el operón *rhb*, localizado en el megaplásmido pSymA (Rev. por 38).

Los complejos ferri-sideróforos son internalizados a través de sistemas de transporte específicos. La translocación de los complejos a través de la membrana externa de bacterias Gram negativas es un proceso activo, que requiere energía proveniente de la fuerza protón motriz, la cual es transducida a través del complejo TonB-ExbB-ExbD (Rev. por 22, Rev. por 38). Una vez que los complejos ferri-sideróforos ingresan al espacio periplasmático, son reconocidos específicamente y transportados por una proteína periplásmica hacia la permeasa presente en la membrana interna, donde ocurre su internalización en un proceso dependiente de ATP (42). Una vez en el citosol, el hierro es extraído mediante reducción a ión ferroso, a través de ferri-sideróforo reductasas específicas o no específicas o bien puede ocurrir la hidrólisis del esqueleto del sideróforo. En algunos casos el sideróforo es nuevamente exportado al exterior celular para ser reutilizado (42). En la Fig. 8 se muestra un esquema donde se representa el proceso de adquisición de hierro mediado por sideróforos.

Otra forma de adquirir hierro presente tanto en microorganismos patógenos como no patógenos es a través de la hemina (46), la cual forma parte de las hemoproteínas. Se han descrito sistemas de adquisición de hemo en *R. leguminosarum*, *S. meliloti* y *B. japonicum*, entre otros. Los receptores de hemo se clasifican en dos familias, una de ellas reconoce al hemo

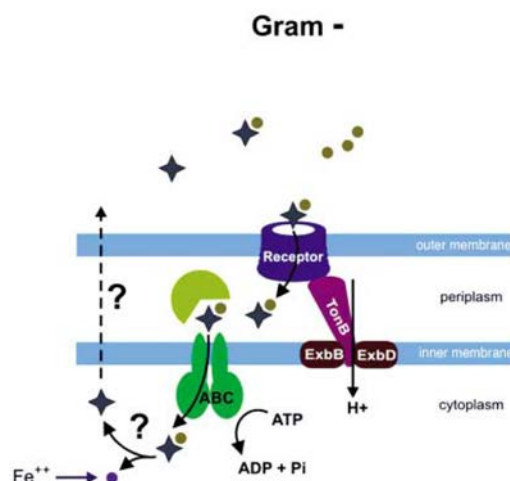


Fig. 8: Adquisición de hierro mediada por sideróforos

En este esquema se representa el mecanismo de adquisición de hierro mediado por sideróforos en bacterias Gram-negativas. Los sideróforos (estrellas) se unen con gran afinidad a iones férricos (círculos grises) en el exterior celular, y el complejo ferri – sideróforo es reconocido por un receptor expresado en la membrana externa, que se encuentra acoplado al complejo TonB-ExbB-ExbD. Una vez en el espacio periplasmático, el complejo ferri-sideróforo es reconocido por una proteína periplasmática que facilita su translocación a través de la membrana interna, por un sistema de transporte tipo ABC. Una vez en el citosol, el hierro es liberado a través de una reacción de reducción, generando iones ferrosos libres y el sideróforo, que puede ser exportado al exterior celular para su reutilización (Tomado de 37)

libre o unido a hemoproteínas como hemoglobina o leghemoglobina, y la otra reconoce el hemo unido a hemóforos (Rev. por 38). Los hemóforos son proteínas secretadas por bacterias, que capturan hemo libre o lo extraen de otras hemoproteínas, y lo presentan a receptores expresados en la membrana externa (Rev. por 47). La internalización de hemo se hace de forma activa al igual que el transporte de sideróforos, con el receptor de membrana externa acoplado al complejo TonB-ExbB-ExbD. Luego de internalizado en la célula, generalmente los grupos hemo son clivados por la acción de hemooxigenasas y el hierro es liberado, en una reacción que produce además CO y biliverdina (Rev. por 38). En algunos casos, los genes que codifican proteínas involucradas en la adquisición de hemo están agrupados con genes que codifican las monooxigenasas responsables de su degradación (Rev. por 37).

Almacenamiento de hierro

Además de regular los mecanismos de adquisición de hierro para asegurar el abastecimiento suficiente para mantener las funciones celulares, las células deben combatir la potencial toxicidad mediada por hierro eliminando el exceso de hierro libre del citosol. Esto se consigue a través de proteínas tipo ferritinas, que almacenan el hierro en exceso en una forma no toxica y biodisponible (Rev. por 48)

La presencia de ferritinas 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, poseen una estructura tridimensional y simetría altamente similar (Rev.

por 49). Las ferritinas propiamente dichas 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 50). 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 51).

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 procariotas (Rev. por 22). Filogenéticamente, las tres proteínas pertenecen a diferentes ramas del árbol de la subfamilia de las proteínas tipo ferritina, y aunque presentan una baja identidad a nivel aminoacídico, estructural y funcionalmente están muy relacionadas, por lo que se ha sugerido la posibilidad de un ancestro común (52–54). Cada subunidad está compuesta por cuatro hélices alfa, designadas A, B, C, y D, que forman el ramillete central, y una quinta hélice E más corta (ver Fig. 9). En el caso de la Dps, la quinta hélice se encuentra en el lazo que une las hélices B y C, por lo que se ha designado como hélice BC (Rev. por 55, 56).

Un rasgo común en las proteínas de almacenamiento de hierro es su estructura en forma de cáscara esférica en cuyo interior se almacena hierro (Fig. 10). En el caso de la ferritina y la bacterioferritina, la estructura está formada por 24 subunidades, en un arreglo con una simetría 4-3-2, refiriéndose al número de subunidades involucrado en cada punto de simetría, mientras que a la Dps la conforman 12 subunidades con simetría 3-3-2 (Rev. por 53). Se ha postulado que el ensamblaje de estas proteínas es espontáneo, y se demostró que en la ferritina de bazo de caballo, el primer intermediario estable es el dímero (Rev. por 57). La interface en los dímeros está conformada por las hélices A y B de cada subunidad, además del loop BC y la región N-terminal del giro AB, formando el eje de simetría 2 (Rev. por 58).

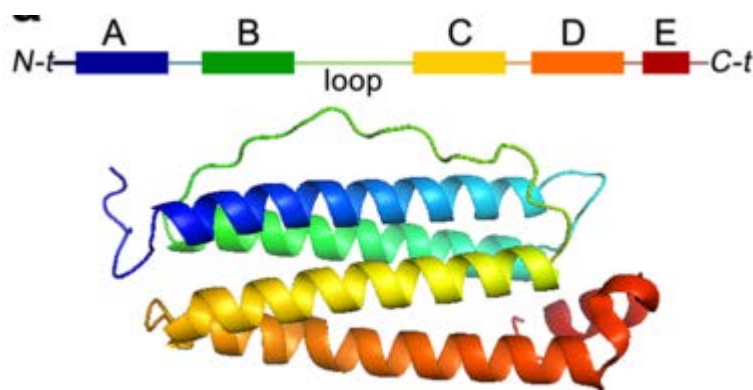


Fig. 9: Estructura de la apoferritina

En esta figura se representa la estructura terciaria de la subunidad de la ferritina y de la bacterioferritina. La misma está formada por cuatro hélices que forman un ramillete, y una quinta hélice corta en el extremo C-terminal (Tomado de 57).

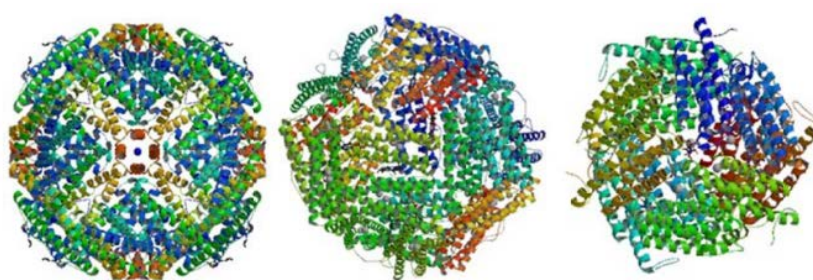


Fig. 10: Estructura cristalográfica de proteínas de almacenamiento de hierro.

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).

Las interfaces entre las subunidades no son cerradas, sino por el contrario, permiten la formación de canales que comunican la cavidad de la proteína con el medio externo. Según el tipo de simetría que presenta la interface, se distinguen los canales tipo 3, tipo 4, encontrados entre subunidades relacionadas a través de simetrías 3 y 4 respectivamente, y un canal en una unión particular entre tres subunidades, denominado canal “B” en la bacterioferritina. Además, el poro ferroxidasa permite el acceso de iones del solvente al centro ferroxidasa de la proteína tipo ferritina, que se encuentra en el centro de cada subunidad en el caso de la ferritina y la bacterioferritina, y en la interface entre dos subunidades en la Dps (Rev. por 57).

Una característica que unifica a las proteínas tipo ferritina, es la capacidad de oxidar iones ferrosos a férricos, para su almacenamiento en la cavidad interna. Los sitios responsables de la oxidación son los centros ferroxidasa. La estructura y el proceso de mineralización que ocurre en los diferentes tipos de ferritina no son únicos, por lo que se tratarán para cada tipo de proteína por separado.

Ferritina

La primera evidencia de la presencia de ferritina en bacterias fue dada por el descubrimiento en *E. coli* de un marco abierto de lectura, denominado *ftnA*, que codificaba un polipéptido de 165

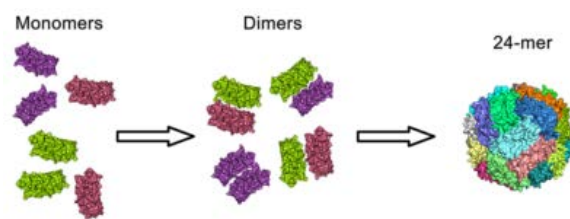


Fig. 11: Ensamblaje espontáneo de las ferritinas

En esta figura se representa el proceso de ensamblaje espontáneo que ocurre en la ferritina y en la bacterioferritina. El primer paso sería la formación de dímeros, que luego interactúan entre ellos para formar la cáscara proteica de 24 subunidades característica de estas proteínas (Tomada de 57)

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 51, 59). 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 59).

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 58). En la ferritina de *E. coli* los ligandos de los sitios A y B son Glu17, His53, Glu50, Glu94 y Glu130, siendo estos aminoácidos conservados en todas las ferritinas estructuralmente caracterizadas, tanto procariotas como eucariotas (Rev. por 60), excepto por el residuo His53, que coordina el sitio B, que en otras ferritinas es sustituido por Asp o Ala (Rev. por 57). El tercer sitio de unión a hierro es el sitio C, el cual sólo ha sido encontrado en ferritinas de procariotas. Este se encuentra coordinado por cuatro residuos Glu, uno de ellos (Glu130) es compartido por el sitio B, de manera que vincula los átomos de hierro en los sitios B y C (Rev. por 49). En la ferritina de *E. coli*, el mecanismo de mineralización del hierro ha sido extensamente estudiado, y ocurriría por lo menos a través de dos vías. En una de ellas, los iones ferrosos se unen al centro ferroxidasa y al sitio C y son oxidados en presencia de oxígeno, generando un intermediario de color azul no caracterizado en el centro ferroxidasa. El ion ferroso en el sitio C sería oxidado, ya sea por el peróxido generado en la reducción de los iones ferrosos del centro ferroxidasa, o a través del intermediario azul. El cuarto electrón para completar la estequiometría de la reacción provendría de un residuo conservado de tirosina ubicado cerca del centro ferroxidasa. En la segunda vía, se unen dos iones ferrosos al centro ferroxidasa, manteniéndose el sitio C libre, y los dos iones son oxidados simultáneamente a férricos, a través del intermediario azul, en un proceso que reduce el O_2 a H_2O_2 . En la Fig. 12 se muestran las posibles vías de la reacción de la ferroxidasa que ocurren en la ferritina.

La función de la ferritina bacteriana se estudió en diversos organismos, como ser *Campylobacter jejuni* (61), *Porphyromonas gingivalis* (62), *Helicobacter pylori* (63), entre otros. 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 por proteína, puede ser usado en condiciones de deficiencia del metal (22). En *E. coli* no se han encontrado un rol definido en la resistencia al estrés oxidativo (64) 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 59).

Dps

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 las diferentes Dps el centro ferroxidasa es altamente conservado, con la excepción de las Archaeas *Pyrococcus furiosus* y *Sulfolobus solfataricus*, cuyos centros ferroxidasa se encuentran en el centro de la subunidad, de forma similar a las ferritinas y bacterioferritinas (55). 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 que ocurre en la ferritina y la bacterioferritina, capaces de utilizar O_2 o H_2O_2 como agentes oxidantes. 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. La capacidad de protección contra H_2O_2 , producto de la reacción de la ferroxidasa, 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 55).

Una característica especial que comparten algunas Dps es su capacidad de unirse al ADN. Esta depende del estado de protonación de residuos de lisina ubicados en el extremo N-terminal de cada subunidad, que en la proteína ensamblada sobresalen de la superficie, lo cual permitiría el contacto con los grupos fosfato presentes en los ácidos nucleicos. Se ha demostrado que la Dps de *E. coli*, a pH fisiológico forma grandes complejos con plásmidos, en una relación de varias Dps por plásmido, generando condensados de ADN (65). Estos residuos de lisina no son los únicos responsables de la capacidad de unión al ADN presente en Dps. En *Mycobacterium smegmatis*

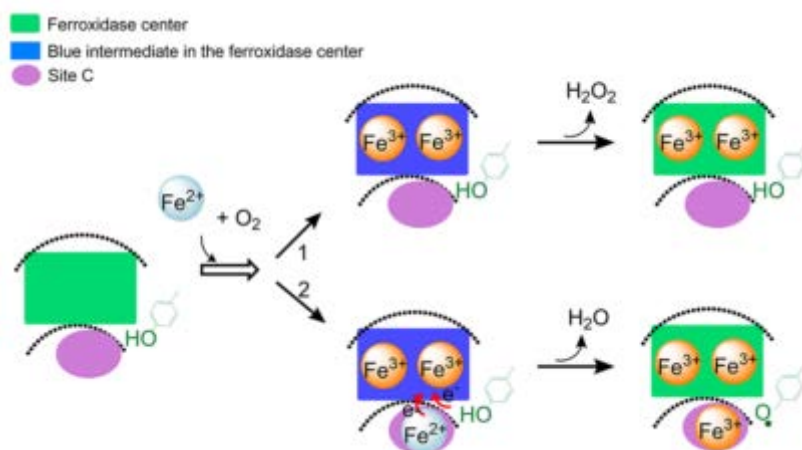


Fig. 12: Mecanismos de reacción de ferroxidación

Mecanismos de oxidación de iones ferrosos en el centro ferroxidasa de la ferritina. En la primera vía, el sitio C se mantiene libre, y los iones ferrosos del centro ferroxidasa son oxidados a través de un intermediario de color azul. En esta reacción, el agente oxidante es el O_2 , que es reducido a H_2O_2 . En la segunda vía esquematizada, los iones ferrosos del centro ferroxidasa también son oxidados a férricos a través del intermediario azul, pero también ocurre la oxidación de un tercer ion ferroso en el sitio C, a partir del intermediario azul, o del H_2O_2 formado en el centro ferroxidasa, rindiendo H_2O (Tomado de 57).

se confirmó que la presencia de 16 aminoácidos en el extremo C-terminal también son necesarios para la unión al ADN, ya que esta zona presenta una gran movilidad, además de cinco residuos aminoácidos positivos (Rev. por 55). Inicialmente se describió que la formación de complejos Dps- ADN se da sin especificidad de secuencia, al igual que como se da en las histonas, pero se ha descrito que Dps es capaz de unirse a proteína nucleolares, además de a secuencias específicas de ácidos nucleicos, participando en la regulación de la expresión génica (Rev. por 55).

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 51). 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 (22). Cada grupo hemo es coordinado por dos residuos de metionina, provenientes cada uno de una subunidad de bacterioferritina (Rev. por 51), en una forma de coordinación bis-tioéster axial,

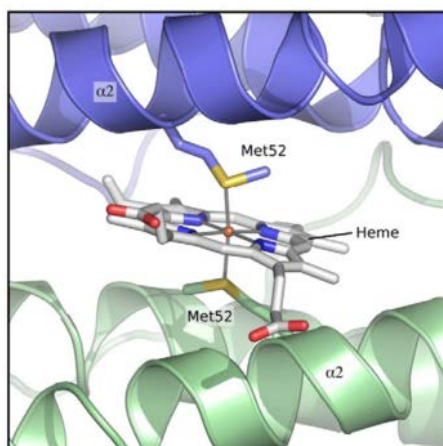


Fig. 13: Coordinación de grupos hemo en bacterioferritinas

Esquema representando la coordinación de un grupo hemo en la interfase entre dos subunidades simétricamente relacionadas en la bacterioferritina de *E. coli*. El grupo hemo se encuentra coordinado por el residuo Met52 de cada subunidad (Tomada de 49).

muy inusual (Rev. por 49). En la Fig. 13 se muestra la coordinación del grupo hemo por dos subunidades de bacterioferritina de *E. coli*.

Las bacterioferritinas contienen centros ferroxidasa intra-subunidad, al igual que las ferritinas. En la Bfr de *E. coli* el hierro del sitio A se encuentra coordinado por los residuos Glu18 e His54, y los ligandos del sitio B son Glu94 e His130. Además, los residuos Glu51 y Glu127 actúan como puente entre los dos sitios (Rev. por 49). En la Fig. 14 se muestran representaciones del centro ferroxidasa de la Bfr de *E. coli*. A diferencia del centro ferroxidasa de la bacterioferritina, en la ferritina uno de los residuos de Glu que actúan como puente entre ambos sitios de unión a hierro es sustituido por un residuo de Gln. El arreglo de dos carboxilatos y dos histidinas en el centro binuclear, y dos carboxilatos actuando como puente entre los sitios A y B, se asemeja al centro di-hierro encontrado en el centro catalítico de enzimas como la ribonucleótido reductasa, metano monooxigenasa, entre otras, que presentan actividad activadora de O_2 , por lo que se sugirió que el centro ferroxidasa en la bacterioferritina podría actuar más como centro catalítico que como sitio de unión al sustrato (66). En las bacterioferritinas no se encontró un equivalente al sitio C, pero se caracterizó un tercer sitio de unión a hierro cercano a la superficie de la cavidad interna de la proteína. Este se encuentra coordinado por los residuos Asp50 e His46 y tres moléculas de agua en la bacterioferritina de *E. coli* (Rev. por 67).

Según el modelo del sitio cofactor en las bacterioferritinas, propuesto por Crow y colaboradores (68), dos iones ferrosos se unen a cada centro ferroxidasa. En presencia de O_2 los iones ferrosos son oxidados, formando un intermediario (per)oxo-diférrico, generándose H_2O_2 . El H_2O_2 generado en un centro ferroxidasa puede reaccionar con los iones ferrosos de otro centro ferroxidasa adyacente, resultando en la formación de un segundo intermediario (per)oxo-

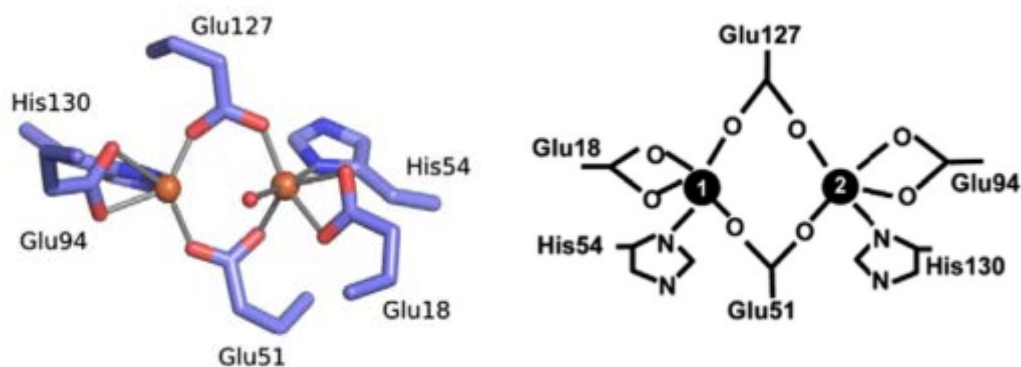


Fig. 14: Centro ferroxidasa de la bacterioferritina

Esquemas que representan el centro ferroxidasa de la bacterioferritina de *E. coli*. El sitio A (1 a la derecha) es coordinado por los residuos His94 y Glu18, mientras que el sitio B (2) es coordinado por los residuos His130 y Glu94. Los residuos Glu127 y Glu51 forman puentes que unen ambos átomos de hierro, que se representan en la figura de la izquierda como esferas rojas (Tomadas de 49).

diférico y de una molécula de H_2O_2 . Los iones ferrosos en exceso entran en la cavidad de la bacterioferritina a través de canales formados en las interfaces entre subunidades. En particular se ha demostrado que acceden allí a través de los poros B (69), y son coordinados por los residuos Asp50 e His46. En este sitio mononuclear, ocurre la autooxidación, y los electrones resultantes son enviados al centro ferroxidasa, donde vuelven a oxidar los iones ferrosos ahí unidos, que quedan disponibles para una nueva reducción de O_2 . El hierro oxidado en el sitio mononuclear es depositado para formar el núcleo mineral de hierro (Rev. por 57, 66, Rev. por 67, 68). En la Fig. 15 se muestra un esquema que representa el mecanismo de mineralización según el modelo de cofactor del centro ferroxidasa de la bacterioferritina.

Los mecanismos que median la liberación del hierro desde el núcleo mineral de las ferritinas no han sido elucidados completamente. En el trabajo de Ebrahimi y colaboradores (57) se sugieren tres mecanismos diferentes que podrían estar involucrados en este proceso. En uno de ellos, los átomos de hierro contenidos en los centros ferroxidasa y en el núcleo mineral son reducidos a iones ferrosos, los cuales son secuestrados por quelantes. Se ha propuesto que los grupos hemo situados en las interfaces entre dos subunidades simétricamente relacionadas participan en este proceso, ya que variantes de bacterioferritina carentes de hemo acumulan más hierro que la bacterioferritina que contiene hemo. Dado que se demostró que el hemo no participa del proceso de mineralización, la mayor cantidad de hierro acumulada por las variantes carentes en hemo puede ser explicada por una disminución en la tasa de liberación de hierro desde el núcleo mineral (70). Yasmin y colaboradores (71) determinaron que el paso limitante en la liberación del hierro de la bacterioferritina es el transporte de electrones hacia la cavidad de la proteína para la reducción de los iones férricos ahí depositados.

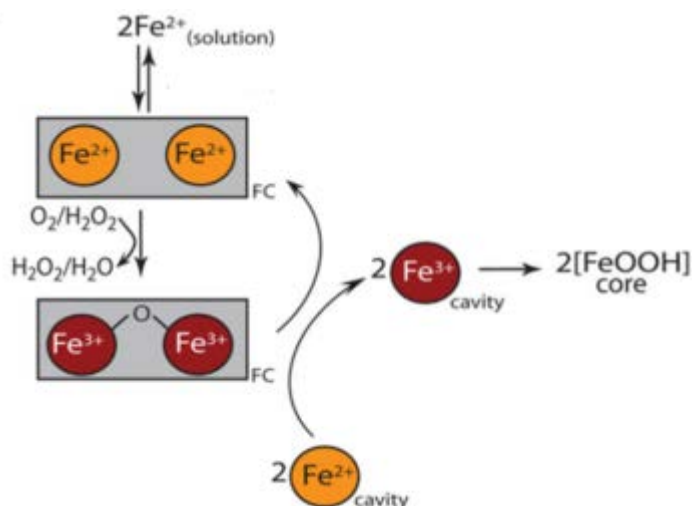


Fig. 15 : Mineralización de hierro en la bacterioferritina

Esquema que representa el mecanismo de mineralización del hierro en la bacterioferritina. Según el modelo de sitio catalítico, en una primera etapa se produce la unión de iones ferrosos a los sitios A y B del centro ferroxidasa. La reducción de una molécula de O_2 a H_2O_2 permite la oxidación del hierro en el centro ferroxidasa, a través de un intermediario (per)oxo-diférrico. El H_2O_2 generado en un centro ferroxidasa es utilizado como oxidante en otro centro ferroxidasa, para la formación de un segundo intermediario (per)oxo-diférrico, generándose H_2O . En el sitio mononuclear localizado en la cavidad interna de la bacterioferritina, se une un ion ferroso, el cual es autooxidado a férrico, el cual pasa a formar parte del núcleo mineral, y los electrones que resultaron de la oxidación son transferidos al centro ferroxidasa para reconstituir el hierro en su forma ferrosa para un nuevo ciclo de oxidación – reducción (Tomada de 67)

Un rasgo común que presentan los genes que codifican bacterioferritinas es la asociación al gen *bfd*, que codifica una ferredoxina denominada Bfd (“*B*acterioferritin *A*ssociated *F*erredoxin”). 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 en *P. aeruginosa* 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 (72).

Recientemente se ha descrito que doce moléculas de Bfd interactúan con una unidad de bacterioferritina, de manera que el clúster $[2Fe-2S]$ se ubica a 22 Å de cada grupo hemo (73), y que esta interacción promueve la transferencia de electrones hacia la cavidad de la bacterioferritina para la movilización del núcleo mineral de hierro (74).

Una observación que favorece el rol de la proteína Bfd en la liberación del hierro desde el núcleo de la bacterioferritina, es su patrón de expresión, ya que a pesar de su vecindad, la expresión de *bfr* y *bfd* es inversa, mientras que la expresión de *bfd* aumenta en condiciones limitantes de hierro, la expresión de *bfr* disminuye. Además se sugiere una posible función de Bfd como represor de la expresión de *bfr* (75).

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 22). A continuación se resumen los roles de algunas bacterioferritinas caracterizadas de diferentes organismos.

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 *bfrB*, dando como resultado que las ambas bacterioferritinas son responsables del almacenamiento de hasta un 50% del hierro intracelular, además de demostrarse que el hierro contenido en las bacterioferritinas es utilizado como fuente de hierro cuando este es escaso (76).

En *Brucella abortus* se demostraron las funciones de almacenamiento de hierro, fuente nutricional de hierro, así como también el de protección contra el estrés oxidativo causado por H_2O_2 . Almirón y Ugalde (77) demostraron que una mutante carente en bacterioferritina en *B. abortus* tiene un menor contenido intracelular de hierro, y que su crecimiento es deficiente frente al de la cepa parental en condiciones de deficiencia de hierro, indicando que el hierro contenido en la bacterioferritina es utilizado como fuente nutricional. Además, demostraron que la mutante secreta mayores cantidades de sideróforos en respuesta al menor contenido intracelular de hierro, pero la replicación de la mutante dentro de fagocitos no se vio comprometida.

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 *bfrA, bfrB* indicaron la importancia de los productos de estos genes, ya que se observó 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 (78).

Otro organismo en el que las proteínas de almacenamiento de hierro fueron caracterizadas funcionalmente fue en *Salmonella enterica* sv. Typhimurium. En un trabajo realizado por Velayudhan y colaboradores (79), se reportó que una mutante carente en bacterioferritina contiene un 50% menos de hierro total intracelular que la cepa parental, mientras que el contenido de hierro libre aumentaba al doble. Esto demuestra la importancia de la presencia de

la bacterioferritina en *S. typhimurium*. Sin embargo, no se demostró un rol en la protección frente al estrés oxidativo de la bacterioferritina.

Regulación de la homeostasis del hierro

Anteriormente se mencionó la potencial toxicidad que confiere una acumulación excesiva de hierro en las células, destacándose la importancia de una regulación coordinada de los sistemas de adquisición y utilización de hierro, para mantener su homeostasis. En esta sección se detallan los mecanismos reportados que actúan sobre la expresión de los sistemas relacionados a la homeostasis del hierro, con énfasis en aquellos que rigen en rizobios.

Fur

La homeostasis de hierro está regulada en función de la disponibilidad de hierro en el medio, siendo Fur (*Ferric Uptake Regulator*) el regulador central descrito en la mayoría de las bacterias estudiadas, tanto Gram negativas como Gram positivas. Fur fue inicialmente descrito en *E. coli* como un represor de la expresión de genes involucrados en la adquisición de hierro, en condiciones de alta disponibilidad de hierro en el medio (80), pero también da el nombre a una superfamilia de proteínas que censan metales y regulan la homeostasis de los mismos, además de participar en la regulación de genes involucrados en la respuesta frente al estrés oxidativo (Rev. por 81). Esta superfamilia se caracteriza por la presencia de un dominio de unión al ADN localizado en el extremo N-terminal, y un sitio de unión a un metal que actúa como regulador y permite la dimerización de la proteína (Rev. por 81). En la Fig. 16 se muestra la estructura de la proteína Fur de *H. pylori* en su forma dimérica.

La regulación mediada por Fur ocurre a partir de la unión del complejo Fe^{2+} -Fur en la región comprendida entre las posiciones -35 y -10 del promotor de los genes que reprime. El sitio reconocido por Fur se denomina caja Fur, y está compuesto por una secuencia palindrómica de 19 pb (Rev. por 22). Sin embargo, se han descrito otras formas de regulación dependientes de Fur a diferentes niveles de la expresión génica.

Otro mecanismo de regulación es mediante la represión del ARN no codificante RyhB. El complejo Fe^{2+} -Fur se une a la caja Fur en la región promotora de *ryhB* en condiciones de disponibilidad de hierro, reprimiendo su expresión. Pero, en condiciones limitantes de hierro, Fur no reprime la expresión de *ryhB*, que actúa uniéndose a ARNs mensajeros de genes blanco, que son luego degradados. Esta activación dependiente indirectamente de Fur se da por ejemplo en el gen *sodB* de *E. coli* (Rev. por 82), y es dependiente de la proteína chaperona Hfq.

La expresión del gen *ftnA* que codifica la ferritina en *E. coli*, es activada por Fur, de una forma independiente de *ryhB*. En este caso se demostró la participación de la histona H-NS en la

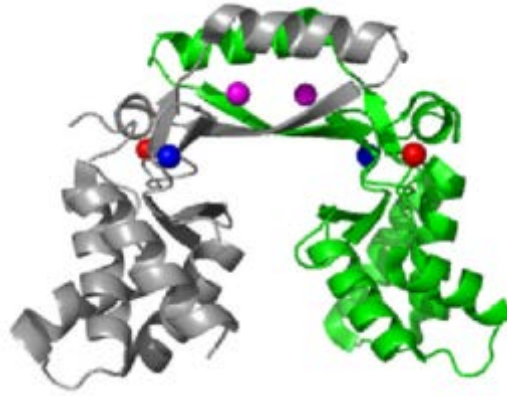


Fig. 16: Estructura de Fur

En esta figura se muestra la estructura de la proteína Fur de *H. pylori* (PDB ID 1MZB) en su estado dímérico. Se representa una subunidad en gris y la otra en verde. Las esferas corresponden a diferentes iones metálicos. En rojo se representa el átomo de zinc involucrado en la estabilidad estructural de la proteína, en azul se muestran los átomos involucrados en la función regulatoria y en lila se muestran los átomos de zinc involucrados en la estabilización del dímero (Tomada de 81).

inactivación de la expresión de *ftnA*. H-NS actúa en el silenciamiento de genes mediante la unión a sitios ricos en AT en la región promotora, impidiendo la unión de la maquinaria transcripcional. El complejo Fe^{2+} -Fur es un represor directo de la expresión del gen *hns*, que codifica la proteína H-NS, de manera que el silenciamiento mediado por H-NS es reprimido por Fe^{2+} -Fur. Sin embargo, Fe^{2+} -Fur también actúa uniéndose a la región promotora de *ftnA*, en una región ubicada entre las posiciones -105 y -65 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción, y su unión es dependiente de la concentración de Fe^{2+} -Fur. A concentraciones de hierro altas, ocurriría una competencia entre Fe^{2+} -Fur y H-NS, de manera que Fe^{2+} -Fur levantaría el silenciamiento provocado por H-NS (83). La unión de Fe^{2+} -Fur a regiones tan distantes como 100 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción ha sido reportado en otras condiciones independientemente del silenciamiento mediado por H-NS. Por ejemplo, en *H. pylori*, Fe^{2+} -Fur se une específicamente a una región ubicada unas 140 pb corriente arriba del sitio de inicio de transcripción del operón *oorDABC*, que codifica para una oxoglutarato oxidoreductasa responsable de la conversión del α -cetoglutarato en succinil-CoA, siendo Fe^{2+} -Fur necesario para su activación (84).

Sistemas de regulación de la homeostasis de hierro en rizobio

En rizobios se identificó una proteína con homología a Fur, definiéndola como el regulador central de la homeostasis del hierro, pero estudios realizados en nuestro laboratorio y por otros grupos independientemente, identificaron su rol en la homeostasis del manganeso, redefiniéndola como Mur (Manganeso Uptake Regulator) (85, 86). Sin embargo, existen excepciones a esta regla en rizobios, dado que en *B. japonicum* Fur mantiene un rol menor en la homeostasis de hierro, al regular los niveles de la proteína Irr (Iron Responsive Regulator) en

una forma dependiente de manganeso, y en *Mesorhizobium loti* y *Rhodobacter capsulatus*, no se encontraron homólogos a Fur, siendo su función en la homeostasis del manganeso cubierta por la proteína MntR (Rev. por 87).

Irr

La proteína reguladora Irr pertenece a la familia de Fur, pero su distribución se reduce a miembros de la familia de las α -proteobacterias (Rev. por 88). Irr fue descrita inicialmente en *B. japonicum*, como responsable de la regulación de los genes implicados en la biosíntesis del hemo, ya que en mutantes carentes de Irr funcional en condiciones limitantes de hierro presentaban una gran acumulación del precursor protoporfirina IX (89). Actualmente se sabe que en *B. japonicum* Irr tiene un gran regulón, y que la mayoría de los genes que responden a hierro también responden a Irr (Rev. por 90). En *B. japonicum* y *R. leguminosarum*, se ha reportado un aumento en su expresión en condiciones limitantes de hierro (91, 92). Sin embargo éste no es el caso en *B. abortus* donde Irr es una proteína estable, cuya actividad no es afectada por el hierro (a diferencia de lo que sucede en el caso de Irr de *B. japonicum*) y donde se ha reportado que Irr reprime su propia expresión en condiciones limitantes de hierro (93).

La proteína Irr de *B. japonicum* se caracteriza por tener dos sitios de unión a hemo: uno de unión a hemo férrico cerca del extremo N-terminal denominado HRM (Heme Regulatory Motif), y otro de unión a hemo ferroso cerca del extremo C-terminal denominado HHH. Se ha demostrado que ambos sitios son necesarios para la degradación dependiente de hierro de Irr de *B. japonicum* (94). *B. japonicum* posee un segundo gen homólogo a *irr*, el cual no presenta el sitio HRM y su función es desconocida. Las proteínas ortólogas a Irr presentes en las especies de *Brucella*, *Agrobacterium*, *Sinorhizobium*, *Rhizobium* y *Mesorhizobium* también carecen el motivo HRM, lo cual sugiere que este motivo es más bien inusual en Irr, por lo tanto la degradación dependiente de hemo en condiciones de disponibilidad de hierro no sería la regla general (92). En la proteína Irr de *R. leguminosarum*, la presencia del motivo HHH es necesaria para su unión al ADN, y por lo tanto para su actividad regulatoria (95).

A diferencia de otras proteínas reguladoras pertenecientes a la familia Fur, en *B. japonicum* Irr no responde directamente a los niveles de hierro intracelular, sino al nivel de hemo endógeno. Esto se produce gracias a la interacción entre la ferroquelatasa, la enzima que cataliza el paso de conversión de protoporfirina IX a hemo, y la proteína Irr (Rev. por 90).

Irr actúa mediante unión a una secuencia presente en la región promotora de los genes que controla, denominada ICE (Iron Control Element) o caja Irr. En *B. japonicum* se demostró que, dependiendo de la ubicación de este motivo en la región promotora del gen regulado por Irr, la

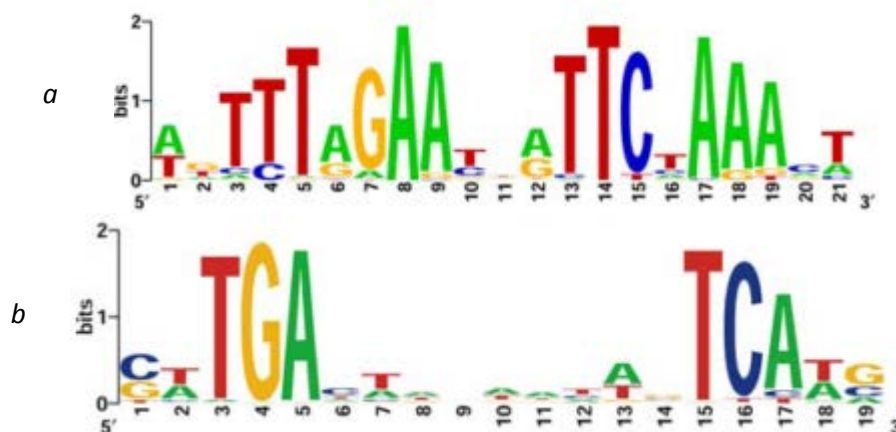


Fig. 17: Secuencias consenso de las cajas Irr (ICE) y RirA (IRO)

Representaciones Logo de las secuencias consenso correspondientes a la caja Irr (sitio ICE, *a*) y la caja RirA (sitio IRO, *b*) presentes en Rhizobiales. (Tomada de 41)

regulación puede ser positiva o negativa (96). La secuencia consenso reconocida por Irr presente en Rhizobiales se muestra en la Fig. 17 (*a*). En *B. abortus* se describió que Irr actúa como dímero (93), al igual como lo hace Fur. En ausencia de hierro, Irr actúa uniéndose al ICE en la región promotora de los genes que controla, reprimiendo o activando su expresión. En presencia de hierro, la unión de hemo inactiva a Irr, ya sea mediante degradación de la proteína (como en *B. japonicum*) o impidiendo su unión a la caja Irr, como ocurre por ejemplo en *R. leguminosarum* (95).

RirA

En muchas α -proteobacterias, Irr no es el único regulador de la homeostasis del hierro, y tampoco el más importante. En éstas, RirA (*R*hizobial *I*ron *R*egulator) es la proteína que asume el rol del principal regulador de la homeostasis del hierro.

La proteína reguladora RirA se describió como el principal regulador dependiente de hierro en *R. leguminosarum* (97). A diferencia de Irr, RirA no presenta similitud de secuencia con la proteína Fur, sino que pertenece a la familia de reguladores transcripcionales Rrf2. La mayoría de los reguladores transcripcionales presentes en esta familia se caracterizan por la presencia de tres residuos de Cys conservados, que podrían estar involucrados en la coordinación de un clúster Fe-S. Sin embargo, en *A. tumefaciens*, una mutación en el gen *sufS2*, involucrado en la síntesis de clústeres Fe-S demostró no afectar la expresión de muchos genes pertenecientes al regulón de RirA, lo cual podría implicar la unión de otro cofactor para la actividad de esta proteína (98). Se han encontrado homólogos a la proteína RirA de *R. leguminosarum* en especies de los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Agrobacterium*, *Mesorhizobium*, *Brucella* y *Bartonella*, pero no existen homólogos en *B. japonicum* (Rev. por 87). También ha sido constante la

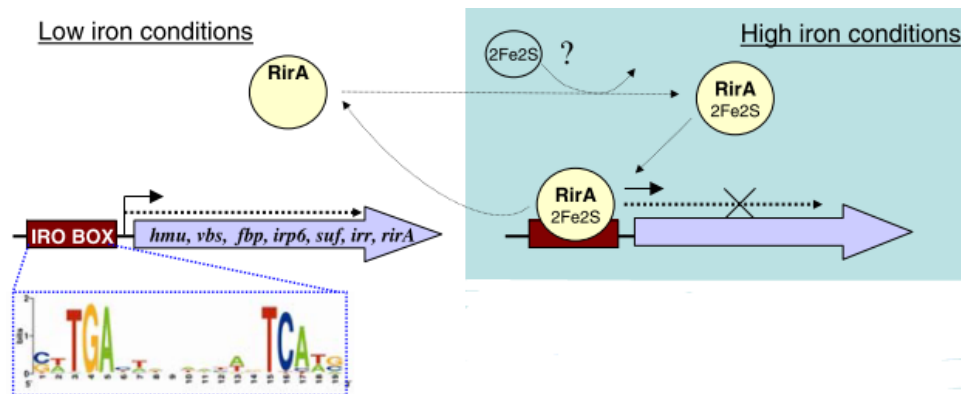


Fig. 18: Modelo de regulación mediada por RirA

(Tomada de 87). Según este modelo, en condiciones limitantes de hierro RirA no se une a su cofactor Fe-S, lo cual le impide unirse a la caja RirA. En condiciones de disponibilidad de hierro, RirA se une al clúster Fe-S, permitiendo su unión a la caja RirA, reprimiendo así la expresión génica.

presencia de un gen involucrado en alguno de los sistemas de adquisición de hierro en el entorno génico de *rirA* (97).

Utilizando fusiones transcripcionales de regiones promotoras de genes posiblemente regulados por hierro, Todd y colaboradores (97) evaluaron la influencia de RirA y de la condición de disponibilidad de hierro en *R. leguminosarum*. Así encontraron que en varios genes cuya expresión disminuye en condiciones de disponibilidad de hierro, en la mutante *rirA* aumenta su actividad promotora indicando el rol de RirA como represor. Este es el caso de los genes *fhuA* y *hmuPSTUV*, involucrados en la adquisición de hierro mediada por ferricromo o por hemo respectivamente (97). Chao y colaboradores (34) demostraron que células de *S. meliloti* carentes de RirA presentan un crecimiento deficiente en presencia de hierro, aumenta su sensibilidad a hemina y a H_2O_2 al ser precultivadas en presencia de hierro, además de aumentar notoriamente la síntesis de sideróforos tanto en condiciones de ausencia como en presencia de hierro (34). Además, se estudió el transcriptoma de la cepa carente en RirA, a través de microarrays en presencia de hierro, y en simbiosis con plantas de alfalfa. En vida libre, en condiciones de disponibilidad de hierro, encontraron que la expresión de 195 genes era modificada por RirA, de los cuales 132 fueron inducidos y 63 reprimidos en ausencia del regulador. Entre los genes inducidos en la mutante $\Delta rirA$, los más afectados fueron los involucrados en la adquisición de hierro (34).

La acción de RirA en la regulación de la expresión génica dependiente de hierro ha sido modelada. Según el modelo propuesto por Rodionov y colaboradores (41), RirA censuraría los niveles intracelulares de hierro, no directamente pero sí a través de un cofactor asociado, que podría tratarse del clúster Fe-S, activando la proteína en condiciones suficientes de hierro, la cual actuaría uniéndose a secuencias conservadas en la región promotora de los genes

	Genes						
Organismo	<i>fhuBC</i> D	<i>fatBC</i> D	<i>fbpAB</i> C	<i>bfd-bfr</i>	<i>sufSB</i> CD	<i>fssA</i>	<i>rirA</i>
<i>S. meliloti</i>							
<i>R. leguminosarum</i>							
<i>R. etli</i>							
<i>A. tumefaciens</i>							
<i>M. loti</i>							

Fig. 19: Presencia de IRO e ICE en genes de distintas especies de rizobios

En esta tabla se esquematizan los sitios de unión a las proteínas regulatorias presentes en la región promotora de diferentes genes que responden al hierro. En verde se representan los genes que contienen caja *Irr*, en azul los que contienen caja *RirA*, y en blanco los que no contienen ninguno de los dos sitios. (Adaptada de 41).

pertenecientes a su regulón, denominadas IRO (*I*ron *R*esponsive *O*perator) o simplemente caja *RirA*, reprimiendo la expresión de genes que no son necesarios en esas condiciones, como por ejemplo, los involucrados en los sistemas de adquisición de alta afinidad por hierro. En la Fig. 17 (b) se muestra la secuencia consenso reconocida por *RirA* y en la Fig. 18 el modelo propuesto por Rodionov y colaboradores (41).

*Acción coordinada de *Irr* y *RirA*.*

Como se mencionó anteriormente, en las especies pertenecientes al orden Rhizobiaceae, están presentes las proteínas reguladoras *Irr* y *RirA*, ejerciendo una acción concertada para permitir la homeostasis del hierro. De hecho, se ha demostrado en *A. tumefaciens* que la homeostasis del hierro se da gracias a la coacción de ambas proteínas, cuyos regulones se superponen en muchos genes. Los niveles intracelulares de hierro libre son afectados en las cepas *Irr*- y en *RirA*-, siendo menores en el primer caso y mayores en el segundo, pero resultan similares a los de la cepa parental en la doble mutante *Irr-RirA*-, indicando que las dos proteínas ejercen acciones complementarias para mantener la homeostasis del hierro (32). Muchos genes se encuentran bajo la regulación mediada tanto por *Irr* como por *RirA*, debido a la presencia de los sitios IRO e ICE en sus regiones promotoras, pero además, la regulación conjunta puede darse de forma indirecta debido a la regulación ejercida entre los propios reguladores. Así es que en *A. tumefaciens*, *Irr* reprime la expresión de *rirA* de una forma no dependiente de hierro, y *RirA* se autoreprime en condiciones suficientes de hierro. En la Fig. 19 se muestra la presencia de los sitios IRO y/o ICE en diferentes genes regulados por hierro, presentes en especies de rizobios.

El entorno génico de *bfr* en *S. meliloti* 1021

El genoma de *S. meliloti* 1021 se compone de un cromosoma circular de 3,6 Mpb y dos megaplásmidos, denominados pSymA y pSymB con 1,4 y 1,7 Mpb cada uno respectivamente.

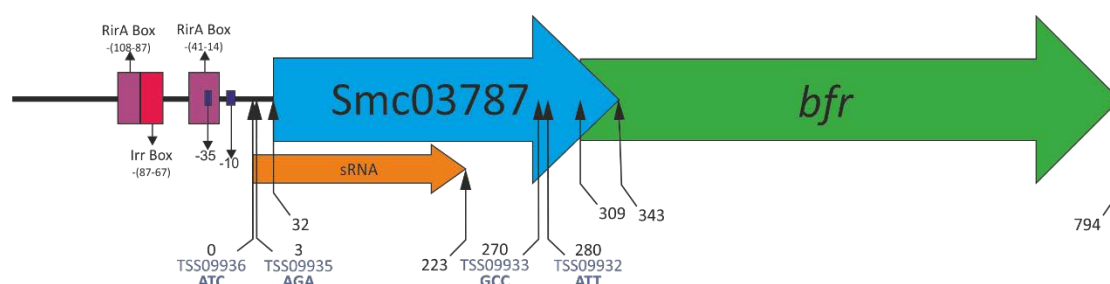


Fig. 20: Entorno génico de *bfr*

Esquema donde se representa el gen que codifica la bacterioferritina SMc03786 (verde) y su entorno génico. Solapando parcialmente a *bfr* se encuentra el ORF SMc03787 (celeste), que codifica una proteína hipotética con homología con la superfamilia de ferredoxinas asociadas a la bacterioferritina (Bfd). Los sitios de unión a las proteínas reguladoras Irr (rojo) y RirA (violeta) se encuentran aguas arriba de SMc03787, indicándose en cada caso su ubicación entre paréntesis. En azul se indican los sitios de inicio de la transcripción reportados por Schlüter y colaboradores (100). Se indica a su vez la localización del ARN pequeño SmelC759 (naranja) solapando parcialmente a SMc03787. En azul oscuro se esquematizan los elementos -10 y -35 aguas arriba de SMc03787. Los números de las posiciones se indican tomando como origen el TSS09936.

Éste se encuentra completamente secuenciado y disponible a través de la página web <https://iant.toulouse.inra.fr/bacteria/annotation/cgi/rhime.cgi>. Al realizar la búsqueda de genes que codificaran proteínas de almacenamiento de hierro mediante el algoritmo BLAST, utilizando como *query* las secuencias aminoacídicas de proteínas de almacenamiento de hierro ya caracterizadas de otros organismos procariotas, se encontró un único ORF, designado SMc03786 que codifica una probable bacterioferritina (99). Este 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, con homología a la superfamilia de ferredoxinas asociadas a bacterioferritina (Bfd). La búsqueda de dominios conservados sobre la secuencia del gen *bfr* dio como resultado la presencia de todos los residuos involucrados en motivos de unión a hemo, centros ferroxidasa, y poros ferroxidasa, que son característicos de las bacterioferritinas (99). Solapando parcialmente a SMc03787 se encuentra el ARN pequeño SmelC759, entre las posiciones 3.452.260 a 3.452.037 en la hebra (-). Los sitios de inicio de transcripción reportados por Schlüter y colaboradores (100) en la vecindad del gen *bfr* son los designados SMc_TSS09932, SMc_TSS09933, SMc_TSS09935 y SMc_TSS09936. Los sitios SMc_TSS09935 y SMc_TSS09936 (éste último responsable del sitio de inicio de la transcripción de SmelC759) se encuentran inmediatamente corriente arriba de SMc03787, mientras que los sitios TSS09932 y SMc_TSS09933 se encuentran inmediatamente corriente arriba del gen *bfr*.

En la región corriente arriba de SMc03787, en las posiciones -108 y -41 con respecto a SMc_TSS09936 comienzan dos cajas RirA, encontrándose la segunda solapando el elemento -35 y parte del espaciador del promotor. Además, entre las posiciones -87 y -67 se encuentra una posible caja Irr.

En la Fig. 20 se muestra un esquema representativo de la región que contiene a *bfr*, con los sitios de inicio de la transcripción reportados por Schlüter y colaboradores (100) y los posibles sitios de unión a Irr y a RirA.

Alrededor de 250 pb corriente abajo de *bfr*, se encuentra el ARN pequeño designado SmelC0758, aún no caracterizado. Corriente arriba de SMc03787, el gen más cercano corresponde a *dnaE2* que codifica una probable ADN polimerasa y su ORF finaliza unas 280 pb corriente arriba del inicio de SMc03787.

Hipótesis

El gen *bfr* codifica la bacterioferritina, la única proteína de almacenamiento de hierro codificada en el genoma de *S. meliloti*, y es importante para mantener la homeostasis de hierro tanto en vida libre como en su etapa endosimbiótica.

Dada la importancia de mantener los niveles de hierro dentro de límites estrechos en función de las condiciones ambientales, la regulación de la expresión del gen *bfr* es compleja, involucrando al menos a las proteínas Irr y RirA.

Objetivos generales

Determinar la importancia de los sistemas de almacenamiento de hierro en *Sinorhizobium meliloti*.

Objetivos específicos

- Determinar la regulación de la expresión del gen *bfr* y en particular la participación de las proteínas Irr y RirA en su regulación
- Determinar si la bacterioferritina es esencial para el almacenamiento de hierro
- Analizar el papel de la bacterioferritina en la respuesta al estrés oxidativo
- Determinar la importancia de la participación de la bacterioferritina en la interacción simbiótica con la planta hospedera.

Capítulo I

Análisis de la expresión del gen de la bacterioferritina de *S. meliloti* 1021

Resumen

El objetivo de este capítulo fue determinar bajo qué condiciones se expresa el gen de la bacterioferritina en la cepa 1021 de *S. meliloti* y analizar el rol de las proteínas Irr y RirA y de un pequeño ARN codificado en forma solapada con el ORF SMc03787.

Para abordar estas interrogantes, primeramente, se construyó una mutante en la región codificante de *bfr* mediante la inserción del cassette *lacZGmR*. Esta aproximación permite evaluar la expresión del gen *bfr* a través de medidas de la actividad betagalactosidasa en diferentes condiciones de disponibilidad de hierro. Los resultados obtenidos mostraron un gran aumento de la expresión de *bfr* en condiciones de disponibilidad de hierro en el contexto salvaje. Al realizar el ensayo en la doble mutante *bfr::lacZGmR irr* se observó que la actividad aumenta aún más en presencia de hierro, y que disminuye también en mayor proporción con respecto al contexto génico salvaje, indicando que esta proteína cumple un papel en la regulación del gen de la Bacterioferritina en *S. meliloti* en respuesta al hierro. Es de destacar que este es el primer trabajo donde se comprueba una función para la proteína Irr de *S. meliloti*.

Considerando los sitios de inicio de la transcripción reportados en la región que contiene a *bfr*, se evaluaron diferentes regiones como candidatas a tener actividad promotora y se evaluó la capacidad de inducir la expresión del gen reportero *gfp* en diferentes condiciones de disponibilidad de hierro en las cepas de *S. meliloti* 1021 salvaje, en la mutante *irr*, en la mutante *rirA* y en la doble mutante *irr/rirA*.

Se consideraron tres abordajes diferentes para la evaluación de la fluorescencia emitida por las células portadoras de las construcciones de las regiones promotoras en pOT1: primeramente, en medio sólido, donde se estiraron las diferentes cepas conteniendo las fusiones génicas con agregado de hierro y de quelante respectivamente. Con esta aproximación se detectó mayor fluorescencia en los medios con agregado de hierro, aunque en estas condiciones el crecimiento bacteriano fue considerablemente mayor. Seguidamente, se evaluó la fluorescencia en medio de cultivo líquido espectrofotométricamente, normalizando los resultados según el crecimiento bacteriano. En este caso se encontró una mayor expresión en condiciones de deficiencia de hierro, lo cual indica que la actividad promotora de la región estudiada es menos activa en presencia de hierro, al contrario de lo que se observó mediante los ensayos betagalactosidasa. A su vez se observaron cambios en la expresión de fluorescencia en los diferentes contextos génicos, indicando que las proteínas Irr y RirA actúan en la regulación de SMc03787. Se determinó que en ausencia de hierro, la expresión de fluorescencia es menor en la mutante *irr*

que en la cepa salvaje, lo cual indicaría un rol activador de esta proteína. En el caso de la mutante *rirA*, se observó también una menor expresión en ausencia de hierro con respecto a la cepa salvaje, pero en presencia de hierro fue mayor que en el contexto génico salvaje, lo cual estaría indicando un rol de la proteína RirA en ausencia de hierro como activador, y en presencia de hierro como represor. Sin embargo al analizar la doble mutante *irr/rirA*, se observó que la expresión de fluorescencia fue alta tanto en presencia como en ausencia de hierro. Por último se evaluó la fluorescencia de los cultivos mediante citometría de flujo, obteniéndose los mismos resultados que se registraron mediante las mediciones espectrofotométricas, pero se observó que en el caso de RirA para la construcción P3787 y en la doble mutante *Irr/RirA*, tanto en presencia como en ausencia de hierro, la distribución de la fluorescencia en la población no fue homogénea, sino que se distinguían poblaciones con diferentes perfiles de expresión de fluorescencia.

Una tercera aproximación al estudio de la expresión de *bfr* fue mediante qRT – PCR, en la que se evaluó la abundancia de los transcritos correspondientes a tres zonas dentro de la región de *bfr*. Se encontró que en todos los contextos génicos estudiados, los perfiles de expresión de los transcritos ubicados corriente arriba de *bfr* son opuestos a los encontrados en el transcritos correspondiente a *bfr*, lo cual estaría indicando que la expresión de *bfr* está condicionada negativamente por la expresión de la región ubicada corriente arriba del mismo.

En resumen, los datos obtenidos indican que la regulación del operón que contiene el gen *bfr* es compleja e involucra al menos tres actores: las proteínas *Irr* y *RirA* y a un pequeño ARN. Los resultados que se presentan permiten proponer un modelo de regulación en condiciones de presencia de hierro.

Hipótesis

La expresión de la bacterioferritina de *S. meliloti* responde a la presencia de hierro e involucra la acción de diferentes proteínas reguladoras y/o efectoras que actúan a diferentes niveles, entre ellas a los reguladores transcripcionales RirA e Irr.

Objetivos generales

Dilucidar los mecanismos que actúan sobre la regulación de la expresión del gen *bfr* en *S. meliloti* 1021 utilizando diferentes estrategias experimentales.

Objetivos específicos

- Determinar si la expresión del gen *bfr* de *S. meliloti* está regulada por hierro.
- Establecer el rol de las proteínas Irr y RirA como reguladoras de la transcripción de *bfr*
- Dilucidar los mecanismos de regulación que actúan sobre la expresión de la bacterioferritina de *S. meliloti* en diferentes condiciones de disponibilidad de hierro.
- Elaborar un modelo de expresión que explique los resultados obtenidos en presencia y en ausencia de hierro

Materiales y métodos

Cepas y medios de cultivo

Las cepas empleadas en este trabajo se muestran en la Tabla 1. Las cepas de *E. coli* fueron crecidas en medio rico LB (101), a 37°C . Las cepas de *S. meliloti* fueron crecidas en el medio rico TY (102), o en los medios definidos M3 o M9 (ver composiciones en el Anexo II: Composición de medios de cultivo). En los casos requeridos los medios se suplementaron con los siguientes antibióticos: Ampicilina (Amp), gentamicina (Gm), streptomycin (Str) o spectinomicina (Spc), y su concentración final en µg/ml se indica en subíndice. Los medios sólidos fueron preparados con una concentración de agar de 18 g/l.

Los plásmidos utilizados se detallan en la Tabla 2.

Tabla 1: Cepas bacterianas

Cepa	Características relevantes	Referencias
<i>S. meliloti</i> 1021 (wt)	Derivada de <i>S. meliloti</i> 259 resistente a Str	(103)
<i>S. meliloti</i> 1021 irr- (Irr)	Derivada de <i>S. meliloti</i> 1021 con la inserción del cassette Ω en irr. Spc ^R	E. Fabiano (no publicado)
<i>S. meliloti</i> 1021 rirA- (RirA)	Derivada de <i>S. meliloti</i> 1021 con una delección <i>in frame</i> en el gen <i>rirA</i>	(34)
<i>S. meliloti</i> 1021 irr-rirA- (IrrRirA)	Derivada de <i>S. meliloti</i> 1021 <i>rirA</i> - con la inserción del cassette Ω en irr	V. Amarelle, A. Cardeillac (no publicado)
<i>S. meliloti</i> 1021 <i>bfr::lacZGmR</i> (Bfr-)	Derivada de <i>S. meliloti</i> 1021 con la inserción del cassette <i>lacZGmR</i> en <i>bfr</i>	Este trabajo
<i>S. meliloti</i> 1021 irr- <i>bfr::lacZGmR</i> (Irr-Bfr-)	Derivada de <i>S. meliloti</i> 1021 irr- con la inserción del cassette <i>lacZGmR</i> en <i>bfr</i>	Este trabajo
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17</i> <i>recA1endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	(104)

Tabla 2: Plásmidos utilizados

Plásmidos	Características relevantes	Referencias
pK18 <i>mobsacB</i>	Vector suicida en <i>S. meliloti</i> , con el gen <i>sacB</i> , Km ^R	(105)
pK18 <i>mobsacB</i> – <i>bfr::lacZGmR</i>	pK18 <i>mobsac</i> conteniendo el gen <i>bfr</i> interrumpido por el cassette <i>lacZGmR</i>	(99)
pOT1	Vector replicable en rizobio, incluye el gen GFP sin promotor propio corriente abajo del MCS. GmR	(106)
pOT1 P3787	Vector pOT1 con el amplicón P3787 clonado entre los sitios HindIII y XbaI	Este trabajo
pOT1 P3787T	Vector pOT1 con el amplicón P3787T clonado entre los sitios HindIII y XbaI	Este trabajo
pOT1 Pbfr	Vector pOT1 con el amplicón Pbfr clonado entre los sitios HindIII y XbaI	Este trabajo
pOT1 PbfrT	Vector pOT1 con el amplicón PbfrT clonado entre los sitios HindIII y XbaI	Este trabajo

Amplificaciones por PCR

Las reacciones de amplificación en general se realizaron utilizando la premix detallada en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, en reacciones de 25 µl. Cuando fue necesario minimizar la tasa de errores durante la amplificación se utilizó la enzima Pfu ADN polimerasa, de lo contrario se utilizó Taq. Al utilizar la enzima Pfu Polimerasa, se empleó el buffer conteniendo MgCl₂. En todos los casos se agregaron controles negativos sin el agregado de ADN molde. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Bioer GenePro. Los programas utilizados se describen en cada caso.

Extracciones de ADN genómico de *S. meliloti*

La purificación de ADN genómico bacteriano se realizó según el protocolo descrito por Ausubel y colaboradores (107) con algunas modificaciones. Se partió de cultivos puros de *S. meliloti* en medio sólido TYStr₁₀₀, de los que se tomaron colonias aisladas para inocular 5 ml de TYStr₁₀₀ 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. 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 pH 8 (ver Anexo III: Composición de soluciones y buffers), 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 agregaron 0,2 mg de lisozima y para la degradación del ARN se utilizaron 3 mg de ARNasa A, se mezcló mediante inversión y se incubó 30 min a 37°C. A continuación se agregaron 0,4 mg de proteinasa K y 100 µl sarcosil 12 % (m/v) y se incubó una hora a 37°C. Se realizaron luego una serie de extracciones orgánicas para eliminar impurezas del ADN; para ellos 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.

Extracciones de ADN plasmídico

Las extracciones de ADN plasmídico se realizaron utilizando un kit comercial, o según el método de lisis alcalina, descrito por Sambrook y colaboradores (108), como se describe a continuación: 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 Anexo III: Composición de soluciones y buffers). 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.

Visualización de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos extraídos fueron sometidos a separaciones electroforéticas en geles de agarosa 1 % (m/v) en TAE 1x, con 2,5 µl de SYBR Safe (Life Technologies) incorporado. Para los geles de ARN se adicionó formaldehído 6% (v/v) a la agarosa fundida. Las corridas electroforéticas se realizaron en el buffer TAE 1x, por aproximadamente 40 min a 90 V. Como estándar de pesos moleculares se utilizaron las soluciones comerciales 1 kb DNA Ladder y DNA Ladder Plus (Thermo Scientific).

Preparación de células competentes

El protocolo seguido para la preparación de células competentes fue adaptado del descrito por Ausubel y colaboradores (107). Se partió de una colonia de *E. coli* DH5α a partir de un cultivo fresco en medio sólido 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 DO a 620 nm (DO_{620}) de 0,2 a 0,4. A continuación se cosecharon las células en tubos estériles fríos mediante centrifugación 5 min a 2300 xg a 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 suavemente 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 uso, fraccionadas en alícuotas de 100 µl.

Transformaciones

La inserción de ADN foráneo a las células se realizó mediante el método de shock térmico, descrito por Sambrook y colaboradores (108). Brevemente, a 100 µl de células competentes se agregó una solución del plásmido, de manera que la concentración de ADN no superase los 50 ng/10 µl. 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.

Extracciones de ADN a partir de geles de agarosa

Cuando fue necesario trabajar con fragmentos de ADN purificados, los mismos fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa y el ADN fue extraído utilizando los kits comerciales QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen) o Isolate II PCR and Gel Kit (Bioline), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para comprobar la calidad del ADN extraído y cuantificar su contenido, se realizaron corridas electroforéticas en geles de agarosa 1% (m/v). Se cuantificó el ADN purificado mediante comparación con un estándar comercial de concentración conocida y/o utilizando un NanoDrop Thermo Scientific.

Reacciones con enzimas de restricción

Las digestiones con enzimas de restricción se realizaron siguiendo las sugerencias de los fabricantes. En todos los casos se utilizó una concentración enzimática de 0,3 a 0,5 U/µl y el buffer de reacción suministrado con la enzima. Dependiendo de los requerimientos, se utilizaron diferentes concentraciones de ADN en las diferentes digestiones.

Reacciones de ligación

Las reacciones de ligación se realizaron utilizando la enzima T4 DNA Ligase (Thermo Scientific) con el buffer de reacción suministrado, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se utilizó una relación vector:inserto 1:10, y las reacciones fueron incubadas 12 horas a 16°C.

Conjugaciones triparentales

Para la movilización de los plásmidos recombinantes hacia cepas de *S. meliloti*, se realizaron conjugaciones triparentales. Para esto, el primer día se inocularon las cepas aceptoras en TY líquido con los antibióticos adecuados. El segundo día se inoculó el medio LB líquido con antibióticos, con las cepas de *E. coli* dadoras y la cepa colaboradora pRK2013. El tercer día, se inoculó el medio TY sin antibióticos con 100 µl de los cultivos de rizobios y luego de 2 horas el medio LB líquido con 100 µl de los cultivos de *E. coli*. Los cultivos se dejaron creciendo a las temperaturas adecuadas. Cuando los cultivos alcanzan DO₆₂₀ de 0,1 a 0,2, se realizaron

filtraciones utilizando membranas de nitrocelulosa de 45 nm de diámetro de poro. Para esto, se realizaron mezclas de las cepas dadoras, aceptora y colaboradora y se pasaron a través de los filtros. Como controles se realizó el mismo procedimiento con los cultivos por separado. Luego, se colocaron las membranas sobre la superficie de TY sólido sin antibióticos, con la cara que contiene las células hacia arriba, y se incubaron 24 hs a 30°C. Luego, las células depositadas en los filtros se suspendieron en 1 ml de TY y alícuotas de la mezcla se sembraron en medio sólido TY con los antibióticos adecuados para la selección de las células transconjugantes, y las células se incubaron a 30°C hasta la aparición de colonias.

Construcción de la mutante Bfr-

Material de partida.

Para la construcción de la cepa mutante *S. meliloti* 1021 *bfr::lacZGm^R* se partió de construcciones obtenidas anteriormente. La metodología para su obtención se esquematiza en la Fig. 21. Brevemente, la región *bfr*₁₂ [que consiste en el ORF SMC03787 y el gen *bfr* flanqueados por aproximadamente 1000 pb corriente arriba de SMC03787 y 1000 pb corriente abajo de *bfr* respectivamente (Fig. 21 a)], fue clonada en el vector pBSK, obteniéndose la construcción pBSK-*bfr*₁₂ (Fig. 21 b). A partir de esta construcción se efectuó la amplificación del fragmento *bfr*₃₄ (Fig. 21 c), el cual se clonó en pBSK, obteniéndose la construcción pBSK-*bfr*₃₄ (Fig. 21 d). Para la inserción del cassette *lacZGm^R* se realizó una PCR inversa a partir de la construcción pBSK-*bfr*₃₄ utilizando los cebadores específicos *bfr*₅ y *bfr*₆, los cuales contienen secuencias adaptadoras que contienen sitios de restricción para la enzima EcoRV. Una vez obtenido este amplicón (Fig. 21 e), fue digerido con EcoRV y recircularizado, obteniéndose el plásmido pBSK-*bfr* Δ (Fig. 21 f), que contiene una delección en la región central del gen *bfr* de 216 pb. En el sitio de restricción que se generó luego de la recircularización del plásmido se clonó un fragmento de 4200 pb que contiene los genes *lacZ* y *Gm^R*, obtenido mediante digestión con la enzima SmaI a partir del plásmido pAB2001. Así se obtuvo la construcción pBSK *bfr::lacZGm^R* (Fig. 21 g). Para transferir la construcción obtenida al rizobio, se clonó el inserto en el vector conjugativo pK18*mobsacB* (Fig. 21 h), el cual es no replicativo en rizobio.

Transferencia del alelo portador de la mutación a diferentes contextos génicos de S. meliloti 1021.

La transferencia del alelo portador de la mutación *bfr::lacZGm^R* hacia células de *S. meliloti* se realizó mediante conjugación triparental, en la que células de *E. coli* DH5 α pK18*mobsacB-bfr::lacZGm^R* actuaron como dadoras, *E. coli* DH5 α pRK2013 actuó como cepa colaboradora, y *S. meliloti* 1021 y su mutante isogénica Irr- actuaron como cepas aceptoras.

La utilización de esta técnica para la movilización de plásmidos hacia *S. meliloti* es necesaria, ya que hasta el momento no ha sido posible obtener células competentes para la transformación mediante shock térmico con eficiencias aceptables. La transferencia alélica desde el vector hacia el genoma aceptor, se da gracias a la presencia de regiones homólogas extensas que flanquean la mutación practicada, permitiendo su recombinación. El plásmido utilizado como vehículo para la transferencia de la mutación es derivado del plásmido pBR322 y se basa en el replicón pMB1 (105). Debido a esto, puede aislarse en un alto número de copias en *E. coli*, pero no es replicativo en rizobio, por lo que su permanencia en la célula depende de su integración al cromosoma. Por otro lado, el plásmido pRK2013 se ha utilizado con éxito como colaborador en conjugaciones triparentales, ya que posee los genes *tra* necesarios para la movilización del vector que contiene el sitio *mob* (en este caso, el portador de la variante alélica) a la cepa aceptora y no es estable en rizobio (109).

Primeramente, se inocularon varias colonias aisladas de la cepa aceptora *S. meliloti* 1021 en 5 ml de TYStr₁₀₀ y en el caso de la mutante *S. meliloti irr*, TY Str₁₀₀Spc₁₀₀. Al día siguiente se realizaron los precultivos de *E. coli* DH5α pK18*mobsacB-bfr::lacZGmR* en 5 ml de LBKm₅₀Gm₁₀ y de *E. coli* DH5α pRK2013 en 5 ml de LBKm₅₀. Luego de 24 horas de incubación a 37°C, se transfirieron 100 µl de los cultivos de *S. meliloti* a 5 ml de TY fresco sin agregado de antibióticos y dos horas más tarde se transfirieron 100 µl de cada cultivo de *E. coli* a 5 ml de LB. Luego de unas horas de incubación a 30°C (hasta lograr una DO₆₂₀ de aproximadamente 0,2), se procedió al filtrado de las cepas en membranas estériles de nitrocelulosa, de 45 nm de diámetro de poro. En los filtros se depositaron mezclas conteniendo cultivos de las cepas aceptora, dadora y colaboradora en proporción 5:1:1 y 5:2:2 respectivamente. Además se realizaron controles en los que se filtró cada cepa por separado. Las membranas conteniendo las células bacterianas fueron colocadas sobre la superficie de TY sólido dispuesto en placas de Petri, con la cara que contiene las células hacia arriba, y toda la superficie inferior en contacto con el medio de cultivo. Las placas con las membranas fueron incubadas a 30°C toda la noche. A continuación se resuspendieron las células en 1 ml de TY y se plaquearon alícuotas de 100 µl en medio TYStr₂₀₀Nm₁₀₀Gm₅ y se incubaron a 30°C hasta la aparición de colonias.

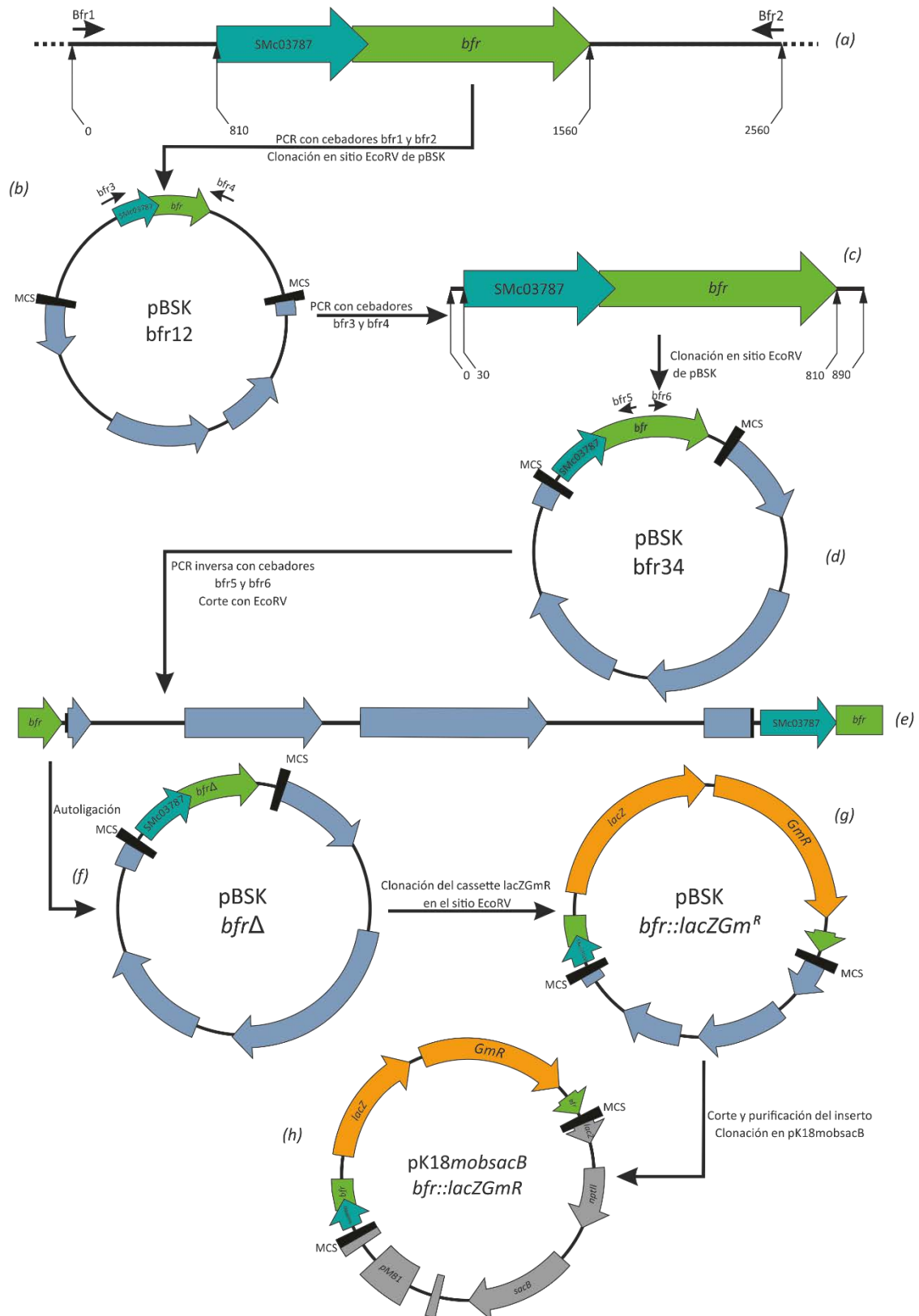


Fig. 21: Obtención del vector pK18-bfr::lacZGm^R

En esta figura se representa de forma esquemática los pasos seguidos para obtener el vector pK18 *bfr::lacZGm^R*, que fue el material de partida de este trabajo.

Selección del doble evento de recombinación homóloga.

Las colonias obtenidas en el medio TYStr₂₀₀Nm₁₀₀Gm₅ se repicaron en TYStr₂₀₀Nm₁₀₀Gm₅ y se crecieron 48 hs a 30°C. Colonias aisladas se inocularon en 5 ml de TY sin antibiótico y los cultivos se crecieron 24 hs. Considerando que una suspensión celular de rizobio con una DO₆₂₀ de 1 contienen aproximadamente 1×10^9 unidades formadoras de colonia (UFC), se realizaron diluciones de forma de obtener suspensiones conteniendo aproximadamente 2×10^6 UFC en 100 µl. Se inocularon alícuotas de 100 µl de los cultivos diluidos en medio TYStr₂₀₀Sac_{15%}Gm₅ sólido, y se incubaron a 30°C hasta la aparición de colonias. Estas colonias se repicaron en forma ordenada en medio sólido TYStr₂₀₀Sac_{15%}Gm₅, y se usaron como molde para repicar en TYStr₂₀₀Gm₅Nm₅₀ por medio de una multianza. Se seleccionaron las colonias que crecieron en TYStr₂₀₀Sac_{15%}Gm₅, pero no en TYStr₂₀₀Gm₅Nm₅₀, ya que en este medio se espera que luego de ocurrido el doble evento de recombinación las mutantes no puedan crecer debido a la pérdida del gen de resistencia a Nm codificado en el plásmido pK18*mobsacB*.

Verificación del doble evento de recombinación homóloga.

Para corroborar que las colonias seleccionadas correspondan a dobles eventos de recombinación homóloga, se realizaron PCRs a partir de las mismas, utilizando los cebadores bfr₃ y bfr₄ y la ADN polimerasa Taq. El programa se detalla en la Tabla 3.

Tabla 3: Programa de PCR para verificar las mutaciones obtenidas

Etapas	Tiempo y Temperatura	Ciclos
lisis	10 min 90°C	
Pausa	*agregado de Taq	
Desnaturalización inicial	10 min 90°C	
Desnaturalización	30 seg 90°C	30
Annealing	40 seg 58°C	
Extensión	1 min 72°C	
Extensión final	10 min 72°C	

Se realizó una selección negativa, tomando como clones candidatos a contener células donde haya ocurrido un doble evento de recombinación aquellos que no amplificaron bajo las condiciones ensayadas. En esos casos se les extrajo el ADN genómico mediante el método de extracción orgánica. A su vez, se extrajo el ADN genómico de las cepas *S. meliloti* 1021, Irr- y colonias resultantes de las conjugaciones, para utilizar como controles en Southern blot.

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 digirió con la enzima EcoRV, el ADN genómico de las posibles mutantes *S. meliloti* 1021 *bfr::lacZGm^R* (doble evento de recombinación) y *S. meliloti* 1021 *irr bfr::lacZGm^R*. Como control se empleó el ADN genómico obtenido a partir de las cepas salvajes y *S. meliloti* 1021 *bfr::lacZGm^R* (simple evento de recombinación). Los fragmentos obtenidos de la digestión fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8 % (m/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 biotinilización 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 III, sección Soluciones utilizadas en el Southern blot) 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 desnaturalizante, dejándola actuar durante 7 minutos a 30 mbar. Posteriormente se retiró el exceso de la solución desnaturalizante 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 Whatman 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.

Análisis de la expresión de la bacterioferritina

Ensayos de actividad betagalactosidasa

Los ensayos de actividad betagalactosidasa se realizaron siguiendo el protocolo de cuantificación de actividad enzimática de Miller (110) adaptado por Zhang *et al* (111). Se inocularon por triplicado las cepas a estudiar en TYStr₁₀₀ suplementado con FeCl₃ 37 µM o con EDDHA 300, generando las condiciones de disponibilidad y deficiencia en hierro. Luego de 48 hs

de incubación, se cosecharon 1,5 ml de células mediante una centrifugación de 5 min a 3000 $\times g$, y se resuspendieron en 1,5 ml de buffer Z. A partir de esta suspensión se determinó la DO_{620} . Se prepararon dos alícuotas, cada una conteniendo 350 μl de la suspensión de células y se agregaron 280 μl de buffer Z. A continuación se agregó 70 μl de solución de lisozima (5 mg/ml en buffer fosfato de potasio 0,1 M pH 7,8), se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente, para permitir la lisis celular. Luego de 5 min, se agregaron 15 μl de EDTA 0,05 M pH 8 a cada tubo, mezclando por inversión y se incubó 15 min más. A continuación, se agregaron 7 μl de SDS 1% (m/v) y se dejó equilibrar las muestras durante al menos 5 min a 30°C. Para la reacción enzimática, se agregaron 140 μl del sustrato O-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) 4 mg/ml en buffer Z, y se incubó 10 min a temperatura ambiente o hasta la aparición de color, momento en el que se detuvo la reacción mediante el agregado de 350 μl de Na_2CO_3 1 M. Los restos celulares fueron removidos mediante centrifugación de 10 min a 10000 $\times g$, y se determinó la absorbancia a 450 nm. La actividad betagalactosidasa se calculó asumiendo que 1 ml de cultivo con DO_{620} de 1 contiene 0,22 mg de proteína, utilizando la siguiente ecuación:

$Actividad = \frac{DO_{420} \times vol\ final \times 10^6}{DO_{600} \times 0,22 \times V_{cultivo} \times 4017,821 \times t_{reacción}}$, donde $V_{cultivo}$ es el volumen de cultivo de partida (ml) y $t_{reacción}$ es el tiempo de reacción (min).

Construcción de los plásmidos recombinantes conteniendo regiones promotoras

Para la obtención de las construcciones que servirán para evaluar distintas regiones del operón SMc03787-*bfr*, se partió de ADN genómico de *S. meliloti* 1021, a partir del cual se realizaron amplificaciones por PCR utilizando cebadores diseñados considerando los sitios de inicio de la transcripción (100) y los sitios de unión de proteínas reguladoras (41) reportados en la literatura. Así, los pares de utilizados fueron: 3787 y 3787R (para la obtención del amplicón P3787), 3787 y 3787 T R (para el amplicón P3787 T), Pbfr y PbfrR (para el amplicón Pbfr) y los cebadores Pbfr y Pbfr T (amplicón Pbfr T). En la Fig. 22 se muestran las zonas a las que corresponden los distintos amplicones obtenidos, y en la Tabla 4 se detalla el programa utilizado para la amplificación.

Tabla 4: Programa de PCR utilizado para las construcciones utilizadas para el estudio de los promotores

Etapa	Tiempo y Temperatura	Ciclos
Desnaturalización inicial	10 min 90°C	
Desnaturalización	30 seg 90°C	30x
Annealing	40 seg 58°C	
Extensión	1 min 72°C	
Extensión final	10 min 72°C	

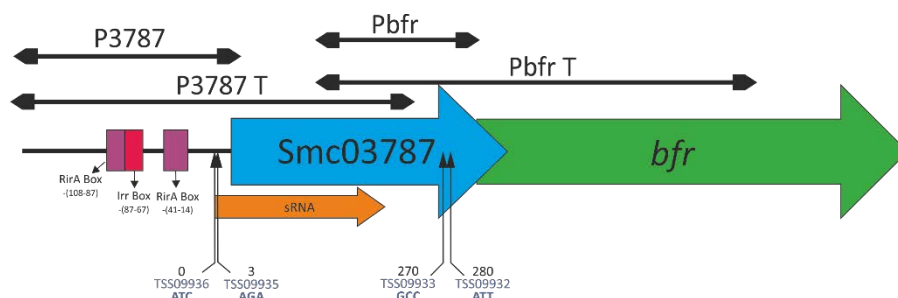


Fig. 22: Operón SMC03787-*bfr* y los amplicones utilizados para el estudio de los promotores

En esta figura se esquematiza la ubicación de los fragmentos de los que se estudiará la función en la promoción de la expresión génica utilizando fusiones transcripcionales en el vector pOT1.

Los mismos fueron digeridos con las enzimas de restricción HindIII y XhoI y purificados utilizando los kits comerciales DNA Clean & Concentrator (Zymo Research), Isolate II PCR and Gel Kit (Bioline). Paralelamente se purificó el vector pOT1 mediante minipreparaciones de ADN plasmídico, y se realizaron digestiones con las mismas enzimas de restricción. Se purificó el vector linealizado a partir de un gel de agarosa. Una vez obtenidos el vector y los insertos digeridos y purificados, se realizaron reacciones de ligación y los productos de éstas fueron utilizados para transformar células de *E. coli* DH5α competentes. Las células transformantes fueron seleccionadas en LBGM₁₀. Para comprobar la presencia de los insertos en los vectores de las células transformantes, se realizaron digestiones con las enzimas de restricción apropiadas.

Una vez obtenidas las construcciones con las posibles regiones promotoras clonadas en pOT1, estas fueron movilizadas mediante conjugación triparental hacia las cepas de *S. meliloti* 1021 y sus mutantes isogénicas *irr*, *rirA*, e *irr/rirA*. Para comprobar la presencia de estas construcciones en las cepasceptoras, se realizaron PCRs a partir de colonias transconjugantes de cada cepa, utilizando los cebadores pOT1 Rev y el cebador F correspondiente a cada inserto.

Determinación de actividad promotora a través de las construcciones en pOT1

Se realizaron tres abordajes para determinar la actividad de las diferentes zonas candidatas a ser promotoras indirectamente, a través del gen reportero GFP en las construcciones clonadas en el plásmido pOT1, bajo diferentes condiciones de disponibilidad de hierro y en distintos contextos génicos.

En medio sólido

Se estrilaron las diferentes cepas de *S. meliloti* con las construcciones conteniendo los insertos correspondientes a P3787, P3787 T, Pbfr y Pbfr T en medio sólido M9 Str₁₀₀Gm₅ suplementado con FeCl₃ 37 μM o EDDHA 100 μM. Luego de 48 hs de incubación a 30°C se observó la fluorescencia de las estrías, exponiendo las mismas a luz UV.

En cultivos líquidos

Se partió de precultivos en medio M9Str₁₀₀Gm₅ suplementado con FeCl₃ 37 μ M crecidos hasta fase estacionaria (48-72 hs) de las cepas de *S. meliloti* 1021, *irr*, *rirA*, e *irr/rirA* conteniendo las construcciones pOT1, pOT1-P3787, pOT1-P3787 T, pOT1-Pbfr y pOT1-Pbfr T. Antes de inocular los cultivos, estos se centrifugaron 5 min a 1000 *xg*, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en el volumen de medio necesario para obtener a una DO₆₂₀ de 1. Alícuotas de aproximadamente 1x10⁷ UFC se inocularon en 1 ml de medio M9Str₁₀₀Gm₅ suplementado con 37 μ M FeCl₃ o con 100 μ M EDDHA, ubicados en placas multipocillo de 2 ml de capacidad por pocillo. Se tomaron alícuotas de 200 μ l de cada pocillo, a los que se midió DO₆₂₀ y fluorescencia (λ excitación 395 nm, λ emisión 509 nm) inmediatamente después de la inoculación (*t*₀) y de 60 a 65 horas después de incubar a 30°C con agitación (*t*_f). Finalmente, se determinaron las relaciones entre DO₆₂₀ y fluorescencia en cada pocillo. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software InfoStat (112).

Detección de fluorescencia mediante citometría de flujo

Preparación de las muestras:

Se inocularon 5 ml de medio de cultivo líquido M9 Str₁₀₀Gm₅ suplementado con FeCl₃ 37 μ M o con EDDHA 100 μ M con las cepas conteniendo las construcciones en pOT1. Luego de 72hs de incubación a 30°C, se cosecharon 1x10⁹ células aproximadamente mediante centrifugación 5 min a 1000 *xg*, lavándolas en buffer fosfato 0,1 M pH 7 esterilizado mediante filtración, resuspendiéndolas nuevamente en buffer fosfato de potasio 0,1 M pH 7 esterilizado mediante filtración, resuspendiéndolas nuevamente en buffer fosfato de potasio 0,1 M pH 7. Se ajustó la concentración de las muestras a aproximadamente 1x10⁶ UFC/ml.

Ajustes del citómetro de flujo y análisis de los datos adquiridos:

Las muestras fueron analizadas en el Servicio de Citometría de Flujo y Clasificación Celular del IIBCE con un citómetro de flujo y clasificador celular *FACSVantage* (BD, USA) equipado con un láser ion-argón (Innova 304, Coherent, USA) ajustado para emitir a 488 nm a 100mW de potencia. Se seleccionó una boquilla de 70 μ m para realizar las medidas citométricas. Para la calibración del citómetro se realizó en primer lugar un ajuste estándar con *Chicken Red Blood Cells* (CRBC) y posteriormente para un correcto análisis de partículas pequeñas se utilizaron microesferas de 1,0 μ m de diámetro (*fluoSpheres® carboxylate modified microspheres, yellow-greenfluorescent (505/515), 2% solids*; Invitrogen™) para optimizar con gran precisión los parámetros citométricos. La fluorescencia emitida por las células que expresan GFP así como por las microesferas, fue recogida en el canal FL1 usando un filtro de banda 530/30. Para detectar y amplificar las señales del canal FL1 y de dispersión lateral (Side Scatter, SSC), se usaron

tubos fotomultiplicadores (PMTs) con amplificación logarítmica. Para detectar la señal de dispersión frontal (Forward Scatter, FSC) se utilizó un fotodiodo operado a su máximo nivel de sensibilidad y amplificación logarítmica. La adquisición y análisis de los datos obtenidos se realizó con el programa *CELLQuest* (BD, USA). Para la adquisición y análisis de las muestras mediante citometría de flujo, en primer lugar se realizó un *gate* en la región R1 en gráficos de FSC vs SSC, conteniendo básicamente toda la población de células detectadas y excluyendo ocasionalmente algunos grandes acúmulos celulares y/o posibles contaminaciones. Dicho *gate* R1 fue graficado en histogramas de FL1 para visualizar las intensidades de fluorescencia relativa presentes en la muestra analizada. Previo al comienzo del análisis de las muestras de las diferentes cepas y/o tratamientos, se midió una población de células control sin fluorescencia GFP (muestra correspondientes a células de *S. meliloti* 1021 portadoras del plásmido pOT1 sin inserto) para determinar el rango de fluorescencia GFP negativa ajustando el voltaje del detector FL1, colocando dicha población GFP-negativa en un rango de 10^0 a 10^1 . Posteriormente, en cada serie de análisis se midieron todas las muestras empleando los mismos *settings* del control sin fluorescencia GFP utilizado al comienzo de cada serie. Por cada medición citométrica se adquirieron un total de 20.000 eventos.

Determinación de la expresión mediante qRT - PCR

Extracciones de ARN

Se utilizó el kit PureLink® RNA Mini Kit (Ambion), siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante. Se partió de cultivos con DO_{620} de 1, los cuales fueron cosechados mediante centrifugación de 10 min a 500 xg a 4°C. Luego se lavaron las células con 1 ml de NaCl 1 M y se procedió a la lisis celular, utilizando 100 μl de solución de lisozima 1 mg/100 μl en Tris – HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM pH8 por cada ml de cultivo original. A continuación se agregaron 0,5 μl de SDS 10% (m/v) y se incubó 15 min a temperatura ambiente. Luego, se agregaron 350 μl de buffer de lisis con 1% (v/v) de 2-mercaptoetanol. Las muestras fueron homogenizadas mediante 5 pasajes por una jeringa estéril con una aguja de tamaño 21. Se centrifugó por 2 min a 12000 xg para eliminar debris celulares, y se precipitaron los ácidos nucleicos con 250 μl de etanol absoluto. Se transfirió la solución resultante a las columnas suministradas en el kit utilizado. Cada columna fue cargada finalmente con el volumen total obtenido a partir de 4 ml de cultivo luego del tratamiento descripto. Las membranas que contenían los ácidos nucleicos se lavaron con las soluciones de lavado suministradas en el kit, y finalmente los ácidos nucleicos se eluyeron con 300 μl de agua libre de ARNasas.

Control de calidad del ARN

Antes de realizar los tratamientos con ADNasa, se comprobó la calidad de los ARNs extraídos. Primeramente se realizaron lecturas en NanoDrop (Thermo) para determinar la concentración de ácidos nucleicos en las muestras, así como también las relaciones 260/280 y 260/230. La integridad de los ARNs extraídos se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes. Se consideró una muestra de ARN de buena calidad, aquella que presentara el espectro característico, con 260/280 cercano a 2 y que se pudieran visualizar las bandas correspondientes a las subunidades de los ARN ribosomales 23S y 16S.

Digestiones con ADNasa

Las digestiones se realizaron utilizando la enzima DNase I (RNase-free) (Amibion), partiendo de 1 µg de ARN en 50 µl de reacción, utilizando 2 U de la enzima. Las incubaciones fueron de 1 h a 37°C.

Control de calidad del ARN tratado con ADNasa

Para comprobar la ausencia de ADN genómico, primeramente se realizaron corridas electroforéticas en geles de agarosa desnaturalizantes. Al no observarse bandas correspondientes a ADN genómico en el ARN obtenido, se realizaron qPCRs utilizando como moldes estos ARNs tratados con ADNasa y los cebadores 16s F y 16s R.

Síntesis de ADNc

Se realizó la síntesis del ADNc a partir del ARN previamente digerido con ADNasa utilizando iScript™ Select cDNA Synthesis Kit (Biorad), con random primers, según las instrucciones del fabricante. Se partió de 100 ng de ARN tratado con ADNasa en todos los casos.

PCRs cuantitativas

Para determinar los niveles de expresión de diferentes zonas del operón SMC03787 – *bfr* en función del contexto génico, se realizaron reacciones de PCR a tiempo real, a partir de los ADNc obtenidos de células de *S. meliloti* 1021 y de las mutantes *irr*, *rirA* e *irr/rirA* crecidas en M3 suplementado con de 37 µM de FeCl₃. Primero se realizaron las reacciones de retrotranscripción según se detalló anteriormente. Se empleó la iQ SYBR Green Supermix de Biorad, siguiendo las recomendaciones del fabricante, calculando un exceso de volumen de 5%. La concentración final de cebadores utilizada fue de 200 nM, y el volumen de muestra necesario para utilizar 20 ng de molde por reacción de 20 µl.

Se realizaron cuatro premezclas, una para cada par de cebadores utilizados: 16s, *srna*, *bfd* y *bfr*. Las qPCR fueron realizadas en un termociclador CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System

Tabla 5: Programa de qPCR utilizado

Etapa	Tiempo y Temperatura	Ciclos
Desnaturalización inicial	5 min 95°C	
Desnaturalización	10seg 95°C	40x
Annealing	30 seg 60°C	
	Lectura de la placa	
	65 a 95°C	
Curva de melting	Incrementando de a 0,5°C	

(Biorad), utilizando el programa detallado en la Tabla 5. Las regiones estudiadas mediante qRT-PCR se muestran en la Fig. 23.

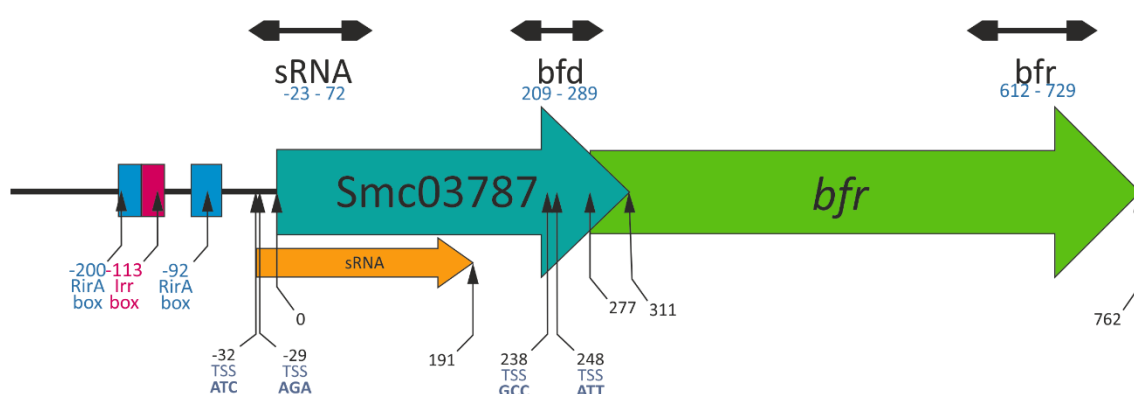


Fig. 23: Operón SMc03787-bfr y los amplicones estudiados mediante qRT-PCR

En esta figura se esquematiza la ubicación de los amplicones cuantificados mediante qRT-PCR para el análisis de la expresión génica.

Resultados

Construcción de la mutante

Como se detalla en la Sección Materiales y Métodos, el material de partida para la construcción de la mutante en el gen de la bacterioferritina de *S. meliloti* consistió en el vector conjugativo no replicable en rizobio pK18*mobsacB*, conteniendo en su MCS un inserto que corresponde al ORF SMc03787 y al gen *bfr* interrumpido por el cassette *lacZGm^R*. Se empleó esta estrategia, debido a que el uso de este cassette tiene un propósito dual, ya que permite generar una mutante en el gen de interés para luego estudiar su comportamiento (ver Capítulo II: Funciones fisiológicas de la bacterioferritina de *S. meliloti* 1021), y facilita la realización de ensayos de expresión del gen interrumpido, debido a la presencia del gen *lacZ*. Este gen codifica una betagalactosidasa funcional, que carece de promotor, pero sí contiene un sitio de unión al ribosoma, de esta manera su expresión será controlada por el promotor nativo del gen interrumpido por el cassette. Se ha reportado la utilización de este cassette con éxito para la mutagénesis y estudios de expresión de genes en *S. meliloti* (113).

El primer paso en este trabajo fue transferir la construcción plasmídica pK18*mobsacB-bfr::lacZGm^R* hacia *S. meliloti* 1021 y su mutante isogénica *irr* mediante conjugación triparental. Al ocurrir la integración de la construcción pK18*mobsacB-bfr::lacZGm^R* al genoma de rizobio, ésta puede darse en dos sentidos, en los que coexisten las versiones salvaje y mutada de *bfr*: con la copia salvaje corriente arriba, seguida de la versión mutada (Fig. 24 a); o la copia mutada corriente arriba seguida de la versión salvaje (Fig. 24b)

Las colonias transconjugantes obtenidas a partir de *S. meliloti* 1021 se seleccionaron en el medio TYStr₁₀₀Nm₅₀Gm₅, y las obtenidas a partir de la mutante *irr* de *S. meliloti* 1021 en TYStr₁₀₀Spc₁₀₀Nm₅₀Gm₅, ya que al incorporar el plásmido conjugativo adquieren resistencia a los antibióticos Gm y Nm, ausentes en las cepas parentales 1021 e *Irr*⁻. Paralelamente, la Str permite la selección positiva de los rizobios.

Debido a que se procedería con la selección del doble evento de recombinación homóloga, no se verificó en qué sentido ocurrió la recombinación en las colonias transconjugantes obtenidas.

Para la selección del doble evento de recombinación homóloga, en el que sólo se encuentra presente la versión de *bfr* portadora de la mutación, se crecieron las colonias transconjugantes 1021 *bfr::lacZGm^R* e *Irr bfr::lacZGm^R* en presencia de sacarosa 15% (m/v) y ausencia de Nm de forma de seleccionar las transconjugantes que hayan perdido el gen *sacB* que codifica la exoenzima levansacarosasa, que cataliza la transfructosilación de la sacarosa para generar

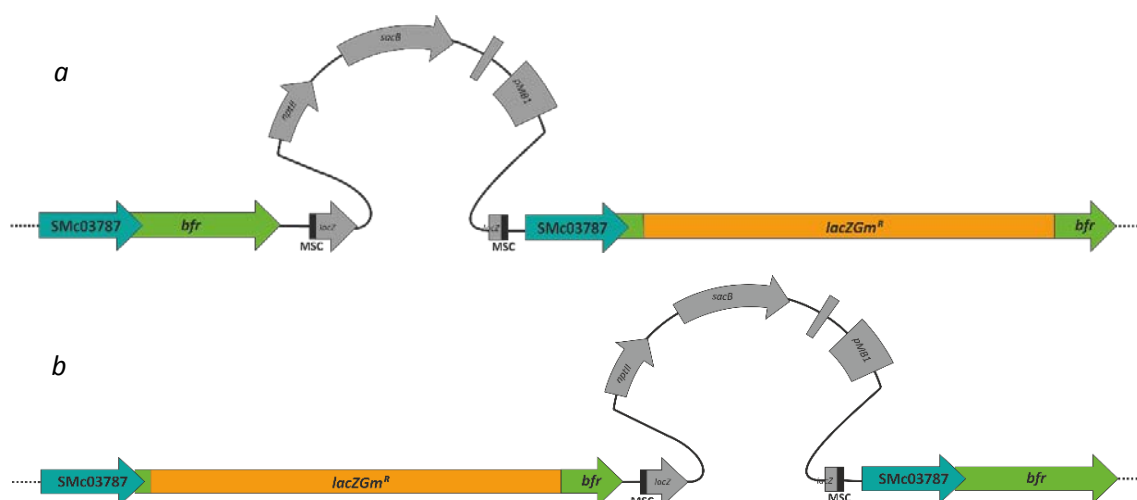


Fig. 24: Posibles opciones de integración del plásmido pK18-*bfr*::*lacZGmR* en el genoma de la cepa aceptora *S. meliloti* 1021

En esta figura se muestran esquemas representativos de las posibles configuraciones de integración del vector pK18-*bfr*::*lacZGmR* en el genoma de *S. meliloti* 1021. En el esquema de arriba, se representa la configuración que corresponde a la inserción del vector mediante la recombinación de la región posterior a la mutación practicada en *bfr*, que contiene primero una copia completa del operón, corriente arriba de la versión portadora de la mutación. El esquema representado abajo es el resultado de la hibridación en una región anterior a la mutación, y da como resultado la presencia de la versión portadora de la mutación, seguida de la versión alélica salvaje.

levanos, polímeros de fructosa ramificados de alto peso molecular, que obstruyen el periplasma, resultando letales para la célula (114). Esto implica la ocurrencia de un nuevo evento de recombinación homóloga, en el que, teóricamente, la probabilidad de obtener células de genotipo salvaje iguala a la de obtener el genotipo mutante. Debido a la presencia de Gm en el medio de selección, se esperaba únicamente la obtención de las células Bfr-, eliminando aquellas que retornarían al genotipo salvaje. Sin embargo, cabe tener en cuenta que pueden aparecer, aunque en una frecuencia relativamente baja, colonias espontáneamente resistentes a Gm y/o resistentes a sacarosa. La presencia de Nm en el medio nos permite conocer cuales colonias aún conservan el plásmido pK18 (el cual confiere resistencia a este antibiótico) integrado en el genoma, a pesar de haber resultado ser resistentes a sacarosa y a Gm. Se tomaron como candidatas a posibles mutantes Bfr- aquellas colonias incapaces de crecer en el medio con Nm, pero sí en presencia de Gm y sacarosa, y se procedió a verificar la presencia de la mutación mediante PCR, utilizando los cebadores *bfr*₃ y *bfr*₄.

Se esperaba que en presencia de la mutación no se lograra la amplificación bajo las condiciones ensayadas, debido a la longitud del cassette insertado en *bfr*, de 4200 pb, pero sí un amplicón de aproximadamente 800 pb correspondientes al alelo salvaje presente en los genotipos salvaje y de simple evento.



Fig. 25: Verificación de la mutación mediante PCR

Gel de agarosa 0,8 % (m/v) en TAE. Se muestran los productos obtenidos de la amplificación con los cebadores bfr3 y bfr4 sobre el ADN genómico de las cepas parentales 1021 e Irr-, una colonia transconjugante simple evento (SE), y las colonias candidatas a dobles eventos 1021 Bfr- 10 y 30 e Irr- Bfr- 42. C-: control negativo correspondiente a la mezcla de amplificación sin ADN agregado

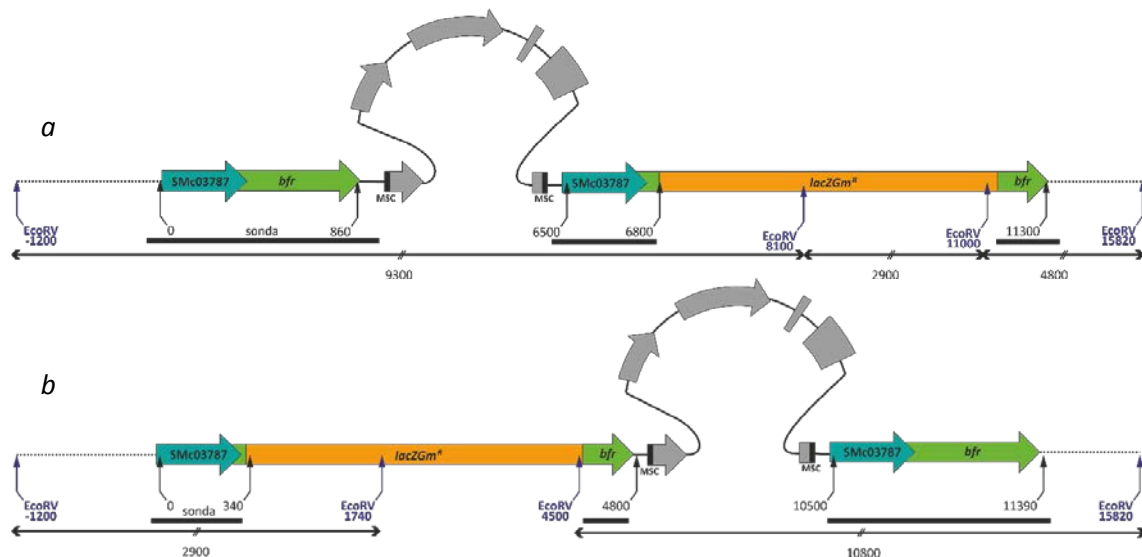


Fig. 26: Configuraciones del simple evento (SE) de recombinación homóloga

Estos esquemas que representan las posibles configuraciones del simple evento de recombinación homóloga. Se muestran con una barra negra las regiones con las que hibrida la sonda, en azul los sitios de corte de EcoRV, y en negro los fragmentos correspondientes a las señales esperadas. Para la configuración esquematizada arriba, se esperan señales correspondientes a 4800 y 9300pb aproximadamente, mientras que para la configuración representada abajo, las señales esperadas son de 2900 y 10800 pb.

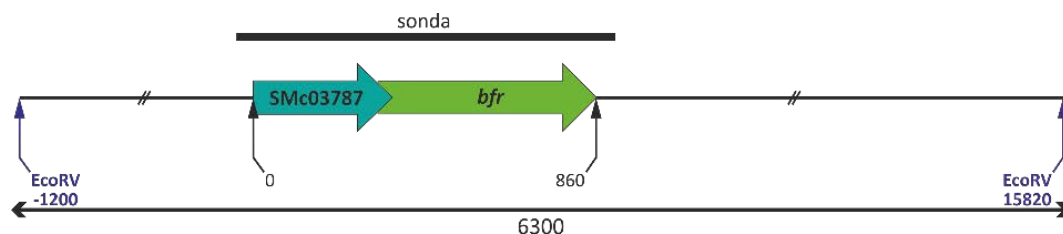


Fig. 27: Genotipo salvaje

Esquema que representa la región de hibridación de la sonda al ADN genómico de *S. meliloti* salvaje. Se muestran en azul los sitios de corte para la enzima de restricción EcoRV. Se espera para este caso una única señal, de 6300 pb.

Como se observa en la Fig. 25 se obtuvieron para las cepas parentales y las correspondientes a un simple evento de recombinación, una banda de entre 700 y 1000 pb correspondiente al

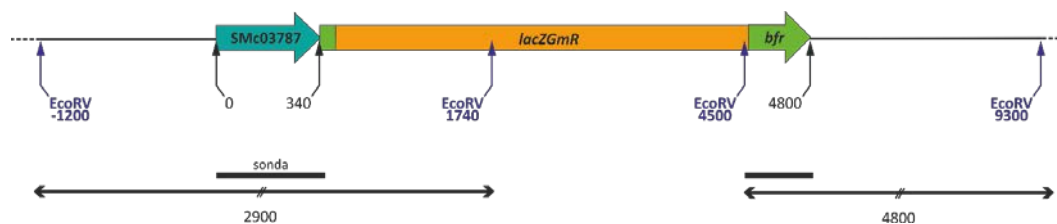


Fig. 28: Genotipo doble evento de recombinación homóloga

Esquema que representa el doble evento de recombinación homóloga, en el que se encuentra una única versión del gen *bfr* interrumpido por el cassette *lacZGmR*. Las barras representan los sitios a los que hibrida la sonda utilizada en el Southern blot, en azul se muestran los sitios de corte para la enzima EcoRV y en negro las señales esperadas, de 2900 y 4800 pb respectivamente.

amplicón esperado, y una banda no esperada, de aproximadamente 300 pb. En el caso de las candidatas a Bfr-, no se observa la presencia de bandas, como era esperado.

Si bien los resultados obtenidos mediante esta aproximación eran los esperados para un doble evento de recombinación, se realizó una confirmación adicional mediante 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 mediante autoradiografía (115).

Para realizar la verificación mediante Southern blot, se partió de ADN genómico proveniente de las cepas candidatas y de las parentales 1021 e *irr*, además de un control simple evento (SE), a los que se digirió con la enzima EcoRV. Esta enzima posee sitios de corte en la región que porta la mutación que permiten discriminar entre los genotipos salvaje, simples eventos y doble evento. En la Fig. 27 se muestra la región con la que hibrida la sonda *bfr*₃₄ sobre el ADN genómico de *S. meliloti* 1021 salvaje e *irr*, para las cuales se esperaba una única señal, correspondiente a un fragmento de 6300 pb. Para el simple evento esquematizado en la Fig. 26a, se esperaban señales de 3000 y 11000 pb aproximadamente; las señales esperadas para la otra opción de SE serían de 5000 y 9000 pb aproximadamente (Fig. 26b), mientras que para el doble evento de recombinación se esperaban señales de 2900 y 4800 pb (Fig. 28).

Al analizar los perfiles de bandas de Southern blot con las colonias seleccionadas candidatas a corresponder a dobles eventos de recombinación homóloga (Fig. 29) se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 6.

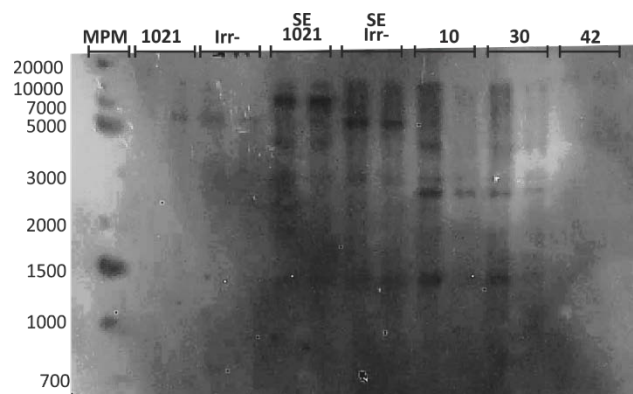


Fig. 29: Southern blot

Placa revelada del Southern blot, en el que se ven las señales emitidas por la unión de la sonda al ADN genómico digerido con la enzima EcoRV de las cepas de *S. meliloti* 1021, Irr-, simple evento (SE) 1021, SE Irr-, y las candidatas a ser doble evento de recombinación homóloga 10 y 30, correspondientes a *S. meliloti* 1021 *bfr::lacZGm^R*, y 42, correspondiente a Irr *bfr::lacZGm^R*. En la tabla anterior se detallan las señales obtenidas para cada muestra. MPM: marcador de peso molecular (1kb Ladder Plus)

Tabla 6: Resultados de la verificación de la mutación mediante Southern blot

Muestra	Longitudes aproximadas en pb
1021	6500 pb, 3000 pb
Irr	6500 pb, 3000 pb
SE 1021	10000 pb, 7000 pb, 5000 pb, 3000 pb, 1500 pb
SE Irr	6000 pb, 3000 pb, 1500 pb
10	10000 pb, 4500 pb , 3000 pb, <3000 pb , 1500 pb,
30	10000 pb, 4500 pb , 3000 pb, <3000 pb , 1500 pb,
42	No digirió

En esta tabla se resumen las longitudes en pares de bases de los fragmentos de ADN g que resultaron en señales luego del revelado de la placa de Southern blot, mostrado en la Fig. 29.

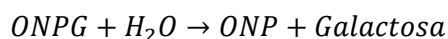
Como se ve en los resultados obtenidos, se encontraron bandas no esperadas según los esquemas de las Fig. 26, Fig. 27 y Fig. 28, que se repiten en todos los carriles, que pueden ser resultado de hibridaciones inespecíficas y que por lo tanto no serán consideradas. Éstas son las correspondientes a 10000 pb, 3000 pb, y 1500 pb. Esas bandas inespecíficas probablemente podrían haberse evitado, aumentando la temperatura de hibridación de la sonda a la membrana, mejorando así la especificidad.

Depurando las señales obtenidas, se concluye que las colonias 10 y 30 corresponden a dobles eventos de recombinación, debido a la presencia de las señales correspondientes a 4500-4800 pb y 2500-3000 pb. En el caso de la colonia 42, se ven bandas en la parte superior de la membrana, indicando que en este caso se partió de un ADN genómico no digerido por lo tanto no se puede concluir con este Southern blot el genotipo obtenido. Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados de las instancias anteriores de comprobación de la mutación, es decir, la resistencia y sensibilidad a los antibióticos marcadores (Gm y Nm respectivamente), su

crecimiento en sacarosa y la ausencia de bandas en la PCR, se concluye que esta colonia también proviene de un doble evento de recombinación.

El gen *bfr* se expresa en presencia de hierro, y la proteína Irr regula su expresión en una forma dependiente del hierro

Como se detalló anteriormente, la inserción del cassette *lacZGm^R* interrumpiendo la secuencia codificante del gen que codifica la bacterioferritina permite determinar de forma indirecta la expresión de este gen, midiendo la actividad de la enzima betagalactosidasa bajo diferentes condiciones de disponibilidad de hierro. La enzima betagalactosidasa tiene como función en las células la hidrólisis de la lactosa para producir glucosa y galactosa, para su utilización como fuente de carbono. Sin embargo, el gen que codifica esta enzima se utiliza con éxito como gen reportero para medir la fuerza de los promotores (111). Esto es posible gracias a que la betagalactosidasa es capaz de reconocer como sustrato el ONPG, el cual es hidrolizado para dar galactosa y el producto pigmentado ONP, cuya producción puede ser monitoreada espectrofotométricamente a 420 nm, siendo la reacción catalizada por la enzima la siguiente:



En un primer ensayo se determinaron las actividades betagalactosidasa de la cepa salvaje (como control negativo) y de *S. meliloti* 1021 *bfr::lacZGmR* (Bfr-). En la Fig. 30 se muestran los resultados de este ensayo.

Al relacionar las actividades enzimáticas obtenidas, se desprende que en este ensayo, los cultivos de *S. meliloti* 1021 *bfr::lacZGmR* crecidos en presencia de hierro presentaron 1,4 veces más actividad que los crecidos en presencia del quelante de hierro (ver Fig. 30)

En un segundo ensayo, se compararon las actividades betagalactosidasa de las mutantes conteniendo la construcción *bfr::lacZGmR* en los contextos génicos salvaje e *irr*, en condiciones de suficiencia y carencia de hierro.

Como se muestra en la Fig. 31, si bien los valores de actividad obtenidos difieren en forma importante con los obtenidos en el ensayo anterior, se mantiene una diferencia significativa en la actividad de los cultivos crecidos en presencia de hierro con respecto a los crecidos sin hierro. En relación al contexto génico *irr* se observó una mayor actividad betagalactosidasa con respecto al contexto génico salvaje en las condiciones de disponibilidad de hierro, mientras que en condiciones limitantes la actividad enzimática fue menor. Si se toma como referencia la actividad enzimática obtenida en el contexto génico salvaje en presencia del quelante de hierro, se desprende que en el contexto génico *irr*, en la misma condición, la expresión se reduce a la

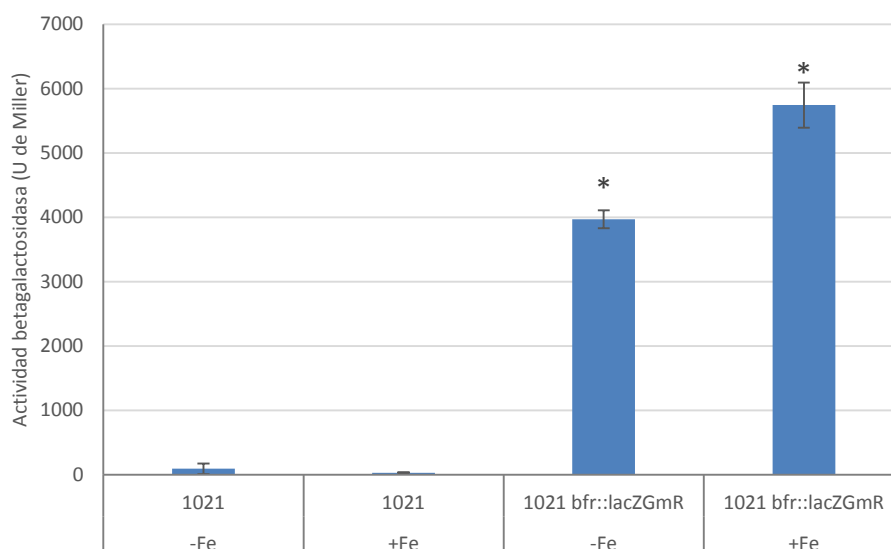


Fig. 30: Actividad betagalactosidasa: contexto génico salvaje

Este gráfico muestra las actividades betagalactosidasa de células de *S. meliloti* 1021 – *bfr::lacZGmR*, crecidas en medio TY en condiciones limitantes (-Fe) y suficientes (+Fe) de hierro. Los asteriscos indican que se encontraron diferencias significativas al aplicar un test de Tukey, con un p-valor menor a 0,05.

mitad, lo cual estaría indicando un rol de la proteína Irr como activador en ausencia de hierro. Realizando el mismo análisis con la actividad enzimática obtenida en presencia de hierro en el contexto génico *irr*, se observó que ésta fue 1,8 veces mayor que en la misma condición en el contexto génico salvaje, indicando un posible rol de Irr como represor en presencia de hierro. Por otra parte, también se observa que se mantiene la respuesta a hierro aún en ausencia de esta proteína indicando la presencia de otro factor responsable de ese fenotipo.

El análisis de la actividad de la región promotora reveló una activación en condiciones limitantes en hierro

Para determinar la actividad de diferentes regiones corriente arriba del gen *bfr* se definieron posibles regiones para analizar (Fig. 22) y se realizaron las amplificaciones por PCR correspondientes a cada una de las regiones. Primero, se optimizó la temperatura de unión de los cebadores al ADN molde, realizando una amplificación en gradiente de temperatura, entre los 55 y los 65°C. En la Fig. 32 se muestra una fotografía del gel donde se corrieron los productos de amplificación con los cebadores 3787F y P3787 R, para dar el producto P3787, de 230 pb de longitud. Las temperaturas ensayadas fueron: 55,2, 56,5, 57,6, 59 y 62,2°C respectivamente. Como se observa en la figura, se obtuvieron rendimientos similares para todas las temperaturas ensayadas. Debido a la similitud en las T_m para los distintos pares de cebadores utilizados, se decidió realizar las amplificaciones subsiguientes con temperatura de *annealing* de 58°C.

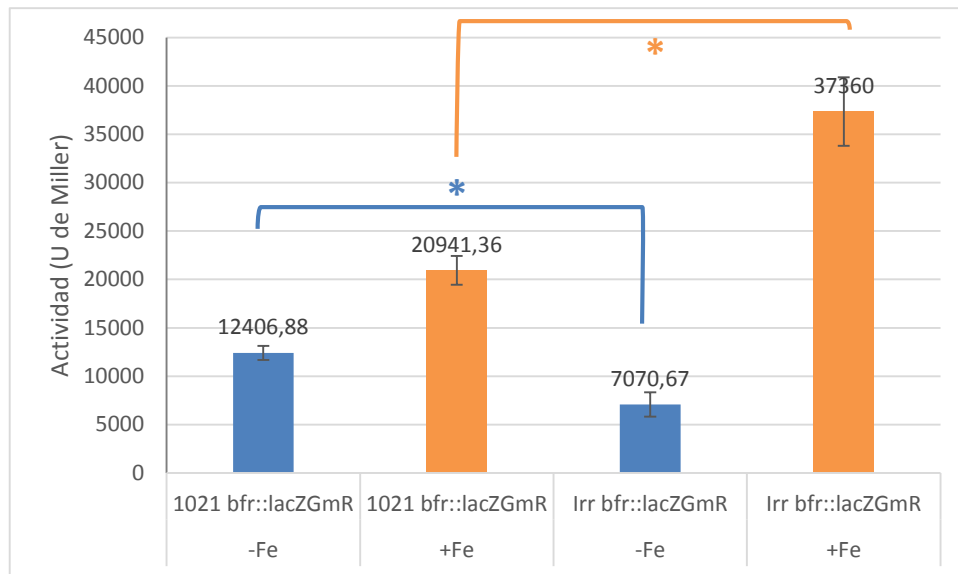


Fig. 31: Actividad betagalactosidasa: contexto génico salvaje vs. Irr-

Este gráfico muestra las actividades betagalactosidasa obtenidas para cultivos de *S. meliloti* en medio TY en condiciones limitantes (-Fe) y suficientes (+Fe) de hierro, en los contextos génicos salvaje (1021) e *irr*. Los asteriscos indican que se encontraron diferencias significativas al aplicar un test de Tukey, con un p-valor menor a 0,05.

En la Fig. 33 se muestran las bandas obtenidas para los amplicones correspondientes a las regiones seleccionadas y como puede observarse, se obtuvieron rendimientos aceptables en todos los casos.

Una vez obtenidos los amplicones, estos fueron digeridos con las enzimas de restricción XbaI y HindIII y purificados utilizando kits comerciales. Paralelamente, se digirió el plásmido pOT1 con las mismas enzimas de restricción, y se purificó el plásmido lineal a partir de un gel de agarosa. Para determinar las proporciones de inserto y vector en las reacciones de ligación se sembraron en un gel de agarosa iguales volúmenes de los insertos y del vector, digeridos y purificados. A partir de estos datos se realizaron reacciones de ligación utilizando la enzima T4 ADN ligasa, tomando en cuenta las proporciones inserto-vector sugeridas por el fabricante. Con los productos de ligación obtenidos se transformaron células de *E. coli* DH5α. Como se ve en la Fig. 34, la amplificación con los cebadores pOT1 F y pOT1 R permite distinguir entre células de *S. meliloti* 1021 portadoras y no portadoras de las construcciones en pOT1, mediante la obtención del producto de amplificación específico correspondiente a sus insertos. Esta reacción fue utilizada para corroborar la presencia de las construcciones en pOT en células transconjugantes de *S. meliloti* 1021 y las mutantes isogénicas *irr*, *rirA* e *irr/rirA*, obteniéndose resultados positivos (datos no mostrados).

Evaluación de la expresión en medio sólido

Al observar la capacidad de los cultivos de emitir fluorescencia en medio sólido M9 suplementado con hierro o con quelante se concluyó que había una expresión diferencial en los diferentes contextos génicos, aunque también se observó que en todos los casos, el crecimiento bacteriano en medios con el agregado de EDDHA fue mucho menor que en medio sin quelante (datos no mostrados).

Evaluación de la expresión en medio líquido mediante medidas de espectrofluorimétricas

Con la finalidad de evaluar más precisamente la expresión de la fluorescencia en relación al número de células, se realizó el ensayo a partir de cultivos líquidos, donde se pueden cuantificar ambos parámetros.

Se realizaron cuatro experimentos independientes para cuantificar la expresión de GFP, en dos de los cuales se evaluó la actividad promotora de las cuatro regiones consideradas, mientras que en las otras dos solo se evaluó la actividad de las construcciones P3787 y P3787 T.

En la Fig. 35 se muestran los gráficos correspondientes a un ensayo representativo de expresión de GFP, donde se detalla la DO_{620} obtenida y la relación F/DO_{620} para cada cepa en cada condición, realizado por quintuplicado. En este caso se aplicó el test no paramétrico de Kruskal Wallis para encontrar diferencias significativas, con un p-valor de 0,05.

En el gráfico de la construcción pOT1-P3787 (Fig. 35 b), se observó un nivel alto de fluorescencia en la condición –Fe, en la cepa salvaje, siendo este cinco veces menor en la condición +Fe. Al analizar los niveles de F/DO_{620} de los demás contextos génicos, tomando como referencia los niveles encontrados en el contexto génico salvaje, se observó una expresión tres veces menor en el contexto génico *irr*, tanto en presencia como en ausencia de hierro. En la cepa *RirA*- en la condición –Fe, la expresión fue dos a tres veces menor que en la cepa salvaje, pero en la condición +Fe, se observó que la expresión aumentó casi al triple. En la doble mutante *irr/rirA*, la expresión en la condición –Fe resultó ser algo menor que bajo el contexto génico salvaje,

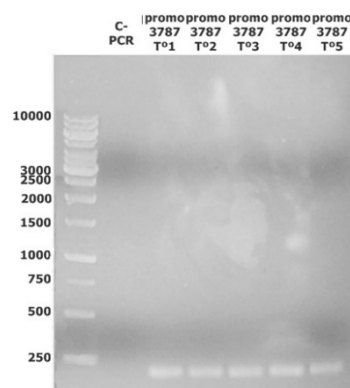


Fig. 32: Obtención de P3787

Gel de agarosa 1% (m/v) donde se muestra el resultado de la amplificación por PCR en gradiente de temperaturas para obtener el producto P3787. Como se ve en la figura, se obtuvieron rendimientos similares bajo todas las temperaturas ensayadas. Estas fueron: T°1: 55,2; T°2: 56,5; T°3: 57,6; T°4: 59; T°5: 62,2.

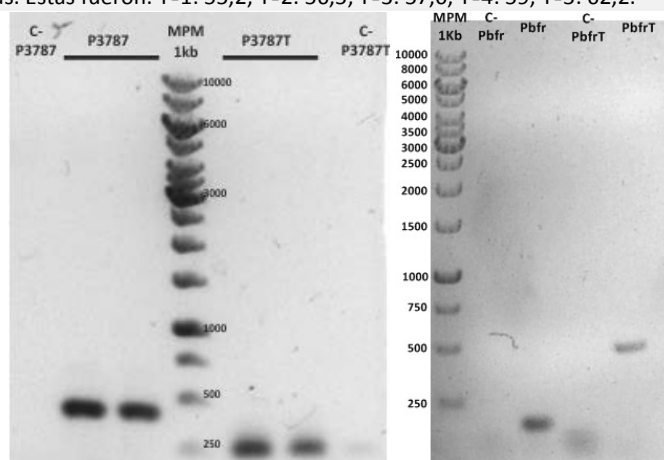


Fig. 33: Obtención de los amplicones P3787, P3787 T, Pbfr y Pbfr T

Geles de agarosa donde se corrieron los productos de PCR P3787 y P3787 T (izquierda), Pbfr y PbfrT (derecha). C- indica el control negativo de la amplificación, donde no se agregó ADN molde.

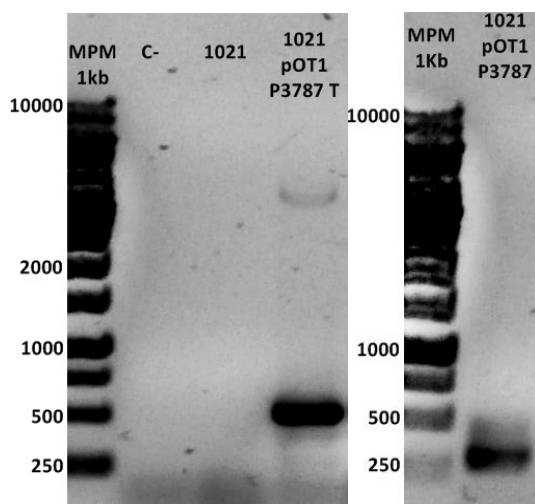


Fig. 34: Verificación de los insertos en pOT1 en células transconjugantes de *S. meliloti* 1021 pOT1 P3787 y pOT1 P3787 T

Geles de agarosa donde se corrieron los productos de amplificación P3787 (derecha) y P3787 T (izquierda), a partir de colonias transconjugantes *S. meliloti* 1021 pOT1 P3787 y *S. meliloti* 1021 pOT1 P3787T, con los cebadores pOT1 F y pOT1 R. En la reacción correspondiente al tercer carril de la izquierda, se ve que no hay amplificación al realizar la PCR a partir de células *S. meliloti* 1021 sin el plásmido pOT1, y que a partir de células transconjugantes con las construcciones pOT1 P3787 y pOT1 P3787 T ocurrió la amplificación específica del inserto correspondiente.

mientras que en la condición +Fe, la expresión fue notablemente mayor (cuatro veces mayor a

la expresión en el contexto génico salvaje), aunque no se detectaron diferencias estadísticamente significativas.

Al analizar la construcción P3787T (Fig. 35 c), nuevamente la expresión en el contexto génico salvaje, en la condición -Fe resultó ser cuatro veces mayor que en la condición +Fe. En el contexto génico *irr*, la expresión en -Fe fue cinco veces menor que en el contexto salvaje, y en la condición +Fe si bien se registró una menor expresión, esta no fue estadísticamente significativa. En el contexto génico *rirA*, nuevamente, la expresión se redujo a la mitad en la condición -Fe (hecho no repetido en los otros ensayos independientes), y en la condición +Fe si bien la expresión fue levemente mayor, la diferencia no fue estadísticamente significativa. Al analizar la misma construcción en la doble mutante *irr/rirA*, se observó una menor expresión con respecto al contexto génico salvaje en la condición -Fe, y un aumento en la condición +Fe, pero este último resultó no ser significativo.

La expresión de fluorescencia relativa a la DO₆₂₀ en la construcción Pbfr (Fig. 35, d), no arrojó diferencias significativas entre los contextos génicos estudiados con el blanco, sin embargo, en la construcción Pbfr T (Fig. 35 e), se observó una gran diferencia en la condición -Fe del contexto génico *irr*-, donde la expresión aumentó más de 10 veces con respecto al contexto génico salvaje.

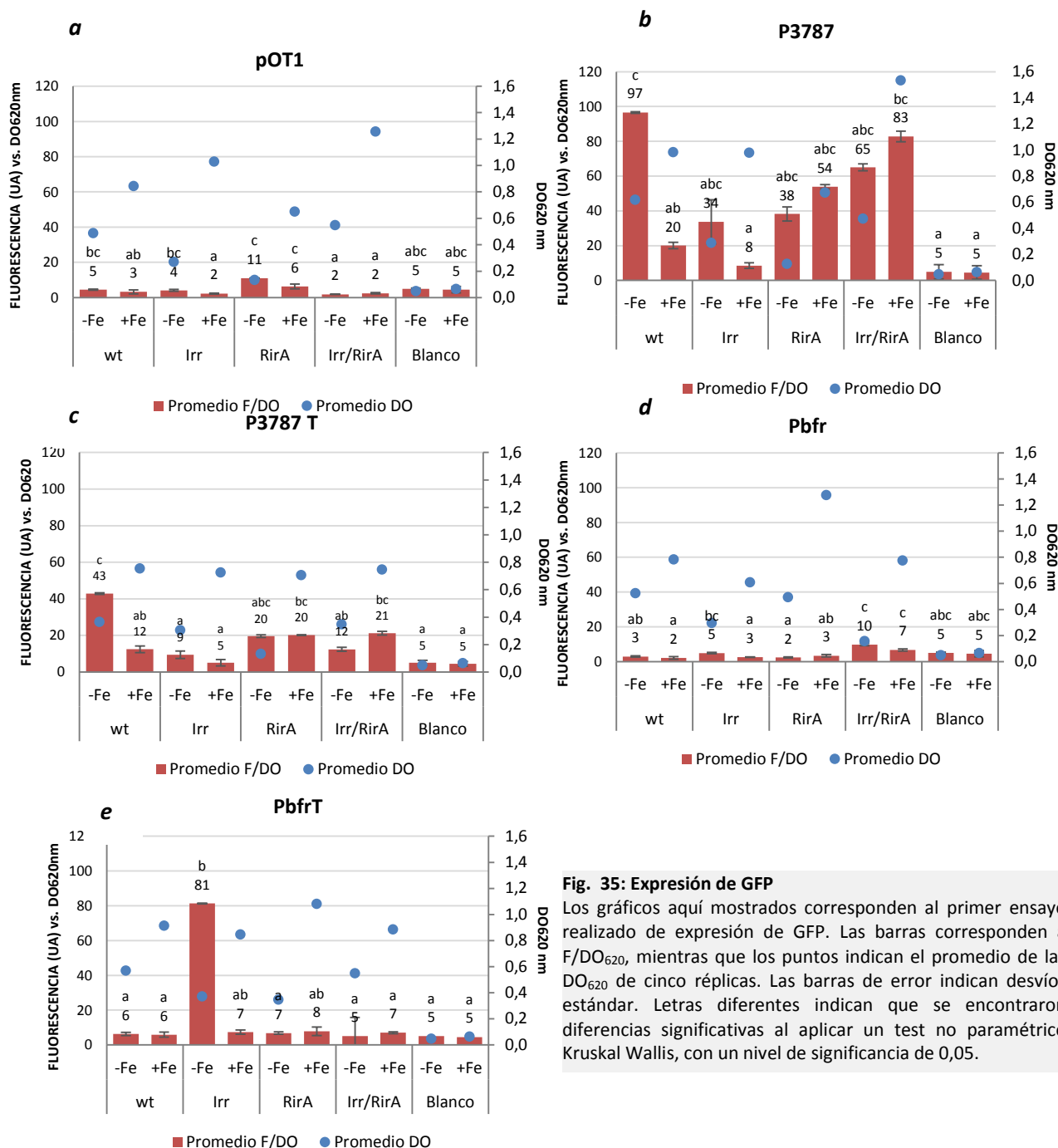


Fig. 35: Expresión de GFP

Los gráficos aquí mostrados corresponden al primer ensayo realizado de expresión de GFP. Las barras corresponden a F/DO_{620} , mientras que los puntos indican el promedio de las DO_{620} de cinco réplicas. Las barras de error indican desvíos estándar. Letras diferentes indican que se encontraron diferencias significativas al aplicar un test no paramétrico Kruskal Wallis, con un nivel de significancia de 0,05.

En la Tabla 7 se resume los valores de F/DO_{620} obtenidos en los cuatro ensayos realizados. Como se aprecia allí, si bien hubieron diferencias en los valores netos obtenidos entre ensayos, los comportamientos en general se mantienen: En el contexto génico salvaje (W), la expresión de los cultivos que contienen las construcciones P3787 y P3787 T fue mayor en la condición -Fe que en la +Fe, pero en los que contienen las construcciones Pbfr y Pbfr T no se detectaron diferencias con respecto al control negativo, con la excepción de la construcción PbfrT en ausencia de hierro en el contexto génico *irr*. La actividad promotora de la construcción P3787 en el contexto génico *irr* (I), siempre fue menor tanto en la condición -Fe como en +Fe con respecto

Tabla 7: Expresión de GFP por construcción

Ensayo Número de réplicas	Contexto génico	pOT1		P3787			P3787 Trad			P bfr			Pbfr Trad		
		-Fe	+Fe	-Fe	+Fe	-Fe Vs. +Fe	-Fe	+Fe	-Fe Vs. +Fe	-Fe	+Fe	-Fe Vs. +Fe	-Fe	+Fe	-Fe Vs. +Fe
1 n=5	W	4,5	3,1	98,6	20,4	**	43,4	12,2	**	2,9	2		6,1	5,4	
	I	4,3	2,2	35*	8,1*	**	9,56*	5,1*	**	4,9*	2,5	**	85*	7,4	**
	R	10,9	6,7	38*	54,2*	**	19,3*	19,9*		2,4	3,2		6,6	7,7	
	IR	1,8	2,3	64,7*	82,6*	**	12,4*	21,6*	**	9,6*	6,9**	**	5	6,8	**
2 n=2	W	6,5	2,7	54	19,1		24	12		6	1,6		9	3	
	I	4,5	1,56	26,6	6,7		9,1	4,1		4,5	2		24,7	5,1	
	R	6,5	2,3	14,2	5,3		34,3	34,6		6,3	2,7		6	4,4	
	IR	2,8	3,2	77,2	60,7		26,9	7,5		4,3	3,6		5,4	6,7	
3 n=3	W	3,6	2,7	88,3	17,8		32,5	7,2		Nd			Nd		
	I	2,6	3,2	44,1	7,9		9	5							
	R	2	1,5	13,1	10,6		45,2	52,6							
	IR	2,1	2,5	84,2	94,1		30,6	19,9							
4 n=3	W	3	2,8	59,2	20,4		24,8	10,8		Nd			Nd		
	I	1,9	1,7	24,6	8,7		6,7	5,3							
	R	3,4	3,2	12	10,4		38,3	39,8							
	IR	3,3	3,9	66,2	49		18,8	16,4							

En esta tabla se resumen los valores de Fluorescencia normalizada por DO₆₂₀ (UA) obtenidos en los ensayos de expresión de GFP, para células de *S. meliloti* 1021 (W), *irr* (I), *rirA* (R) e *irr/rirA* (IR), portadoras de las construcciones pOT1, pOT1-P3787, pOT1-P3787 T, pOT1-Pbfr y pOT1-Pbfr T, para las condiciones de cultivo con hierro (+Fe) y sin hierro (-Fe). En la columna “-Fe vs. +Fe” indica con dos asteriscos (**) cuando hubieron diferencias significativas para una cepa y construcción dada, entre las condiciones -Fe y +Fe. Un asterisco (*) en las columnas correspondientes a -Fe y +Fe indica que hubieron diferencias significativas con respecto al contexto génico salvaje (W). Los valores en rojo son los correspondientes a la construcción pOT1 sin inserto y a los que no se diferenciaron significativamente de estos. Nd indica no determinado. Para las comparaciones se utilizó el test no paramétrico Kolmogorov-Smirnov, con un nivel de significancia de 0,05.

al contexto génico salvaje, indicando un posible rol de la proteína Irr como activador. Al analizar la expresión bajo la misma construcción en el contexto génico *rirA* (R) con respecto al salvaje, se observó en todos los ensayos una expresión sensiblemente menor en la condición - Fe, indicando un posible rol de la proteína RirA como activador. Sin embargo, al analizar la expresión en presencia de hierro, los resultados fueron variables, ya que en un ensayo la expresión resultó ser significativamente mayor, mientras que en los demás ensayos no se observaron diferencias significativas. Por último, en el contexto génico de la doble mutante *irr/rirA* (IR), la expresión de GFP en ausencia de hierro disminuyó en el primer ensayo, pero se mantuvo prácticamente invariante en otros dos ensayos independientes, mientras que en presencia del metal, ésta siempre aumentó notoriamente.

De forma similar a lo visto bajo el control de la construcción P3787, en la construcción extendida P3787 T, la expresión de GFP fue mayor en ausencia de hierro que en presencia del mismo, en el contexto génico salvaje. En el contexto génico *irr*, la expresión se mantuvo en niveles muy

bajos en ambas condiciones. En cuanto al contexto génico *rirA*, en todos los ensayos se observó que la expresión de GFP se mantenía al mismo nivel independientemente de la presencia de hierro. Al comparar estos resultados con los obtenidos en el contexto génico salvaje, se observó que en presencia de hierro, la expresión siempre fue menor, mientras que en ausencia del mismo, hubieron variaciones entre los experimentos realizados. Por último, en cuanto al contexto génico *irr/rirA* con respecto al contexto génico salvaje, se observó que la expresión tendió a aumentar en presencia de hierro, mientras que en ausencia del mismo se observó en un ensayo una disminución pero no se registraron diferencias en los ensayos subsiguientes.

La ausencia de diferencias significativas en los ensayos 2, 3 y 4, se debe, probablemente, a un bajo número de réplicas y al carácter conservador del test estadístico utilizado. Sin embargo, las tendencias encontradas son consistentes, indicando un patrón de regulación característico y repetitivo.

Evaluación de la actividad promotora mediante citometría de flujo

Además de evaluarse la F/DO₆₂₀ de los cultivos, se realizaron medidas de citometría de flujo, que permiten evaluar precisamente la intensidad relativa de fluorescencia emitida por cada célula, posibilitando medir rápidamente miles de eventos en cada muestra analizada.

A continuación se muestran algunos gráficos de dispersión frontal o *Forward Scatter* (FSC) vs. dispersión lateral o *Side Scatter* (SSC) e histogramas de fluorescencia verde (FL1) de células de *S. meliloti*, obtenidos mediante citometría de flujo. Estos corresponden a células de *S. meliloti* 1021 portadoras del plásmido pOT1 sin inserto crecidas en ausencia de hierro, donde se

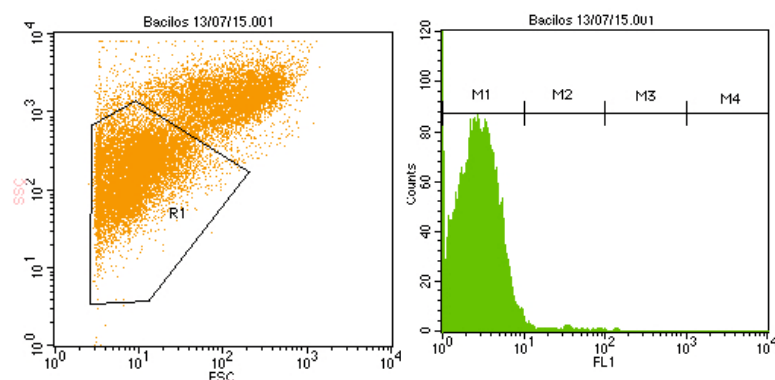


Fig. 36: Citometría de flujo de *S. meliloti* 1021 pOT1-Fe.

A la izquierda se muestra gráfico correspondiente a FSC vs. SSC, y a la derecha el histograma de Fluorescencia vs. Número de eventos, correspondientes a células *S. meliloti* 1021 portadoras del plásmido pOT1 sin inserto, crecidas en ausencia de hierro. Como se muestra en el gráfico de la izquierda, se observan dos poblaciones de células que corresponden a diferentes tamaños, presumiblemente causada por una contaminación en la muestra. Por esta razón se define la región R1, que contiene los eventos que se observaron en todas las muestras analizadas mediante esta técnica. En el histograma observado a la derecha se observan cuatro segmentos, que corresponden a intensidades de fluorescencia crecientes, de forma que M1 corresponde a una muestra con emisión de fluorescencia de GFP nula. En este caso, todos los eventos se encontraron dentro del segmento M1, indicando que no hubo emisión de fluorescencia, tal como se esperaba para la construcción correspondiente a pOT1 sin inserto

esperaba que no se emitiera fluorescencia (Fig. 36) y células de *S. meliloti* *irrA* y *rirA* portadoras de la construcción pOT1-P3787 crecidas en presencia de hierro (Fig. 37 y Fig. 38 respectivamente).

Como se observa en el gráfico FSC vs. SSC correspondiente a células de *S. meliloti* 1021-pOT1 crecidas en ausencia de hierro (Fig. 36, izquierda), se pueden distinguir dos poblaciones de células, que varían en tamaño y/o complejidad. Dado que este patrón no se observó en ninguna otra muestra de células de *S. meliloti* analizada mediante citometría de flujo, se fijó la región designada como R1, que incluye sólo los eventos que están representados en todos los análisis realizados. En los histogramas de fluorescencia vs. número de eventos, se observó que en el caso de muestras negativas, de las que no se esperaba emisión de fluorescencia, el pico estuvo ubicado en el segmento M1, correspondiente, según la configuración del equipo, a señales de fluorescencia nulas, mientras que para muestras que presentan fluorescencia, se registró un corrimiento de los picos hacia la derecha. La muestra correspondiente a células de *S. meliloti* *rirA* portadoras de la construcción pOT1-P3787 tanto en presencia (Fig. 38) como en ausencia de hierro (ver Anexo VI

Datos de cuantificaciones de fluorescencia mediante citometría de flujo), presentó una fluorescencia no homogénea, que se evidenció por la presencia de dos picos ubicados uno dentro de la zona de fluorescencia negativa y otro dentro de la zona de fluorescencia positiva. Esta heterogeneidad en la expresión es imposible de observar mediante otros métodos, ya que

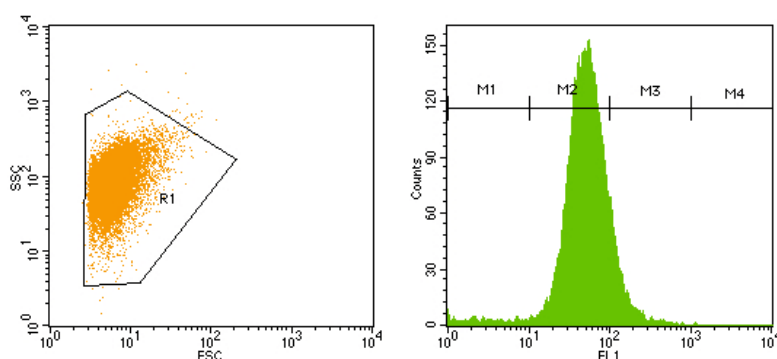


Fig. 37: Citometría de flujo de *S. meliloti* IrrRirA pOT1-P3787 +Fe

A la izquierda se muestra gráfico correspondiente a FSC vs. SSC, y a la derecha el histograma de Fluorescencia vs. Número de eventos, correspondientes a células *S. meliloti* IrrRirA- portadoras de la construcción pOT1-P3787 crecidas en presencia de hierro. En el gráfico FSC vs. SSC se observa que la mayoría de los eventos están comprendidos dentro de la región R1. En el histograma de fluorescencia, se observa un pico comprendido en el segmento M2, que corresponde a una media de 60 unidades arbitrarias de fluorescencia (UFA).

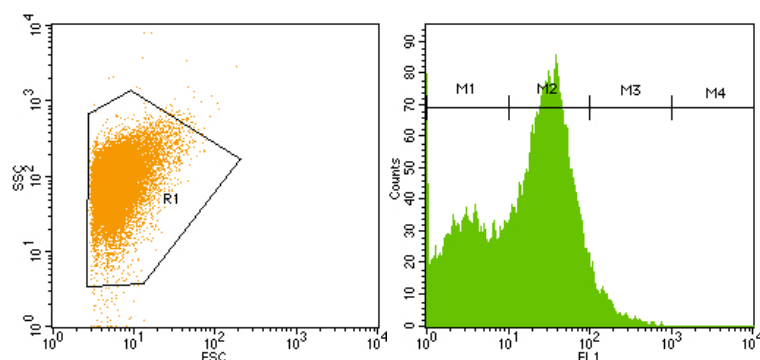


Fig. 38: Citometría de flujo de *S. meliloti* RirA pOT1-P3787 +Fe

A la izquierda se muestra gráfico correspondiente a FSC vs. SSC, y a la derecha el histograma de Fluorescencia vs. Número de eventos, correspondientes a células *S. meliloti* RirA- portadoras de la construcción pOT1-P3787 crecidas en presencia de hierro. En el gráfico de la izquierda, se observa que todos los eventos se encuentran dentro de la región R1. Al observar el histograma de la derecha, es evidente que la emisión de fluorescencia en la población no es homogénea, sino por el contrario, se observan dos poblaciones bien diferenciadas, representadas por los dos picos, uno de los cuales dentro del segmento M1, correspondiente a eventos que no emitieron fluorescencia, y el otro pico en el segmento M2, que corresponde a una fluorescencia emitida de entre 10 y 100 UFA. La altura del pico correspondiente a la población no fluorescente fue notoriamente menor que la fluorescente, indicando que el número de células que no emiten fluorescencia es menor que las que sí lo hacen.

no permiten distinguir entre las emisiones de fluorescencia individuales, y solo dan información de la fluorescencia total de la población estudiada.

A continuación se muestran las distribuciones de las poblaciones correspondientes a células de *S. meliloti* salvaje (W), de las mutantes *irr* (I), *rirA* (R) y de la doble mutante *irr/rirA* (IR), portadoras de las construcciones pOT1-P3787 y pOT1-P3787 T crecidas en presencia (+Fe) o ausencia (-Fe) de hierro. En la Fig. 39 se representan estos datos de forma gráfica, donde el 100% corresponde a la totalidad de los eventos comprendidos dentro de la región R1. Las categorías M1, M2 y M3 corresponden a diferentes niveles de fluorescencia definidos en forma

arbitraria considerando M1 cuando la UAF se encontraba entre 0 y 10 (correspondientes a una señal nula), M2 entre 10 y 100 UAF y M3 entre 100 y 1000 UAF.

Como se aprecia en la Fig. 39, existe una redistribución de las poblaciones celulares dependiente de la disponibilidad de hierro en el medio de cultivo, del contexto génico, y de la construcción, observándose a nivel global una mayor proporción de las poblaciones celulares distribuidas en niveles de fluorescencia nulos (M1) o bajos (M2) en la construcción P3787 T (Fig. 39 b) que en la P3787 (Fig. 39 a). Además, se observa para los entornos génicos salvaje e *irr* una mayor proporción de las células que no emiten fluorescencia en presencia de hierro que en ausencia del mismo, sin embargo, en el entorno génico *irr/rirA*, la distribución de los eventos no parece cambiar en función de la presencia de hierro en el medio de cultivo para la construcción P3787 (Fig. 39 a), así como en la muestra correspondiente a células de *S. meliloti rirA* portadoras de la construcción P3787 T (Fig. 39 b).

En los gráficos correspondientes a la Fig. 40, se muestra la contribución de cada población de células portadoras de la construcción pOT1-3787 (Fig. 40 a) o de la construcción pOT1-3787 T (Fig. 40 b), a la emisión de fluorescencia total emitida por la muestra. Para presentar estos gráficos se tomó en cuenta el número de eventos comprendidos en cada segmento y la fluorescencia media para cada uno de ellos, que se detallan en la Tabla 16 en el Anexo VI.

Como se observa en los gráficos representados en la Fig. 40, el segmento M2 aporta la mayoría de la fluorescencia detectada en cada muestra. En los contextos génicos salvaje e *irr*, tanto en presencia como en ausencia de hierro, la totalidad de la fluorescencia emitida corresponde al segmento M2, que comprende emisiones de entre 10 y 100 UAF por evento. Los valores de fluorescencia media detectada en el contexto génico salvaje en presencia de hierro fue de $17,56 \pm 9,28$, mientras que en el contexto génico *irr* fue de $13,11 \pm 3,16$ en presencia de hierro y de $19,83 \pm 9,54$ en ausencia del mismo. En las muestras correspondientes a células de *S. meliloti rirA* crecidas tanto en presencia como en ausencia de hierro así como en las correspondientes a la doble mutante *irr/rirA* en presencia del mismo, el aporte de la fluorescencia emitida por los eventos comprendidos en M3 a la fluorescencia total emitida por cada muestra rondan el 25%,

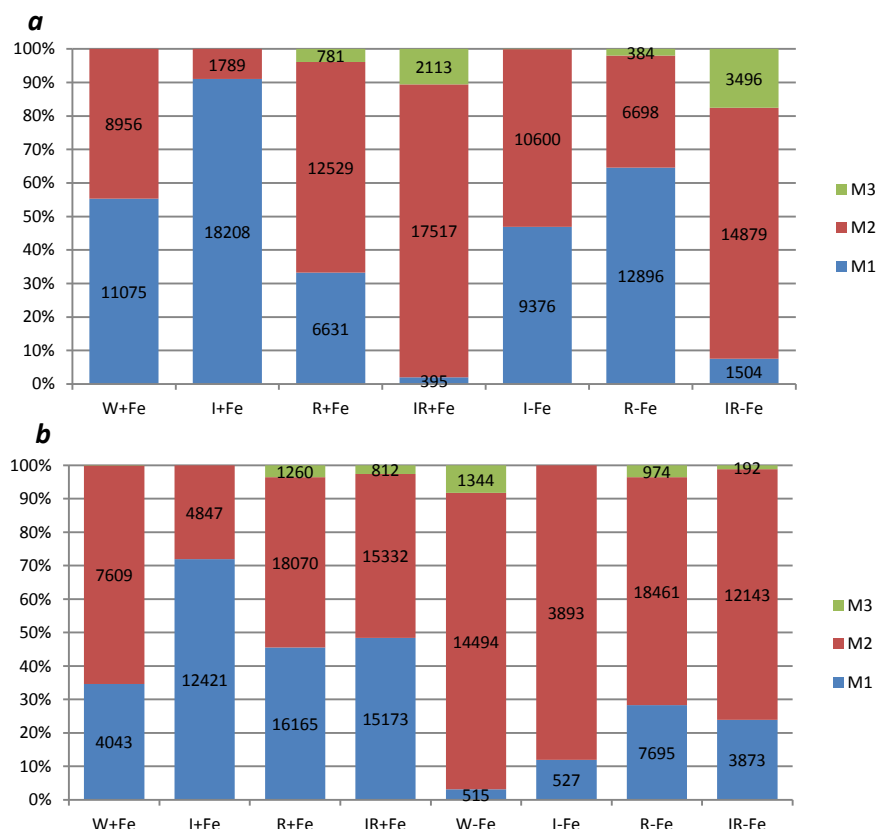


Fig. 39: Análisis de los resultados de las emisiones de fluorescencia mediante citometría de flujo:

Distribución de la fluorescencia en la población

En estos gráficos se muestran las distribuciones de las poblaciones de las células portadoras de las construcciones pOT1-P3787 (a) y pOT1-P3787 T (b) en cuanto a la fluorescencia emitida, distribuida en tres categorías. En azul se muestran los eventos englobados en el segmento M1, considerado como una señal de emisión de fluorescencia nula. En rojo se muestran los eventos que emitieron una fluorescencia entre 10 y 100 UAF, y en verde, los eventos comprendidos en el segmento M3, que corresponden a emisiones de fluorescencia de 100 a 1000 UAF.

mientras que el 75% restante son aportados por eventos en M2. En el caso de la doble mutante *irr/rirA* en ausencia de hierro, el aporte de los eventos comprendidos en M3 aumenta al 38%, con una media de $148,88 \pm 67,73$.

Nuevamente, para células portadoras de la construcción P3787 T (Fig. 40 b), la mayoría de la fluorescencia es aportada por eventos comprendidos en M2, siendo el único aportante en las muestras correspondientes al contexto génico *irr*, tanto en presencia como en ausencia de hierro así como también en el contexto salvaje en presencia de hierro. Se constataron eventos que emiten niveles mayores de fluorescencia en los entornos génicos *rirA*, tanto en presencia como en ausencia de hierro, así como también en el contexto salvaje en ausencia de hierro y en *irr/rirA* en presencia de hierro, pero en proporción siempre aportaron menores niveles de fluorescencia que los eventos comprendidos en la categoría de emisión de el contexto fluorescencia más bajos.

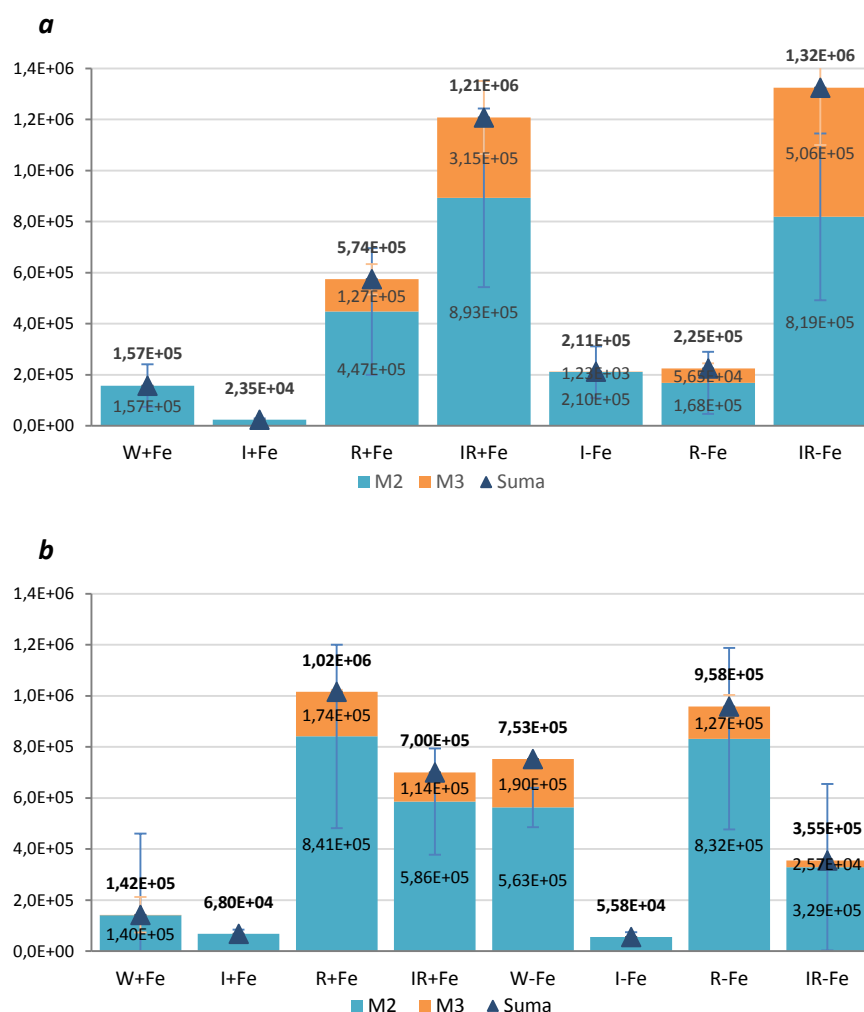


Fig. 40: Análisis de los resultados de las emisiones de fluorescencia mediante citometría de flujo: Aporte de fluorescencia de cada población

En estos gráficos se muestran en barras apiladas, el producto entre el número de eventos y la fluorescencia media emitida para cada categoría de fluorescencia de células de *S. meliloti* que contienen el vector pOT1 – P3787 (a) y pOT1-P3787 T (b) en los diferentes contextos génicos. M2 corresponde a niveles de fluorescencia de entre 10 a 100 y M3 de 100 a 1000 UAF. Los triángulos corresponden a la suma de las fluorescencias de las dos categorías con señales positivas. Los cambios en la predominancia de cada categoría indican cambios en la distribución de la fluorescencia en la población.

P3787 (a): En la cepa salvaje en presencia de hierro (W+Fe), se obtuvo un bajo nivel general de fluorescencia, y la mayoría de los eventos correspondieron a señales de fluorescencia nula, siendo toda la fluorescencia detectada aportada por eventos comprendidos en el nivel de fluorescencia baja (M2). En el caso de I-Fe, se observa que la emisión es aportada mayoritariamente por eventos comprendidos en M2. Al pasar a un medio con hierro (I+Fe) se observa un cambio en la distribución de los eventos, donde la mayoría de los mismos pasan a tener emisiones nulas, por lo cual el nivel general de la expresión en esta población disminuye considerablemente. Pasando al contexto génico *rirA*, en la condición sin hierro (R-Fe), si bien el nivel general de fluorescencia fue similar al encontrado en el contexto *irr*, la distribución entre los diferentes niveles de fluorescencia cambia, disminuyendo la fluorescencia aportada por el nivel M2 y con la aparición de la tercera categoría. Al analizar la condición +Fe, la emisión de fluorescencia total encontrada fue más alta que en la condición -Fe, donde el aporte de la fluorescencia de la población comprendida en M2 es casi cuatro veces mayor a la fluorescencia aportada por los eventos comprendidos en M3. En el contexto génico de la doble mutante *irr/rirA*, se observa que el aporte a la fluorescencia de los eventos comprendidos en M3 es algo menor en la condición +Fe (IR+Fe) que en la condición -Fe (IR-Fe), siendo notoriamente mayor al nivel de fluorescencia encontrado en el contexto génico salvaje bajo la misma condición (W+Fe).

P3787 T (b): En el contexto génico *irr* (I), se detectó un menor nivel de fluorescencia total, aportada en su totalidad por eventos con bajos niveles de fluorescencia, tanto en la condición + Fe como en la -Fe. En el contexto génico *rirA*, en la condición -Fe (R-Fe) se observó una mayor fluorescencia global, similar a la obtenida en la condición +Fe, y con una distribución equivalente. Finalmente, en el contexto génico *irr/rirA*, se observa una mayor emisión de fluorescencia en la condición +Fe, la cual resulta también mayor a la del contexto génico salvaje.

Los histogramas de fluorescencia y los gráficos FSC vs. SSC de todas las muestras analizadas se muestran en el Anexo VI

Datos de cuantificaciones de fluorescencia mediante citometría de flujo (Pág. 132).

Análisis de la expresión mediante qRT - PCR

Teniendo en cuenta la discrepancia en los resultados obtenidos para la actividad de los promotores analizados y la expresión del gen *bfr* determinada por los ensayos indirectos de actividad betagalactosidasa en el contexto génico *bfr* (los cuales pueden incluir factores de regulación postranscripcionales) se evaluó la presencia de transcritos ubicados en diferentes regiones del posible operón SMC03787-*bfr*. Esta metodología tiene la ventaja con respecto a los ensayos anteriores de no presentar artefactos metodológicos debidos al aumento de la cantidad de región promotora en la célula, lo que puede causar una titulación de reguladores transcripcionales. El paso clave para la cuantificación de los transcritos de interés es la purificación del ARN. Para esto, se partió de cultivos de *S. meliloti* 1021, *irr*, *rirA* e *irr/rirA*, que fueron crecidos hasta la fase exponencial tardía-inicio de fase estacionaria, en el medio de cultivo M3 suplementado con FeCl₃ 37 µM. Se utilizó el kit PureLink® RNA Mini Kit (Ambion), según se detalla en la sección Materiales y métodos. Una vez obtenidos, los mismos fueron visualizados en un gel de agarosa desnaturalizante, donde se constató la presencia de las bandas correspondientes a las subunidades 16 y 23S del ARN ribosomal, indicando la integridad de los ARNs extraídos (Fig. 41). Sin embargo, se pueden visualizar bandas correspondientes a fragmentos de ácido nucleico de gran peso molecular, que corresponden a ADN genómico (Fig. 41 a). Para que una cuantificación de transcritos sea interpretable es necesaria la remoción completa de los ADNs genómicos, ya que estos pueden ser amplificados durante la qPCR, dando lugar a señales erróneas.

Al visualizar los ARNs tratados con ADNasa en un gel de agarosa desnaturalizante, no se detectó la presencia de ADNg (Fig. 41 b), luego de lo cual se realizaron controles mediante qPCR utilizando los cebadores 16s F y 16s R en dos muestras independientes. Este ensayo dio como resultado la amplificación específica de un producto con una T_m de 84°C, tanto para los ARNs tratados como para los no tratados con ADNasa, así como para uno de los controles negativos, que resultó contaminado con ADN molde durante el sembrado de los tubos (Fig. 42).

Al comprobarse que el tratamiento utilizado no fue suficiente para la eliminación del ADNg de los ARNs extraídos, se realizó otro tratamiento con ADNasa a partir de 1 µg de los ARNs pretratados, utilizando esta vez 2 U de enzima e incubando durante 1 h a 37°C. Se realizó una

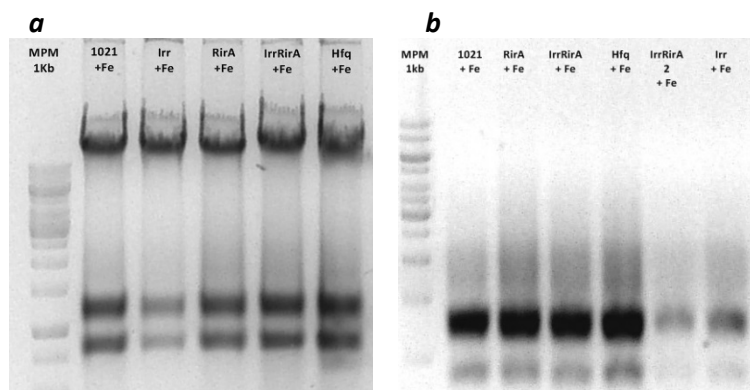


Fig. 41: Geles de agarosa desnaturizantes de las extracciones de ARN

Geles de agarosa desnaturizantes donde se corrieron los ARNs extraídos según se indica en la sección Materiales y métodos. A la izquierda se muestran los ARNs sin tratar con ADNasa, y a la derecha luego de un tratamiento como se especifica en el cuerpo del texto. Cada carril fue sembrado con 5 μ l de cada ARN extraído, diluido un 40% en buffer de corrida. En la parte inferior de los geles se observan las bandas correspondientes a las subunidades de ARN ribosomal 16 y 23S respectivamente. En la parte superior del gel mostrado a la izquierda (a), correspondiente a los ARNs no tratados con ADNasa, se observan bandas que corresponden a ADN genómico, por lo cual las extracciones realizadas no fueron eficientes en la eliminación del ADNg. La ausencia de bandas de ADN genómico en el gel de la derecha (b) indica un buen rendimiento del tratamiento con ADNasa realizado

qPCR a partir de estas muestras, y como se observa en la Fig. 43, el Cq de las muestras que se volvieron a tratar con ADNasa fue en el entorno de los 34 ciclos, es decir, entre 10 y 20 unidades mayores a los ARNs que recibieron sólo el primer tratamiento.

Con estos resultados se consideró que el tratamiento con ADNasa fue suficiente para proseguir con la realización de reacciones de retrotranscripción. En la Fig. 44 se muestran las curvas estándar para cada par de cebadores utilizados. En la parte inferior de cada curva se muestra la ecuación de la recta y la eficiencia de los cebadores utilizados. Las eficiencias de los cebadores fueron variables, de entre 78,9% para el par 16s, hasta 94,8% para el par srna.

En la Fig. 45 se muestran las curvas de amplificación obtenidas para cada transcripto, partiendo de los ADNc de células de *S. meliloti* 1021 salvaje, *irr*, *rirA* e *irr/rirA*, crecidas en presencia de hierro.

A simple vista se observa que los transcriptos srna y bfd tienen un patrón de expresión similar debido al parecido en sus respectivas curvas de amplificación, pero al observar las curvas correspondientes al transcripto bfr, se observan cambios sustanciales, con un claro aumento en el Ct en la muestra correspondiente a la doble mutante *irr/rirA*.

La disparidad en las eficiencias de los cebadores encontrada hacen que la única forma de interpretar los resultados obtenidos sea mediante la utilización de un método que tenga en cuenta las eficiencias de los cebadores, por lo tanto se prefiere el método de análisis descripto por Pfaffl (116). Mediante este método se determina la expresión relativa de un gen de interés,

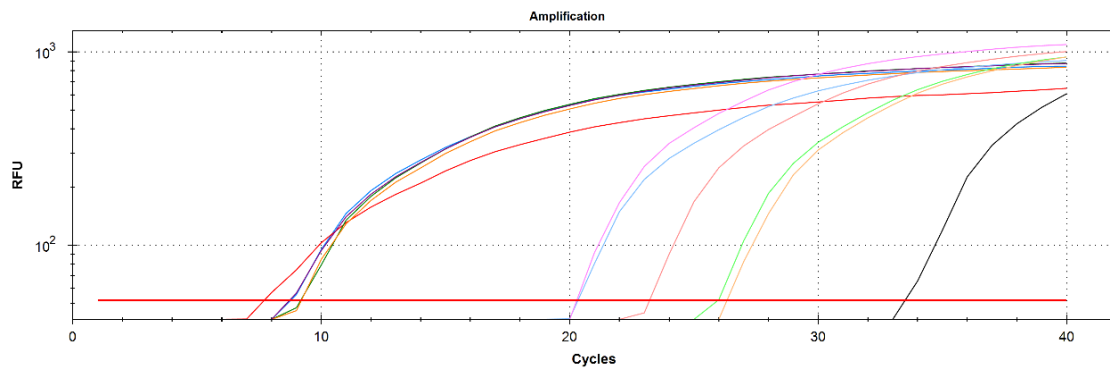


Fig. 42: Amplificación mediante qPCR de los ARNs tratados y no tratados con ADNasa

Esta figura muestra el gráfico de amplificación obtenido para los ARNs tratados y no tratados con ADNasa. En color más fuerte se muestra la amplificación correspondiente a los ARNs no tratados, que presentan valores de Cq de entre 7,66 hasta 9,15, mientras que los ARNs tratados con ADNasa se representan en colores claros, y presentaron valores de Cq de entre 20,26 y 26,32. La curva representada en negro corresponde a un control negativo al que no se agregó molde, sin embargo se obtuvo amplificación, con un valor de Cq de 33,57.

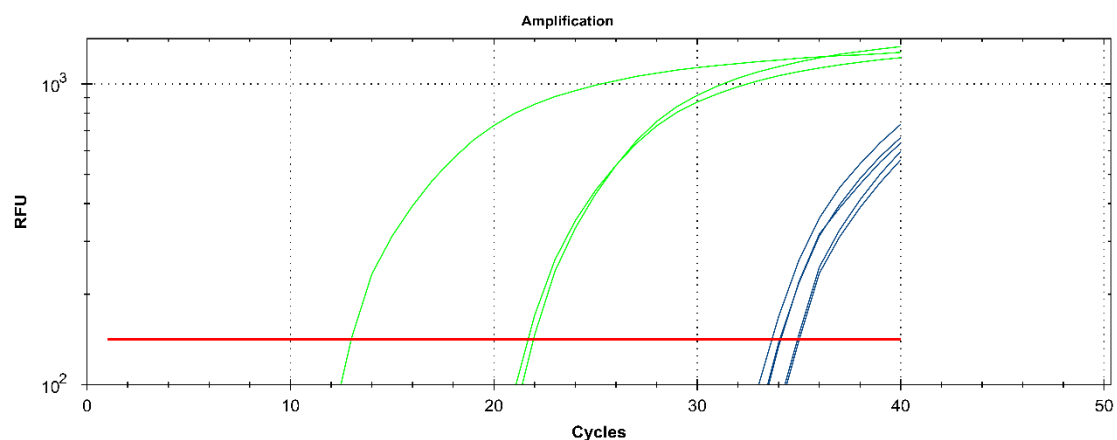


Fig. 43: Amplificación mediante qPCR de los ARNs tratados con ADNasa

Esta figura muestra el gráfico de amplificación obtenido para los ARNs pre-tratados y re-tratados con ADNasa. En verde se muestra la amplificación correspondiente a los ARNs tratados una vez con ADNasa, que presentan valores de Cq de entre 13 y 21. En azul se muestran los ARNs tratados dos veces con ADNasa, que presentaron valores de Cq en el entorno de 34.

en base a la eficiencia de la amplificación y la diferencia del Ct de la muestra de interés frente a una muestra control, en relación a la eficiencia y la diferencia de Ct de un gen de referencia. La ecuación utilizada en el método de Pfaffl es la siguiente:

$$relación = \frac{E_{prob}^{\Delta Ct(control-muestra)}}{E_{ref}^{\Delta Ct(control-muestra)}}$$
, donde E_{prob} es la eficiencia del gen de interés, E_{ref} es la eficiencia del gen de referencia y $\Delta Ct(control - muestra)$ es la diferencia de Ct entre la muestra control y de problema para el gen de interés o el de referencia.

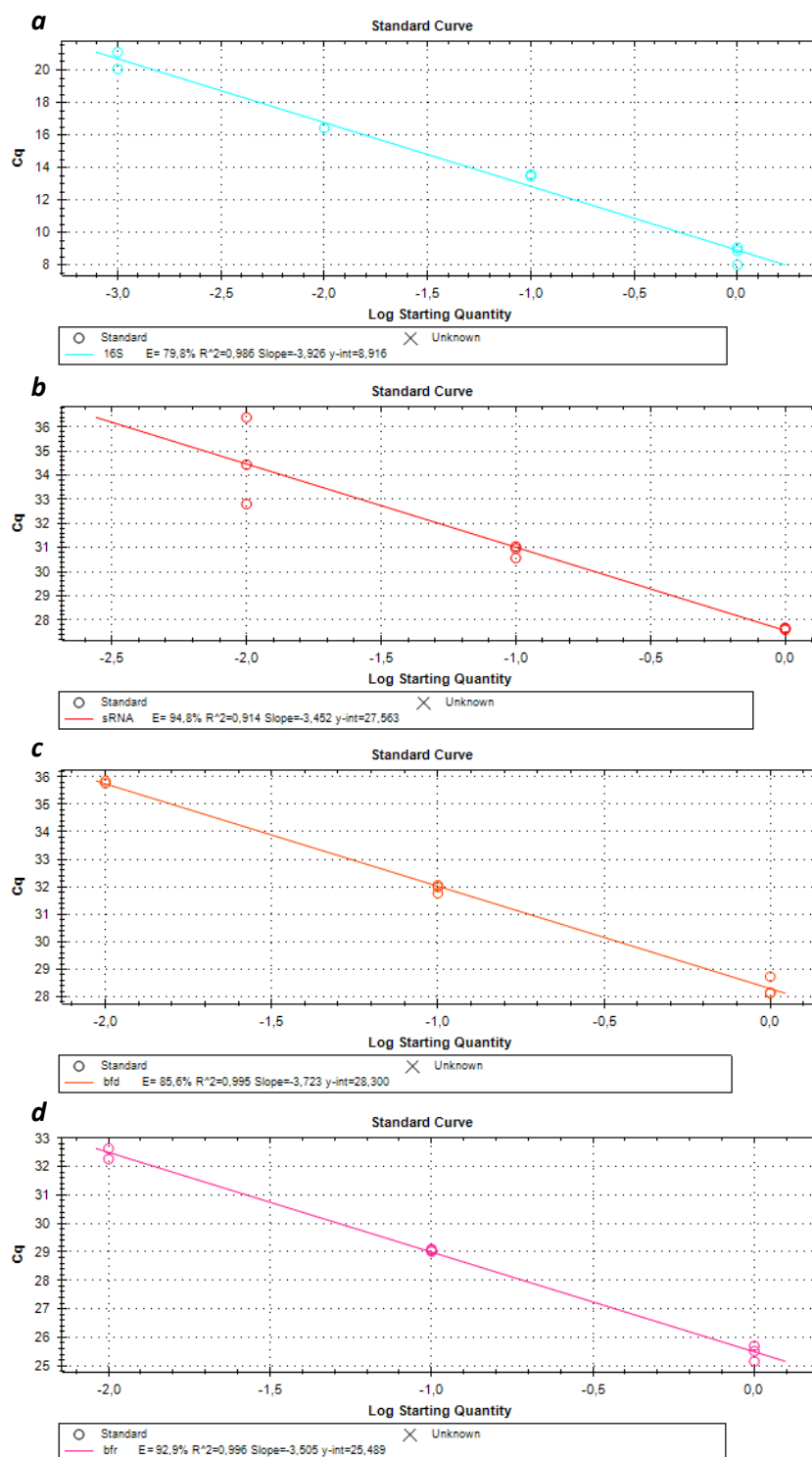


Fig. 44: qRT-PCR: Curvas estándar

En esta figura se muestran las curvas estándar obtenidas de la amplificación mediante qPCR de diluciones seriadas de ADNc de *S. meliloti* 1021 crecida en presencia de hierro, utilizando los pares de cebadores 16S (a), sRNA (b), bfd (c) y bfr (d). Como se observa, las eficiencias de los cebadores utilizados variaron entre 79,8 y 94,8 %.

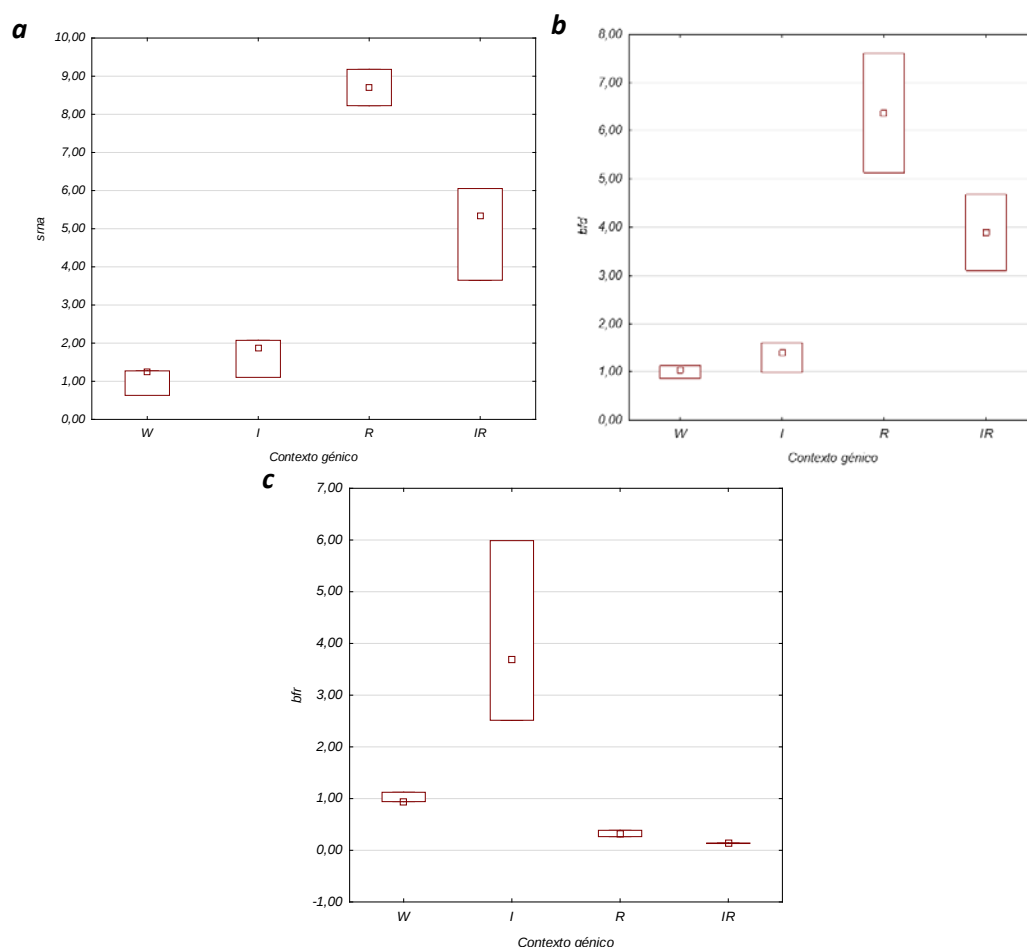


Fig. 45: Expresión de los transcritos srna, bfd y bfr en los diferentes contextos génicos en presencia de hierro

En este gráfico se observa la expresión de los transcritos srna (a), bfd (b) y bfr (c) en los diferentes contextos génicos, en presencia de hierro.

srna (a): la expresión de srna en el contexto génico *irr* (I) es similar al de la cepa *S. meliloti* 1021 salvaje (W), pero en los contextos génicos *rirA* (R) e *irr/rirA* (IR), la expresión aumenta, entre nueve y cinco veces en respectivamente.

bfd (b): la expresión de en el contexto génico *irr* (I) es similar al de la cepa *S. meliloti* 1021 salvaje (W), pero en los contextos génicos *rirA* e *irr/rirA*, la expresión es mayor aumentando alrededor de seis veces en *rirA* y cuatro veces en *irr/rirA*, de forma similar a lo observado en a.

bfr (c): en el contexto génico *irr* (I) la expresión fue mayor al de la cepa *S. meliloti* 1021 salvaje (W), llegando a expresarse aproximadamente cuatro veces más que la salvaje, pero en los contextos génicos *rirA* e *irr/rirA*, la expresión fue menor, alrededor de tres veces menor en *rirA* y seis veces en *irr/rirA*, al contrario de lo observado en a y en b.

La Tabla 8 muestra la relación calculada según el contexto génico normalizados según la expresión del gen de referencia ADN_r 16S (16s). En la Fig. 45 se muestran los gráficos de cajas correspondientes a la expresión de cada transcripto cuantificado.

Para determinar si las diferencias entre los diferentes contextos génicos son significativas, se realizaron tests no paramétricos de comparación de medianas, comparando cada contexto génico con el contexto génico salvaje. Como se observa en la tabla de comparaciones de medianas (Tabla 9), se detectaron diferencias significativas en la expresión de todos los transcriptos analizados en los contextos génicos *rirA* e *irr/rirA*, pero en el contexto génico *irr* solo

se detectaron diferencias significativas para el transcripto *bfr*, el cual se expresó casi cuatro veces más que en la cepa salvaje. Los transcriptos *srna* y *bfd* se comportaron en forma similar aumentando su expresión con respecto a la cepa salvaje en las mutantes *rirA* e *irr/rirA* mientras que para el transcripto *bfr*, la expresión fue a la inversa ya que disminuyó en los contextos *rirA* e *irr/rirA*.

Tabla 8: Relación de expresión normalizado por el gen de referencia 16S

Contexto génico		Relación			
Transcripto	16s	srna	Bfd	bfr	
W	1,00	1,24	1,03	0,95	
W	1,00	0,63	1,12	1,12	
W	1,00	1,27	0,86	0,94	
I	1,00	2,07	1,60	5,99	
I	1,00	1,88	1,40	3,69	
I	1,00	1,10	0,99	2,51	
R	1,00	9,18	7,62	0,39	
R	1,00	8,23	5,13	0,26	
R	nd	nd	Nd	nd	
IR	1,00	3,65	Nd	0,14	
IR	1,00	5,34	3,11	0,13	
IR	1,00	6,05	4,68	nd	

Esta tabla resume las relaciones entre los niveles de transcriptos *srna*, *bfd* y *bfr*, tomando 16s como referencia. nd indica no determinado

Tabla 9: Comparación de medianas de las expresiones los diferentes transcriptos con respecto al contexto génico salvaje

Grupo de comparación	Transcripto	medianas		p-valor	Significancia	Ratio
W vs. I	srna	1,24379659	1,87772881	0,382733	NS	-
	bfd	1,03275301	1,40135753	0,382733	NS	-
	bfr	0,947130854	3,69191185	0,0808565	*	3,8965
W vs. R	srna	1,24379659	8,703036	0,083265	*	6,9971
	bfd	1,03275301	6,375459	0,083265	*	6,1733
	bfr	0,947130854	0,325423	0,083265	*	0,3436
W vs. IR	srna	1,24379659	5,344151	0,049535	**	4,2966
	bfd	1,03275301	3,894982	0,083265	*	3,7715
	bfr	0,947130854	0,136335	0,083265	*	0,1439

Medianas de la expresión de cada transcripto obtenidas mediante la ecuación indicada en la pág. 82. * y ** indican diferencias significativas con un p-valor de 0,1 y 0,05 respectivamente, y NS indica no significativo

Estos experimentos se realizaron en base a una única extracción de ARN por cada contexto génico, con lo cual no es posible determinar si las diferencias encontradas son representativas, y por lo tanto, solamente basando el análisis en los resultados obtenidos mediante qRT – PCR no es posible establecer conclusiones sobre las funciones de las proteínas Irr y RirA como reguladores de la expresión génica.

Discusión

Como se mencionó en la Introducción, debido a la esencialidad que presenta el hierro para los organismos a pesar de su baja biodisponibilidad y el gran problema asociado a su toxicidad en presencia de oxígeno, los sistemas que regulan la adquisición y utilización del hierro deben estar finamente regulados para que las células puedan cumplir sus funciones metabólicas adecuadamente. Partiendo del supuesto que las proteínas de almacenamiento de hierro son importantes para el metabolismo celular de rizobio y quizás para el establecimiento de una asociación simbiótica efectiva, se decidió estudiar los mecanismos de regulación que actúan sobre la expresión del gen de la bacterioferritina de *S. meliloti* 1021, el único gen identificado en su genoma con homología a otros genes involucrados en el almacenamiento de hierro.

La primera aproximación para el estudio de su regulación fue mediante la determinación de la actividad betagalactosidasa de células portadoras de la mutación *bfr::lacZGm^R* en condiciones de disponibilidad y escasez de hierro donde se observó que la bacterioferritina de *S. meliloti* aumenta su expresión en condiciones de disponibilidad de hierro. Este resultado es el esperado por tratarse de una proteína de almacenamiento de hierro. Sin embargo, en la condición limitante en hierro, la expresión disminuye significativamente, pero no se anula. De esta manera, siempre habría una expresión basal de la proteína pero en condiciones de disponibilidad del mismo, la expresión aumenta, ya sea por un mecanismo de activación o de desrepresión. Este resultado es concordante con los datos disponibles sobre la regulación de proteínas de almacenamiento de hierro en otros microorganismos, y aporta indicios de que la bacterioferritina de *S. meliloti* 1021 tiene como función el almacenamiento de hierro (ver Capítulo II: Funciones fisiológicas de la bacterioferritina de *S. meliloti* 1021).

Como en el ensayo anterior, la expresión se estaba analizando en un contexto carente de bacterioferritina y no en un contexto salvaje y también con la finalidad de analizar en particular la regulación transcripcional y determinar la participación de las proteínas Irr y RirA, se evaluó la actividad de posibles regiones promotoras involucradas. De acuerdo a la bibliografía consultada (41) se esperaba que los ORFs SMc03787 y *bfr* fuesen un único operón, designado como *bfd-bfr*, que presenta su región promotora corriente arriba de SMc03787, con los elementos -10 y -35 típicos, además de posibles sitios de unión a RirA (cajas RirA) en las posiciones -67 (caja RirA1) y -140 (caja RirA2) y un posible sitio blanco de la proteína Irr (caja Irr) en la posición -120 con respecto al ORF SMc03787 (41). Schlüter y colaboradores (100) reportaron asimismo cuatro sitios de inicio de la transcripción, designados SMc_TSS09936 y SMc_TSS09935 ubicados corriente arriba de SMc03787 y SMc_TSS09932 y SMc_TSS09933,

corriente arriba del gen *bfr* (ver Fig. 20). Teniendo esta información en cuenta, se examinó la actividad promotora de cuatro regiones, denominadas P3787, P3787 Trad, Pbfr y Pbfr Trad. P3787 abarca desde la posición -232 hasta la -3 con respecto al inicio del marco de lectura abierto de SMC03787, P3787 T se extiende hasta 196 pb luego del inicio de SMC03787 y contiene el marco de lectura correspondiente al pequeño ARN SmelC759, Pbfr abarca desde la posición -163 hasta -5 con respecto al inicio del gen *bfr*, mientras que Pbfr Trad se extiende más allá del mismo, hasta la posición 307 (ver Fig. 22).

Al realizar las medidas de fluorescencia en relación al crecimiento celular, se observó que bajo el control de la región P3787, GFP se expresa en ambas condiciones de disponibilidad de hierro, aumentando significativamente en ausencia de éste, al contrario de lo observado para la expresión de Bfr (ver Fig. 35).

En el caso de las construcciones que contenían las regiones Pbfr y Pbfr T, no se detectó actividad alguna tanto en presencia como en ausencia de hierro, lo cual estaría indicando que esta región no tendría actividad promotora (Fig. 35). Sin embargo, la presencia de sitios de inicio de la transcripción reportados unos 50 pb corriente arriba del inicio del ORF correspondiente a *bfr* y la alta representatividad de los mismos, no permite descartar la presencia de los elementos promotores clásicos -10 y -35 en la región. Este hecho abre la posibilidad de que para llevarse a cabo la expresión a partir de estos sitios de inicio de la transcripción sea necesaria la región ubicada corriente arriba de SMC03787, la cual podría permitir cambios en la topología del ADN dando un mejor acceso a la maquinaria de transcripción.

Los resultados obtenidos mediante qRT-PCR a partir de ARN obtenido de células de *S. meliloti* 1021 crecidas en presencia de hierro revelaron que el transcripto *bfr* presenta una expresión mayor que los precedentes *srna* y *bfd* (ver Fig. 45). Si bien el ensayo se realizó en una única réplica biológica y no se disponía de la condición sin hierro, este resultado concuerda con los datos obtenidos anteriormente mediante los ensayos de actividad betagalactosidasa (ver Fig. 30). Por otra parte la cuantificación de los transcriptos *srna* y *bfd* se condice con una menor actividad promotora en presencia de hierro de la región inmediatamente corriente arriba de SMC03787 (ver Fig. 45). Por lo tanto, a partir de los resultados obtenidos mediante las tres aproximaciones empleadas se puede concluir que la expresión del gen *bfr* es alta en presencia de hierro mientras que los genes precedentes, correspondientes al SMC03787 y al ARN pequeño SmelC759 tienen una expresión menor. Por el contrario, en ausencia de hierro el comportamiento es inverso observándose una mayor actividad de la zona promotora P3787 y una disminución en la expresión de *bfr* aunque ésta no se suprime totalmente.

La proteína Irr participa en la regulación de la expresión de *bfr*

Cuando se analizó la expresión de Bfr en el contexto génico *irr* mediante la construcción *bfr::lacZGmR*, se observó un aumento de la expresión en presencia de hierro y una disminución en ausencia del mismo con respecto al contexto salvaje. Un efecto similar y significativo fue observado al cuantificar mediante qRT-PCR los transcritos correspondientes a *bfr* en presencia de hierro (ver Fig. 45). Este resultado estaría indicando en primer lugar, que la proteína Irr participa en la regulación de la expresión de *bfr*, siendo éste el primer trabajo donde se describe su función en *S. meliloti*. Además, de acuerdo a los datos obtenidos, su función sería reprimir (directa o indirectamente) la expresión del gen *bfr* en presencia de hierro y activar su expresión en condiciones de limitación del metal.

En el segundo abordaje planteado se comparó la expresión de fluorescencia de células de *S. meliloti* 1021 salvaje y de la mutante *S. meliloti irr* portadoras de las construcciones en pOT1, determinándose que en ausencia de hierro la expresión de GFP bajo el control de P3787 disminuye considerablemente en el caso de la mutante. En presencia de hierro se detectó un bajo nivel de expresión de fluorescencia, al igual que en el entorno génico salvaje. Las determinaciones realizadas mediante medidas espectrofluorimétricas o por citometría de flujo dieron resultados similares y concuerdan con los datos obtenidos por qRT-PCR para la condición ensayada, e indican un rol de la proteína Irr como activador tanto en presencia como en ausencia de hierro.

Al analizar la expresión de GFP en la construcción Pbfr T, se encontró que en ausencia de hierro, ésta aumentaba considerablemente en la mutante *irr* con respecto a la cepa salvaje. Esto podría indicar la presencia de una región promotora que se encuentra comprendida dentro de la región que pertenece a Pbfr T, que no está incluida en Pbfr (es decir, estaría dentro de la región codificante de *bfr*) y que es fuertemente reprimida en presencia de Irr. Se puede resaltar que no se ha encontrado ninguna caja Irr en la región inmediatamente corriente arriba de *bfr* o dentro de su secuencia codificante, por lo cual es posible que la influencia de la expresión de *bfr* por esta proteína ocurra mediante un mecanismo indirecto. Para comprobar si la caja Irr presente corriente arriba de SMC03787 es responsable del cambio en la expresión de *bfr* en la mutante *irr*, se podrían realizar mutaciones puntuales en su secuencia, y evaluar su efecto en la actividad promotora y en la expresión de SMC03787 y de *bfr*. Con los datos disponibles, no es posible proponer un modelo que explique la función de Irr en la expresión de esta región.

La proteína Irr fue descrita por primera vez en el rizobio *B. japonicum* (89) y su función como regulador en la homeostasis del hierro se comprobó en esta bacteria (96), en *A. tumefaciens*

(32) y en *B. abortus* (93) entre otras. En *B. japonicum* se demostró *in vitro* que la proteína Irr se une a la caja Irr presente en la región promotora del gen de la bacterioferritina (96), e *in vivo*, que en condiciones limitantes en hierro, en presencia la caja Irr intacta, Irr reprime su expresión (117). Como se mencionó anteriormente, en *S. meliloti* la presencia de este elemento fue reportada corriente arriba de SMC03787, y en este trabajo se determinó que la actividad promotora de esta región en ausencia de hierro es reprimida en una cepa carente de Irr, lo cual sugeriría que la expresión de *bfr* debería aumentar en ese contexto génico (ver Fig. 45 c). De esta forma, el resultado presentado en este trabajo coincide con el descrito en *B. japonicum*, indicando que Irr actúa como represor de la expresión de *bfr* en ausencia de hierro aunque el mecanismo de acción parecería ser indirecto.

La proteína RirA participa en la regulación de la expresión génica de *bfr*

Cuando se analizó la actividad de la región P3787 en un contexto génico *rirA*, se encontró que en ausencia de hierro la expresión de GFP disminuye con respecto a la cepa salvaje. Al analizar la misma construcción en presencia de hierro mediante espectrofluorimetría, los resultados fueron variables, encontrándose en un ensayo que la expresión aumentaba significativamente, mientras que en otros tres ensayos independientes, se observó una disminución de la expresión, aunque esta tendencia no fue estadísticamente significativa. Al analizar los datos obtenidos mediante citometría de flujo, se observó que la fluorescencia emitida por evento no fue homogénea, sino que se encontraron dos poblaciones, representadas por dos picos en el histograma de fluorescencia vs. número de eventos, uno de los cuales estaba ubicado dentro de la zona de emisión de fluorescencia negativa, y el otro dentro de la zona de fluorescencia positiva, predominando la población fluorescente en presencia de hierro y la no fluorescente en ausencia del mismo. Si la cuantificación de la fluorescencia mediante citometría no hubiera sido analizada de forma estratificada, los niveles de desvío estándar hubieran sobrepasado las medias de fluorescencia obtenidas, con lo que no hubiera sido posible extraer conclusiones sobre la actividad promotora de P3787 en ausencia de la proteína RirA. Sin embargo, al definir las cuatro regiones en función de la fluorescencia emitida, se pudo observar una migración de parte de la población no fluorescente hacia la zona de emisión positiva en presencia de hierro. A su vez, los resultados obtenidos de la cuantificación de los transcritos de *srna* y *bfd* en presencia de hierro coinciden con los obtenidos mediante las medidas de citometría. Estos resultados indican una función represora de la proteína RirA en el caso de la expresión de SMC03787 en presencia de hierro y apoyan los resultados previamente publicados por Chao y colaboradores (34) obtenidos mediante microarrays.

A diferencia de Irr, RirA tiene dos posibles sitios de unión en la región corriente arriba de SMC03787. La caja RirA1 está situada entre las posiciones -108 y -88, y la segunda se encuentra entre las posiciones -41 y -14 con respecto al sitio de inicio de la transcripción SMC_TSS09936 identificado en el trabajo de Schlüter y colaboradores (100). La primer caja RirA está en la posición inmediatamente corriente arriba de la caja Irr, por lo cual se podría esperar que la unión de una proteína a su sitio de unión impida la unión de la otra. La segunda caja RirA se encuentra solapando totalmente el elemento -35 y el espaciador entre este elemento y el elemento -10 del promotor de SMC03787, por lo que es altamente probable que RirA actúe sobre este sitio, impidiendo la unión de la ARN polimerasa, y así, el inicio de la transcripción. Ver pág. 34 y Fig. 20.

Cuando se cuantificó el transcripto correspondiente al gen *bfr* mediante qRT-PCR, se observó que a diferencia de lo encontrado para los transcriptos *srna* y *bfd*, en ausencia de RirA la expresión disminuía un 75% con respecto a la expresión en la cepa salvaje. Estos resultados, en conjunto están indicando un rol de RirA como activador de la expresión de gen *bfr*. Los trabajos disponibles sobre la regulación mediada por RirA en *S. meliloti* y *R. leguminosarum* indican que esta proteína actúa mayoritariamente reprimiendo los genes que controla, y en pocos casos se ha reportado la activación mediada por RirA (34, 118, 119). Sin embargo, esta activación puede ser indirecta, a través de la represión de RirA de un segundo represor, dando en suma, una activación de la expresión. Este fue el caso reportado para el gen *dppA1*, cuyo producto está vinculado al transporte a través de la membrana interna del ácido δ -aminolevulínico, un precursor en la biosíntesis de hemo (118). En este caso, Viguier y colaboradores (118) demostraron mediante qRT-PCR que en *S. meliloti* 2011 la expresión de *dppA1* es activa en presencia de hierro, pero que en la mutante RirA, la activación se suprime.

Dado el contraste encontrado entre la actividad promotora de la región corriente arriba de SMC03787 y la cuantificación relativa de los transcriptos *srna* y *bfd*, con respecto a la expresión del transcripto *bfr*, y tomando en cuenta que no se encontró actividad promotora en la región inmediatamente corriente arriba de *bfr*, se podría esperar que su expresión esté regulada a través de la expresión de las regiones corriente arriba, y que un producto de la transcripción de esta región, por ejemplo SmelC759, actúe como efector negativo en la expresión de *bfr*.

Función coordinada de Irr y RirA en la regulación de la expresión de SMC03787/SmelC759 y *bfr*

Con el fin de evaluar si la proteína activadora Irr es esencial para la expresión del gen o si su función es desreprimir levantando la represión mediada por RirA, se analizó la regulación de la

expresión de *bfr* y SMc03787 y la actividad promotora de SMc03787 en la doble mutante carente de *Irr* y de *RirA*. En el caso que *Irr* sea un activador “*per se*” se esperaría que al no estar presente aún en ausencia del represor, no fuera posible la expresión. Si la función fuera levantar la represión mediada por *RirA* y no fuera necesaria para activar directamente la expresión, se esperaría lograr un nivel de expresión similar al observado en el caso de la mutante carente de *RirA*. Otra posibilidad sería que *Irr* reprima la expresión de *rirA* directa o indirectamente, por lo que la concentración de *RirA* sería menor en presencia de *Irr*. Esta disminución en la concentración de *RirA* imposibilitaría la unión de *RirA* a las cajas *RirA* presentes en la región promotora de SMc03787, permitiendo que *Irr* se una a la caja *Irr*, ejerciendo su acción. Apoyando esta hipótesis, en la posible región promotora del gen *rirA* se encuentra una caja *Irr*. Sin embargo, hasta el momento no se ha encontrado que *Irr* afecte la expresión de otros genes regulados por *RirA* (Fabiano *et al.*, datos no publicados).

Al analizar los resultados obtenidos en presencia de hierro, se ve claramente que la falta de ambos reguladores produce un aumento significativo de la expresión tanto de SmelC759 como de SMc03787, sin embargo no se logran los valores alcanzados en la mutante *rirA*. Este resultado sugiere que las tres posibilidades anteriores pueden ser ciertas y actuar simultáneamente, o sea *Irr* podría estar ejerciendo una función activadora en sí misma a la vez de desplazar a la proteína represora *RirA* de su sitio blanco y regular negativamente la expresión de *rirA*. Cuando ambas proteínas están presentes habría un equilibrio entre los sitios libres y ocupados en una misma célula.

Al igual que lo observado anteriormente, la expresión del gen *bfr* es la inversa que para 3787, o sea cuando ambos reguladores están ausentes, disminuye notablemente la expresión de *bfr*.

En ausencia de hierro la situación parecería más compleja ya que al faltar los dos reguladores el nivel de expresión es significativamente mayor que cuando sólo falta uno de ellos. Una posible explicación a este fenotipo es que esté involucrado un factor adicional desconocido, responsable de la represión sólo cuando ambos reguladores están presentes. Por otra parte, en estas condiciones, la participación de SmelC759 en la regulación parecería ser más importante ya que como se mostró anteriormente, la construcción P3787T que contiene al pequeño ARN produce un efecto más exacerbado en la actividad del promotor dependiente de *Irr*, con respecto a la construcción P3787. En el caso de *RirA* (en presencia de *Irr*) su acción depende fuertemente de SmelC579, ya que al aumentar su concentración pierde su capacidad activadora. Lamentablemente no se disponen de datos del ensayo de citometría para la cepa salvaje en estas condiciones, ni la cuantificación de transcriptos que permitan corroborar los resultados.

Modelo de expresión de SMc03787/SmelC759 y *bfr*

Teniendo en cuenta los datos obtenidos en las diferentes aproximaciones utilizadas en este trabajo, se puede elaborar un modelo hipotético de expresión de SMc03787 y *bfr* en presencia y ausencia de hierro, sin embargo, falta aún información que permita corroborar la validez de este modelo.

Puede suponerse la expresión de tres transcritos de diferentes tamaños: uno de ellos (representado como T1), comienza en uno de los sitios de inicio de transcripción designados SMc_TSS09932, SMc_TSS09933, corriente arriba de SMc03787, permitiendo la expresión del ARN pequeño SmelC759 (ver Fig. 46). La segunda opción es la generación del transcripto T2, que comienza en los sitios de inicio ubicados inmediatamente corriente arriba de *bfr* y permiten la expresión de *bfr*, mientras que la expresión de SMc03787 y de SmelC759 permanece inactiva (ver Fig. 47). Por último, se puede esperar también la expresión del transcripto T3, representado en la Fig. 48, que comienza en los mismos sitios de inicio que T1, pero prosigue permitiendo la expresión tanto de SMc03787 y SmelC759, como de *bfr*.

Modelo de regulación en presencia de hierro

En este trabajo se demostró claramente que la expresión de *bfr* aumenta considerablemente en presencia de hierro, mientras que la actividad promotora de la región corriente arriba de SMc03787, zona donde se encuentran las cajas RirA e Irr resultó ser mayor en ausencia de hierro. Esta dicotomía puede explicarse planteando la hipótesis de que la expresión de *bfr* es regulada negativamente en función de la expresión del transcripto ubicado corriente arriba, no descartándose la posibilidad de que el efector que determina la expresión de *bfr* se trate del ARN pequeño SmelC759, cuya función aún no ha sido reportada. Según el modelo planteado (ver Fig. 49), la unión de RirA en los sitios ubicados en la región promotora de SMc03787 impide la expresión de SMc03787 y de SmelC759. Al no estar presente este ARN pequeño, se expresaría un factor desconocido, que tendría la función de activar la expresión del transcripto T2, y por lo tanto de la bacterioferritina. De esta manera, se está proponiendo un rol de Irr como represor indirecto y de RirA como activador indirecto en la expresión de la bacterioferritina.

Modelo de regulación en condiciones limitantes de hierro

El escenario en condiciones limitantes de hierro resulta poco claro, ya que se observó que la expresión de la bacterioferritina no está totalmente reprimida en esta condición. En la Fig. 50 se muestra un posible modelo de regulación bajo estas condiciones. La expresión moderada de *bfr* puede explicarse si se considera que en ausencia de hierro prima la expresión desde el sitio de inicio ubicado inmediatamente corriente arriba de SMc03787. La expresión a partir de este

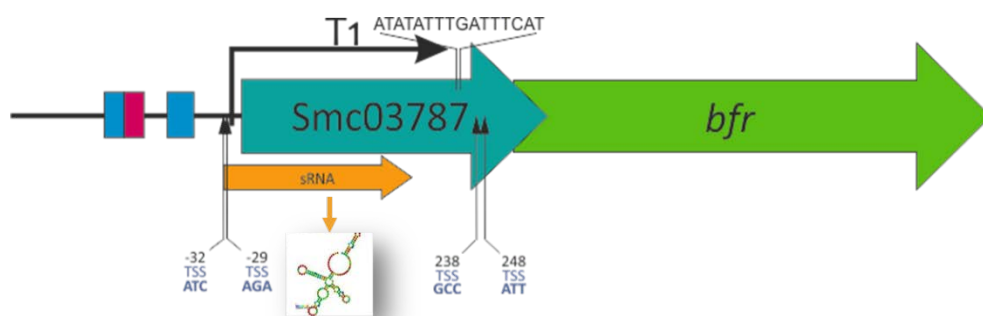


Fig. 46: Expresión a partir de SMc_TSS09932 o SMc_TSS09933 generando el transcripto T1
Representación del transcripto T1, generado a partir de los inicios de transcripción SMc_TSS09932, SMc_TSS09933, que resulta en la expresión de SmelC759.

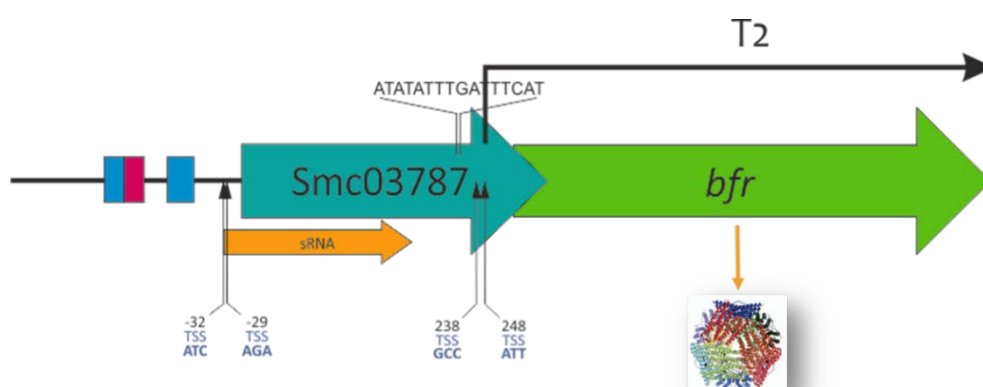


Fig. 47: Expresión a partir de SMc_TSS09935 o SMc_TSS09936 generando el transcripto T2
Representación del transcripto T2, generado a partir de los inicios de transcripción SMc_TSS09935 o SMc_TSS09936, permitiendo la expresión de *bfr*.

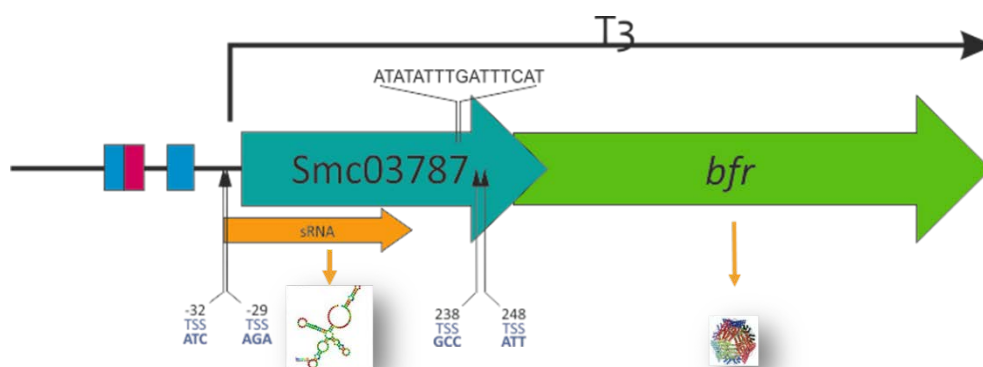


Fig. 48: Expresión a partir de SMc_TSS09932 o SMc_TSS09933 generando el transcripto T3
Representación del transcripto T3, generado a partir de los inicios de transcripción SMc_TSS09932 o SMc_TSS09933, permitiendo la expresión del SmelC759 y de *bfr*.

sitio, permitiría la expresión de los transcriptos T1 y T3, gracias a la presencia de un terminador en esta región identificado mediante análisis *in silico*, en la posición 156 con respecto a SMc_TSS09932 siendo su secuencia GCGGCCGTTGCTGC (C. Valverde, comunicación personal). La presencia del transcripto T3 sería producto de un salto al terminador, lo que se conoce como “leaky terminator” o terminador goteante. Los resultados obtenidos sugieren asimismo la presencia de un tercer efector diferente a *Irr* y a *RirA*, que disminuye levemente la actividad promotora de la región corriente arriba de SMc03787.

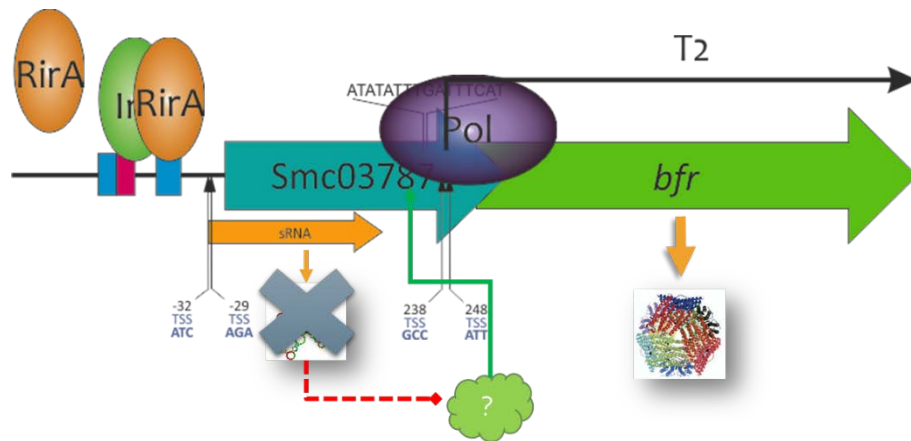


Fig. 49: Modelo hipotético de expresión de la bacterioferritina en presencia de hierro

En esta figura se representa el modelo de expresión planteado para la condición de disponibilidad de hierro, que permite la expresión de la bacterioferritina. En este, la unión de RirA y/o IrRirA en la región promotora de SMc03787 reprime la expresión del ARN pequeño SmelC759. En ausencia de este ARN pequeño, la expresión de un efector desconocido se desreprime, y permite la transcripción a partir de los sitios de inicio SMc_TSS09935 o SMc_TSS09936, generando así el transcripto T2, que permite la expresión de la bacterioferritina.

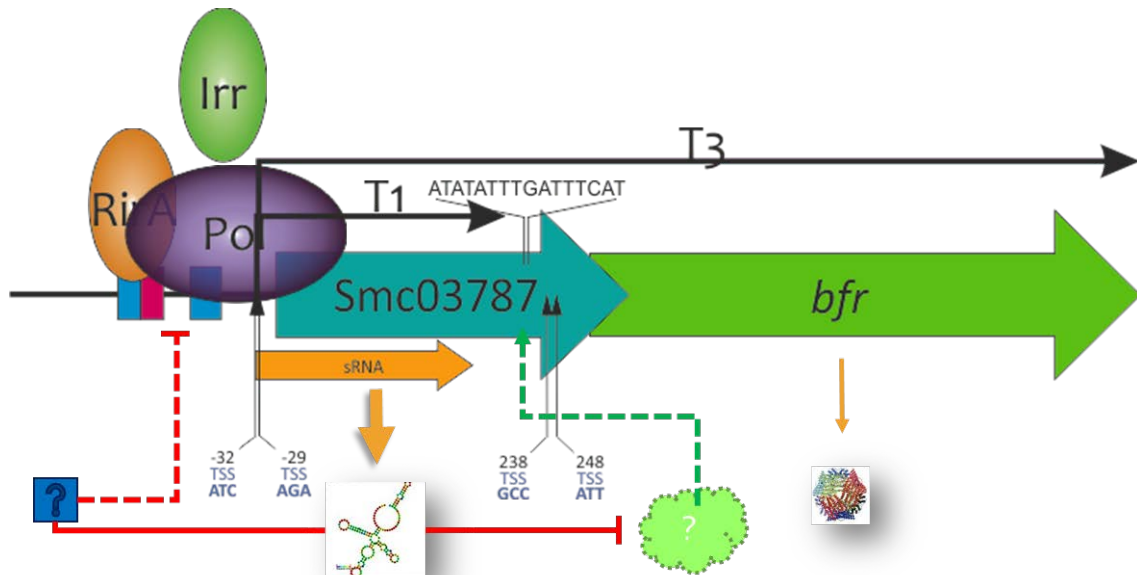


Fig. 50: Modelo hipotético de expresión de la bacterioferritina en ausencia de hierro

En esta figura se representa el modelo de expresión planteado para condiciones limitantes de hierro. La unión de Irr o la presencia de RirA permiten la transcripción a partir de los sitios de inicio SMc_TSS09932 o SMc_TSS09933 resultando en la producción, pero la transcripción puede proseguir, generándose el transcripto T3, permitiendo así la expresión de *bfr* aún en presencia de SmelC759. A su vez, otro efector negativo sobre SMc03787 sería reprimido por SmelC759, aunque esto es especulativo.

El análisis de los datos obtenidos mediante citometría de flujo, indica que la expresión en las células conteniendo la construcción pOT1-P3787 T fue diferente de las que contenían la construcción pOT1-P3787. Debido a que en el caso de la construcción POT1-P3787 T, SmelC759 está incluido en la región clonada, el número de copias de esta secuencia está sujeta al número de copias que presenta el plásmido. El plásmido pOT1 deriva del vector pBBR1-MSC-5, con un número de copias medio en bacterias Gram-negativas (106), por lo que el número de copias de SmelC759 será mayor que cuando se encuentra en el cromosoma. Es posible por lo tanto que la

sobreexpresión del ARN pequeño como parte del vector sea responsable de la diferencia encontrada en la construcción P3787 T. Un aumento en la concentración de este transcripto podría llevar a la regulación de blancos que no eran regulados cuando existía una única copia del ARN pequeño, de origen cromosomal. Otro escenario posible es que sus sitios blancos también se encuentren en la construcción plasmídica y por lo tanto sea necesario aumentar la concentración de ambos (sitios blanco y regulador) para alcanzar una situación más cercana a la normal. De hecho, se ha demostrado que RyhB de *E. coli*, (un ARN pequeño que participa en la regulación de la homeostasis del hierro en esa bacteria) ejerce su acción cuando su tasa de transcripción es mayor a cierto nivel basal de expresión del ARNm que tiene como blanco. De esta manera, si la expresión del ARNm blanco es mayor al umbral, no habrá efectos en la regulación mediada por el ARN pequeño (120).

Considerando entonces la posibilidad de que las diferencias encontradas en la actividad de la región promotora sean producto de la presencia del pequeño ARN, se podría concluir que SmelC759 está involucrado en la acción de Irr y de RirA en la región promotora en condiciones de limitación de Fe.

Sin embargo, para corroborar esta hipótesis habría que realizar nuevas investigaciones. Por ejemplo, para descartar si hay otros elementos involucrados, además del factor estructural, se podrían realizar fusiones génicas, clonando las secuencias a analizar corriente abajo de un promotor constitutivo inducible y evaluar si en esta situación también disminuye la expresión de un gen reportero.

Mientras que para determinar si el elemento responsable de la expresión diferenciada es realmente el SmelC759, se podrían realizar mutaciones puntuales en su secuencia, de manera de desestabilizar la estructura secundaria nativa, y comprobar si esa construcción provoca un cambio en la expresión de un gen reportero clonado corriente abajo.

Conclusiones

En este capítulo se estudiaron los mecanismos de regulación que afectan la expresión del gen de la bacterioferritina y de su presunta región promotora, en función de las condiciones de disponibilidad de hierro y de la presencia de las proteínas reguladoras Irr y RirA. Los diferentes abordajes planteados para el estudio de la expresión de este sistema resultaron concordantes en su mayoría, lo cual permitió extraer conclusiones acerca del esquema regulatorio reinante.

Se comprobó que el gen *bfr*, se expresa mayoritariamente en células crecidas en presencia de Fe mientras que en condiciones limitantes del metal su expresión disminuye pero no desaparece.

Se demostró por primera vez que la proteína Irr es funcional en *S. meliloti* asignándosele una función particular en la regulación de la expresión de la bacterioferritina.

Se comprobó que la expresión depende de la acción coordinada de los reguladores Irr, RirA y de la presencia de un pequeño ARN (SmelC759) codificado en forma solapada a Smc3787 proponiéndose un modelo hipotético de regulación tanto en presencia como en ausencia de Fe.

La falta de información referente a la presencia de actores diferentes a Irr y a RirA impide que el esquema regulatorio sea completo, por lo que será necesario continuar avanzando en el estudio de su regulación.

A su vez, se determinó que la expresión del gen que codifica la bacterioferritina responde de forma opuesta a la expresión de la región corriente arriba en presencia de hierro, por lo cual no se descarta que ésta haya perdido su rol en la codificación de la proteína Bfd, convirtiéndose en un elemento regulatorio.

Capítulo II

Funciones fisiológicas de la bacterioferritina de *S. meliloti* 1021

Resumen

Este capítulo está dedicado a determinar las funciones que cumple la bacterioferritina en la homeostasis del hierro en la bacteria *S. meliloti* 1021. Para esto, se partió de la mutante *S. meliloti* 1021 *bfr::lacZGmR*(Bfr-) descrita en el capítulo anterior, la cual fue empleada para realizar estudios fenotípicos en condiciones de disponibilidad o limitación de hierro y se contrastaron los resultados con los obtenidos para la cepa salvaje. Los ensayos de crecimiento en diferentes medios de cultivos en presencia y ausencia de hierro evidenciaron que la cepa carente en bacterioferritina es deficiente en el crecimiento, tanto en medios ricos como mínimos en condiciones limitantes de hierro, pero en presencia del metal, el crecimiento es similar al de la cepa salvaje. Se analizó el contenido intracelular de hierro mediante estudios espectroscópicos, encontrándose que en la cepa carente de bacterioferritina, el contenido es levemente menor que el de la cepa salvaje. Este hecho explicaría el defecto en el crecimiento en la mutante ya que en ausencia de hierro ésta no contaría con el hierro necesario para cumplir las demandas celulares. Sin embargo, esta disminución en el contenido intracelular de hierro no lleva al aumento en la síntesis de sideróforos, como se ha descrito para algunas bacterias (77).

Además de su función como fuente intracelular del hierro necesario para cumplir las demandas celulares, otra función que se atribuye a las proteínas de almacenamiento de hierro es la protección frente al estrés oxidativo. En ciertas condiciones se favorece la producción de ROS, que pueden afectar la integridad celular, y el hierro juega un rol importante en este proceso. La presencia de hierro libre en exceso en el interior de las células cataliza la producción de ROS, a través de las reacciones de Fenton y Haber Weiss y un mecanismo de defensa frente a este tipo de amenaza consiste en disminuir la concentración intracelular de hierro, a través de proteínas de almacenamiento. Se evaluó la capacidad de la bacterioferritina de *S. meliloti* de proteger a las células enfrentadas a altas concentraciones de hierro, sin encontrarse diferencias significativas entre la cepa salvaje y la mutante. Tampoco se encontraron diferencias en la sensibilidad frente a altas concentraciones de hemina, por lo que se concluyó que la bacterioferritina no es esencial para la resupuesta a la presencia de estos compuestos. Al evaluarse la sensibilidad de las células al aporte de H₂O₂ exógeno, se encontró que la cepa mutante- fue más resistente que la salvaje, indicando que la bacterioferritina tendría un efecto negativo en la supervivencia frente a este tipo de estrés.

Por último se evaluó la función de la bacterioferritina en la simbiosis de *S. meliloti* con la planta hospedera alfalfa. Los ensayos realizados demostraron que en ausencia de la bacterioferritina,

la nodulación fue más temprana, pero no hubieron cambios apreciables en la promoción del crecimiento vegetal

Hipótesis

Como única proteína de almacenamiento de hierro codificada por el genoma de *S. meliloti* 1021, la presencia de la bacterioferritina es importante para el mantenimiento de la homeostasis del hierro, tanto en vida libre como en simbiosis con la planta hospedera, aportando a los procesos involucrados en la resistencia a estrés oxidativo, necesarios para sobrevivir a la respuesta de la planta ante el proceso de infección, y proveyendo el hierro necesario para la fijación biológica del nitrógeno.

Objetivos Generales

Evaluar los roles fisiológicos que cumple la bacterioferritina en la bacteria *S. meliloti* 1021 en la homeostasis del hierro, tanto en vida libre como en simbiosis con su planta hospedera alfalfa.

Objetivos específicos

- Determinar si la bacterioferritina afecta el contenido de hierro intracelular.
- Determinar si la bacterioferritina puede actuar como fuente de hierro nutricional cuando la bacteria se enfrenta a condiciones de falta de este nutriente.
- Evaluar la importancia de la bacterioferritina en la protección frente al estrés oxidativo.
- Definir el rol de la bacterioferritina en el establecimiento de una simbiosis efectiva.

Metodología

Cepas y medios usados en este capítulo

Las cepas de rizobio usadas en este capítulo fueron la cepa salvaje de *S. meliloti* 1021 y la mutante isogénica *S. meliloti* Bfr- descrita en el Capítulo I. Los medios empleados fueron el medio rico TY (102) y los medios mínimos M3 (121) y M9 (108). Los antibióticos empleados se indican en cada caso y su concentración se muestra como subíndice luego del medio.

Análisis fenotípico

Cuantificación de hierro

Se cuantificó el hierro total de cultivos de *S. meliloti* 1021 y de la mutante Bfr- crecidos en M3 suplementado con EDDHA 100 μM o con FeCl_3 37 μM . Para esto, se partió de precultivos en M3 con FeCl_3 37 μM , crecidos 48 hs a 30°C con agitación. Se determinó la DO_{620} de los cultivos, y se centrifugaron 10 ml de cada cultivo durante 10 min a 340 $\times g$ en una microcentrífuga, descartándose el sobrenadante y resuspendiendo el pellet bacteriano en el volumen necesario de M3 para lograr una DO_{620} de 1. Se tomaron alícuotas correspondientes a un valor estimado de 10^{10} UFC para inocular 200 ml de M3 suplementado con EDDHA 100 μM o con FeCl_3 37 μM . Luego de 48 hs de incubación a 30°C con agitación, se midió la DO_{620} de los cultivos, se lavaron los pellets bacterianos con buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 7 estéril preparado con agua miliQ, centrifugando 10 min a 3500 $\times g$ y finalmente las células se resuspendieron en 20 ml del mismo buffer de lavado y se guardaron a -20°C hasta ser analizadas mediante espectroscopía de absorción de llama en el Laboratorio de Química Analítica de Facultad de Química. Paralelamente se realizaron determinaciones de concentración de proteínas totales en los cultivos enviados a analizar el contenido de hierro, mediante el método de BSA, utilizando el Bicinchoninic Acid Kit (Sigma) (122). Para ello, se tomaron alícuotas de 100 μl de cada muestra, a partir de las cuales se realizaron diluciones 1:10 y 1:100. Se sembró una placa de 96 pocillos con alícuotas de 25 μl de cada dilución, y se llevó a un volumen final de 200 μl por pocillo con la solución de detección de BCA, y finalmente se determinó la absorbancia a 562 nm en Varioskan (Thermo).

Crecimiento bacteriano

Para determinar si la mutación practicada en el gen de la bacterioferritina produce un crecimiento diferencial de los cultivos en medios con diferentes disponibilidades de hierro, se determinó la DO_{620} a lo largo del tiempo de cultivos realizados en los medios mínimos definidos M3 y M9 y en el medio rico TY, con el agregado de EDDHA 150 μM o de FeCl_3 37 μM . Para esto,

se partió de preinóculos crecidos 48 hs a 30°C en el medio correspondiente, con y sin agregado de hierro. Antes de inocular los cultivos, éstos se centrifugaron 5 min a 1500 xg, se descartó el sobrenadante, y las células se resuspendieron en un volumen de medio necesario para obtener una DO₆₂₀ igual a 1. Alícuotas de aproximadamente 5 x 10⁶ UFC se inocularon en 200 µl de medio en placas de 96 pocillos. Se tomaron medidas de DO₆₂₀ cada 3 a 5 horas (según se indica en cada caso) en un Varioskan Thermo Scientific, programado a una temperatura de incubación de 30°C e intervalos de 20 segundos de agitación cada 20 minutos.

Cuantificación de rizobactina 1021

La cuantificación de rizobactina se realizó según la técnica descrita por Carson y colaboradores (123). Se partió de cultivos recientes de las cepas *S. meliloti* 1021 y Bfr-crecidos en M3. Se realizaron precultivos en M3 con el agregado de FeCl₃ 37 µM y EDDHA 150 µM, y a continuación se realizó el pasaje de 100 µl de estos cultivos a M3 EDDHA 150 µM, a partir del cual se realizó la cuantificación de sideróforos. Para ello, se tomaron 1 ml de cada cultivo y se centrifugó 10 min a 2100 xg en una microcentrífuga a fin de retirar las células. Enseguida se toman 800 µl del sobrenadante, evitando tomar células y se agregan 400 µl de Fe(CIO₄)₃ 5 mM, y se determinó la absorbancia a 450 nm. Paralelamente, se cuantificó la DO₆₂₀ de cada cultivo. La concentración de sideróforos se expresó como la relación entre la A₄₅₀ y la DO₆₂₀.

Sensibilidad al hierro

Para evaluar si el crecimiento de la cepa carente en bacterioferritina es afectado por la presencia de hierro en el medio de cultivo, se determinó el tamaño de las colonias de *S. meliloti* 1021 y de la mutante Bfr- en medio M3 sólido suplementado con diferentes concentraciones de hierro. Para esto, se realizaron precultivos de *S. meliloti* 1021 y Bfr- en M3 con FeCl₃ 37 µM de los cuales se tomó 1 ml y se centrifugó 5 min a 850xg en una microcentrífuga. Las células se resuspendieron en el volumen de medio de cultivo necesario para obtener una DO₆₂₀ de 1 y se realizaron diluciones seriadas al décimo en 200 µl de M3. Se tomaron alícuotas de las diluciones realizadas y se sembraron en medio TYStr₁₀₀ sólido suplementado con FeCl₃ 1, 5, 10 y 15 mM. Se incubaron las placas a 30°C hasta la aparición de colonias, y se comparó el tamaño de las colonias en las diluciones en las que se obtuvieron colonias aisladas.

Sensibilidad a hemina

Este ensayo se realizó de forma similar al procedimiento empleado para la determinación de la sensibilidad a hierro. En este caso se determinó el tamaño de las colonias individuales de *S. meliloti* 1021 y de la mutante Bfr- en M3 adicionado con hemina 25 o 50 mM .

Sensibilidad al estrés oxidativo

Para determinar si la bacterioferritina de *S. meliloti* protege a las células frente al estrés oxidativo, se realizaron ensayos de inhibición con peróxido de hidrógeno y paraquat. Se realizaron precultivos por triplicado de las cepas de *S. meliloti* 1021 y de la mutante Bfr- en M3Str₁₀₀ suplementado con FeCl₃ 37 µM. Luego de 48 horas de incubación a 30°C, se realizaron diluciones de los cultivos, de manera de obtener una concentración de 1x10⁹ UFC. por ml. Se inoculó el medio de cultivo sólido M3 Str100 suplementado con EDDHA 100 µM o FeCl₃ 37 µM con 100 µl de las suspensiones que contenían 1x10⁶ UFC., y se repartió el medio con el cultivo incorporado en placas de 5 ml. Una vez que se solidificó el medio de cultivo, se colocaron discos de papel de filtro en el centro de las placas y sobre ellos se depositaron 10 µl de H₂O₂ 0,892 M, o de Paraquat 70 mM. Luego de 72 hs de incubación a 30°C, se determinaron los diámetros de los halos de inhibición.

Cinética de nodulación y promoción del crecimiento vegetal

Para evaluar el efecto de la mutación en la capacidad de *S. meliloti* 1021 de promover el crecimiento vegetal, se realizaron ensayos con plantas crecidas en condiciones gnotobióticas. Para ello se esterilizó la superficie de semillas de *Medicago sativa* (alfalfa), sumergiendo las semillas 5 min en HgCl₂ 0,2M, HCl 0,5 % (v/v) y se realizaron 7 lavados sucesivos con agua estéril (28). Se dejaron las semillas en el agua del último lavado, incubándolas 1 h a 30°C con agitación, y luego se colocaron en agar 16% (m/v) en agua para la germinación. Las plántulas se sembraron en tubos de vidrio que contenían 15 ml de medio Jensen semisólido sin nitrógeno agregado (ver composición en el anexo). Siete días después, se inocularon las plantas con suspensiones de aproximadamente 1x10⁶ u.f.v. de la cepa salvaje o de la cepa mutante (tratamientos 1021 y Bfr-, respectivamente). Como control de fertilización nitrogenada se agregó 1 ml de KNO₃ 0,05% (m/v) (tratamiento N) y o 1 ml de agua destilada estéril como control negativo. Se utilizaron 10 tubos por tratamiento, con 2 plantas cada uno. Las plantas se crecieron a 20±2°C, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Alrededor de los 3 meses post inoculación (p.i.), se extrajo la parte aérea de las plantas y se las secó en estufa a 60°C por 72 horas, para asegurar que la masa de las mismas se mantuviera invariante. Se determinaron los pesos secos de las plantas, a los cuales se aplicó el test de Tukey de comparación de medias con un p-valor de 0,05, para determinar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos practicados.

En los ensayos de cinética de nodulación se registró diariamente la aparición del primer nódulo en cada planta desde el día 5 hasta el día 16 o 20 p.i.

Resultados

Cuantificación de hierro

Para determinar si la bacterioferritina de *S. meliloti* almacena hierro, se cuantificó el contenido total de hierro en los cultivos de *S. meliloti* 1021 y de la mutante Bfr- crecidas en presencia de quelante EDDHA 100 μ M o de FeCl₃ 37 μ M respectivamente, mediante espectroscopía de llama. En la Tabla 10, se muestran los resultados obtenidos para cada muestra, medida por triplicado y su correspondiente error estándar.

Tabla 10: Contenido de hierro intracelular

Cepa	mg de Fe por muestra (Media)	EE ^a	Concentración de proteínas (μ g/ml)	mg de proteína por muestra	μ g Fe/mg proteínas totales
1021 + Fe	0,1373	0,0019	1669	28,5	4,82 $\pm$ 0,06
Bfr- + Fe	0,1150	0,0015	1826	28,1	4,09 $\pm$ 0,05
1021 + E	0,0060	n/sb	1300	19,8	0,33
Bfr + E	0,0080	n/s	1455	22,3	0,36

^aEE: error estándar, ^b N/s indica no suministrado

Como se muestra en la tabla, se encontró en las células de *S. meliloti* 1021 Bfr- un contenido de hierro levemente menor a la encontrada en la cepa salvaje, lo cual indica que la bacterioferritina participa en el almacenamiento de hierro.

El crecimiento bacteriano se ve afectado por la ausencia de la bacterioferritina en condiciones de baja disponibilidad de hierro.

Con la finalidad de comprobar si las reservas de hierro están disponibles para satisfacer las demandas celulares y permitir así la replicación, se evaluó el crecimiento celular en medio líquido comparando el crecimiento de la cepas salvaje y de la mutante bajo diferentes condiciones de disponibilidad de hierro. El ensayo se realizó partiendo de preinóculos crecidos en condiciones de disponibilidad de hierro para cargar la bacterioferritina con el metal.

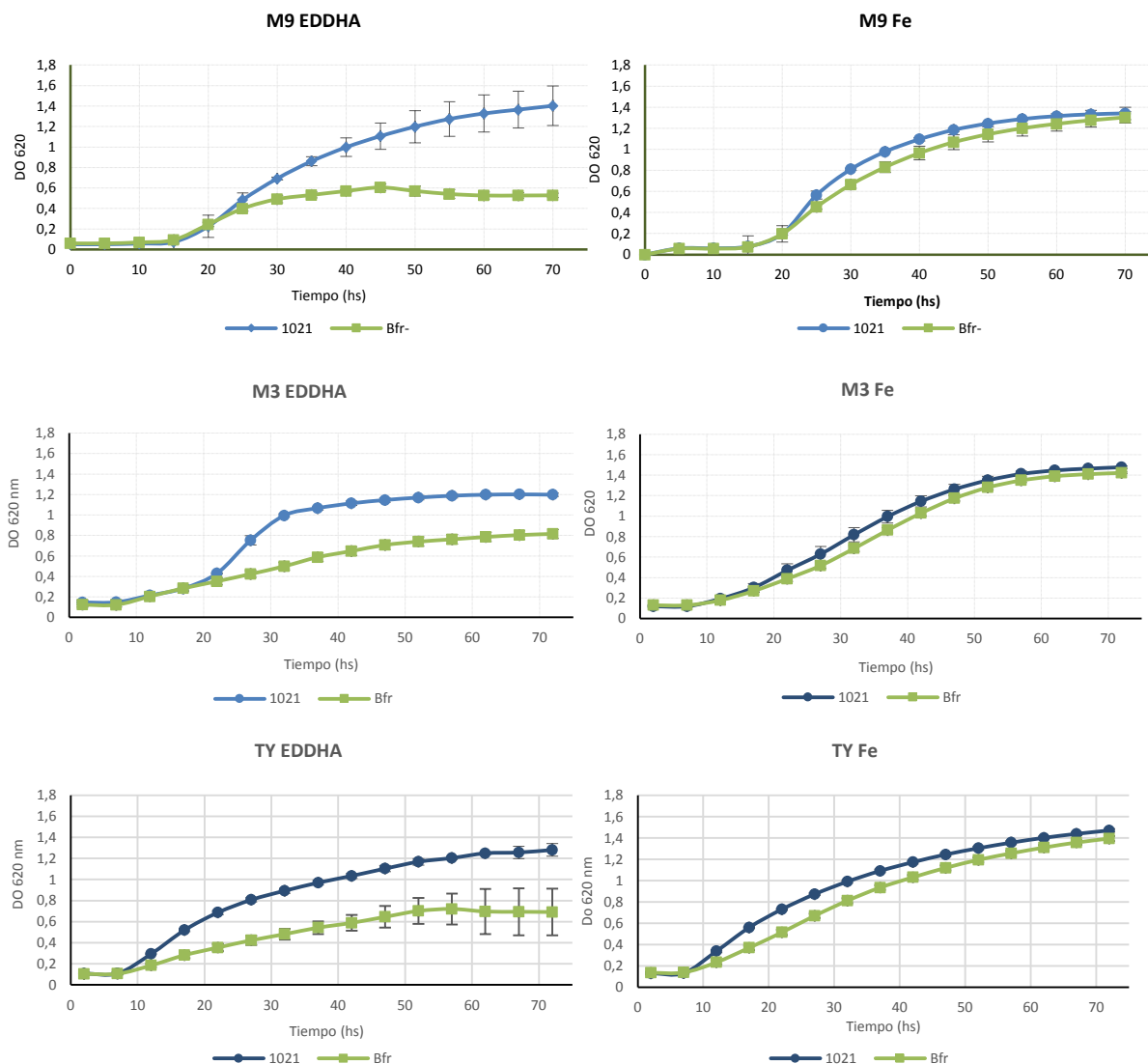


Fig. 51: Crecimiento bacteriano en diferentes medios de cultivo bajo condiciones de deficientes o suficientes de hierro
 Estos gráficos corresponden a las curvas de crecimiento de cultivos de *S. meliloti* 1021 salvaje (azul) vs. la mutante Bfr- (verde) en los medios de cultivo M9 (arriba), M3 (centro), y TY (abajo), bajo diferentes condiciones de disponibilidad de hierro: agregado del EDDHA (izquierda) o hierro (derecha). Las barras de error corresponden a error estándar.

Como se muestra en la Fig. 51, el crecimiento de la cepa Bfr- estaba comprometido en los medios con quelante (Fig. 51), gráficos de la izquierda), mientras que en los medios con FeCl_3 agregado, el crecimiento de la cepa mutante y el de la salvaje fueron similares. El mismo comportamiento se obtuvo en los tres medios ensayados. En conjunto, este resultado indica que el hierro almacenado en la bacterioferritina sería utilizado por las células para satisfacer las demandas metabólicas, en condiciones de deficiencia del metal.

La mutante carente en bacterioferritina no responde a la limitación de hierro con el aumento en la síntesis de rizobactina 1021

La técnica descrita por Carson y colaboradores (123) permite cuantificar la cantidad de sideróforos del tipo hidroxamato liberados al medio en respuesta a la baja disponibilidad de

hierro presente. *S. meliloti* 1021 produce el sideróforo rizobactina 1021 el cual es un sideróforo tipo dihidroxamato (124).

La técnica de cuantificación de sideróforos utilizada en este trabajo, se basa en la formación de complejos estables coloreados con sales de hierro a pH bajos, que son cuantificados mediante espectrofotometría.

En la Tabla 11 se muestran los resultados correspondientes a la cuantificación del sideróforo rizobactina 1021

Tabla 11: Concentración de rizobactina 1021 en los cultivos bacterianos					
Cepa	A450	DO620	A450/DO620	Promedios	EE ^a
1021	0,165	1,222	0,135	0,137	0,003
	0,045	0,316	0,142		
	0,096	0,718	0,133		
Bfr	0,022	0,163	0,134	0,143	0,014
	0,029	0,17	0,170		
	0,022	0,177	0,124		

^aEE: error estándar

Al aplicar un test estadístico de Tukey, con un nivel de significancia de 0,05, se desprende que no existen diferencias significativas en la producción de sideróforos entre ambas cepas.

La bacterioferritina no es esencial para la respuesta de tolerancia al hierro

Como se expuso anteriormente, el exceso de hierro en el interior celular puede ser altamente deletéreo debido a la catálisis mediada por hierro de la formación de especies reactivas del oxígeno, vía las reacciones de Fenton y de Haber – Weiss. Las proteínas de almacenamiento del hierro cumplen la función de secuestrar el hierro intracelular que se encuentra en exceso, confiriendo así, en algunos casos, protección frente al estrés oxidativo causado por hierro.

La comparación del tamaño de las colonias individuales es una buena aproximación para determinar si el crecimiento bacteriano se encuentra influenciado negativa o positivamente por los componentes del medio de cultivo ensayado. Para determinar el efecto causado por la presencia de grandes concentraciones de hierro en el medio de cultivo, se inoculan diluciones seriadas de los cultivos a comparar, y se observa el tamaño de las colonias individuales para cada uno. Al realizar este ensayo en el medio de cultivo M3 conteniendo 5, 10 y 15 mM de FeCl₃, no se observó crecimiento de ninguna de las dos cepas, por lo que se repitió este ensayo, utilizando medios con menores concentraciones de hierro. Así, las concentraciones ensayadas fueron 1, 2 y 4 mM finales. Se obtuvieron colonias de ambas cepas en las tres concentraciones ensayadas,

sin encontrar diferencias apreciables en el tamaño de las colonias individuales entre *S. meliloti* 1021 y Bfr-, con lo que se desprende que la bacterioferritina no estaría brindando a las células una protección específica contra el estrés oxidativo causado por grandes concentraciones de hierro en el medio de cultivo.

Sensibilidad a Hemina

La presencia de hemooxigenasas les permite a las células extraer el hierro unido a hemina, para su utilización como fuente nutricional de hierro. Altas concentraciones de hemina pueden resultar tóxicas para las bacterias, ya sea debido a la toxicidad causada por la hemina en sí misma, o debido a que la liberación del hierro unido a hemina a través de las hemooxigenasas puede catalizar la formación de especies reactivas del oxígeno (125). Se decidió realizar ensayos de sensibilidad a altas concentraciones de hemina, para estudiar si la presencia de la bacterioferritina de *S. meliloti* da una ventaja selectiva frente a la toxicidad mediada por hemina. Para esto se procedió de manera similar al ensayo de sensibilidad a hierro, inoculando diluciones seriadas de cultivos de la cepa salvaje *S. meliloti* 1021 y de la mutante Bfr- en medios

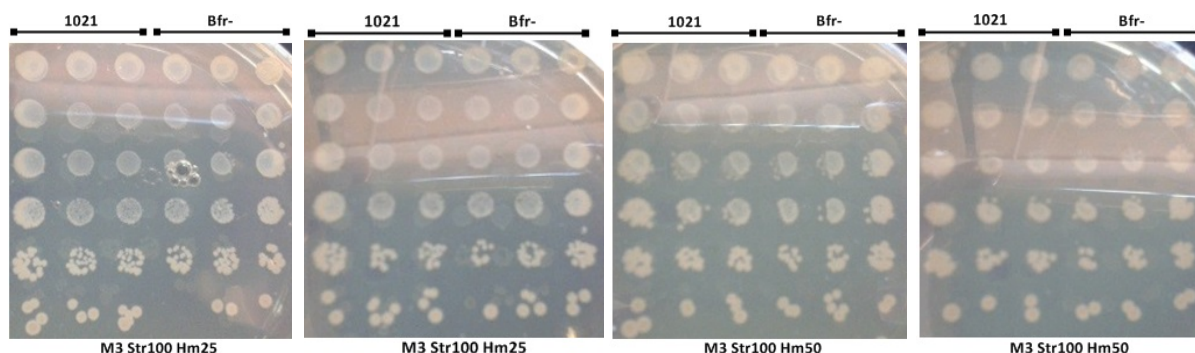


Fig. 52: Ensayos de sensibilidad a hemina

Se sembraron diluciones seriadas de cultivos de *S. meliloti* 1021 y Bfr- en placas de M3 adicionadas con 25 y 50 mM de hemina. Se observó el diámetro de las colonias aisladas obtenidas para cada cepa, sin encontrarse diferencias entre ellas.

conteniendo hemina en concentraciones de 25 y 50 mM, comparando el tamaño de las colonias individuales de ambas cepas.

En la Fig. 52 se muestran las placas correspondientes a M3 suplementado con hemina 25 y 50 mM respectivamente, en los que se inocularon las diluciones seriadas de los cultivos de *S. meliloti* 1021 y la mutante Bfr-. Como se observa, tanto en las placas conteniendo hemina 25 como las que contienen hemina 50 mM, no se observan diferencias en el tamaño de las colonias individuales de 1021 salvaje y Bfr-, indicando que ambas cepas responden a la presencia de hemina de forma similar, y que la presencia de la bacterioferritina no protege a las células frente a la toxicidad causada por la hemina.

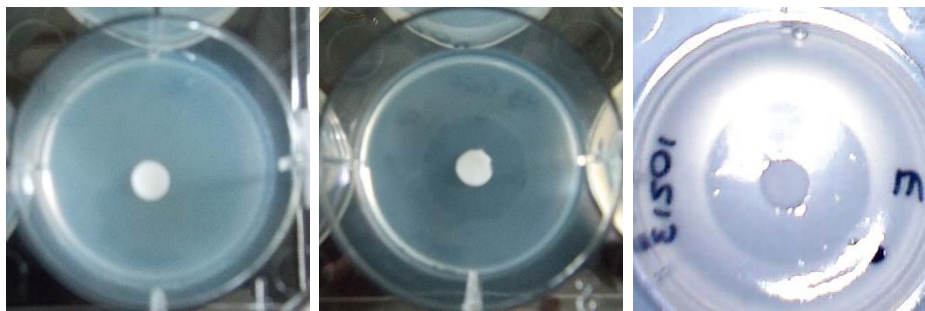


Fig. 53: Ensayos de inhibición del crecimiento con H₂O₂

En la imagen de la izquierda, que corresponde a Bfr- en medio suplementado con hierro, se observa crecimiento en toda la placa, sin encontrarse inhibición alrededor del disco de papel, que fue sembrado con 10 µl de paraquat 70 mM. La imagen del centro corresponde a la cepa Bfr- en medio con quelante. Alrededor del disco que contiene 10 µl de H₂O₂ 0,892 M se observa la presencia de un halo de inhibición del crecimiento. La imagen de la derecha, correspondiente a la cepa salvaje en M3 con quelante.

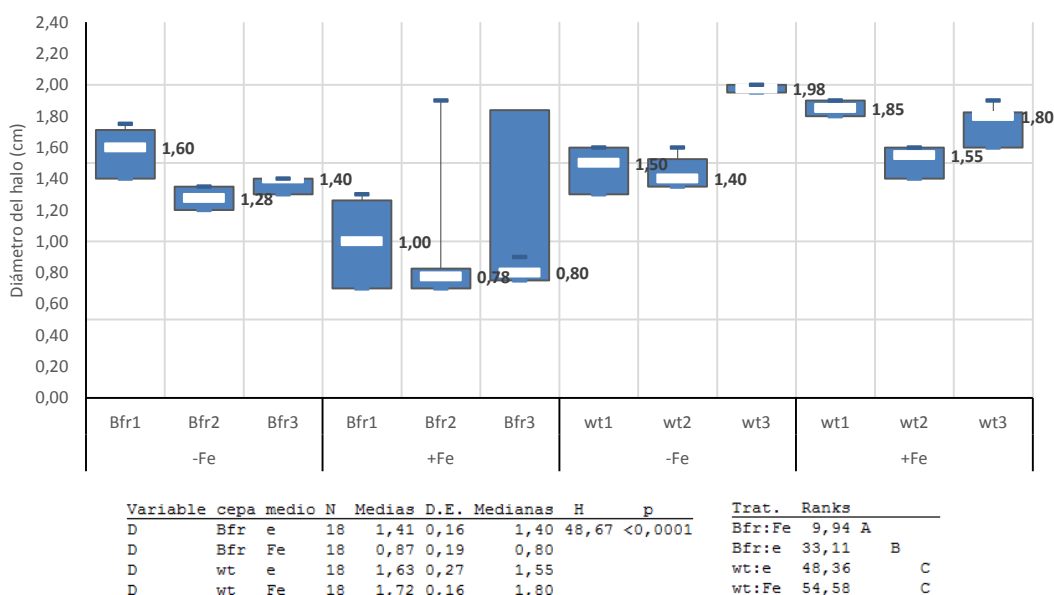


Fig. 54: Ensayo de estrés oxidativo por H₂O₂

En la figura se muestra el gráfico de cajas de los diámetros de las zonas de inhibición alrededor de discos que contenían 10 µl H₂O₂ 0,892 M. Los valores mostrados representan las medianas.

Al aplicar un análisis de varianza no paramétrico, se encontraron diferencias significativas entre las cepas de *S. meliloti* 1021 y la mutante Bfr en las diferentes condiciones de disponibilidad de hierro (abajo a la izquierda).

Abajo a la derecha se muestra el resultado de las comparaciones realizadas con un p-valor de 0,05, que indicaron diferencias significativas entre ambas condiciones en la cepa mutante, con zonas de inhibición mayores en la condición -Fe, mientras que en la cepa salvaje no hubieron diferencias entre ambas condiciones. También se determinó que los halos de inhibición para la cepa salvaje fueron significativamente menores que los correspondientes a la cepa mutante.

Ensayos de estrés oxidativo

Con el objetivo de analizar si la bacterioferritina de *S. meliloti* cumple un rol en la protección frente al estrés oxidativo, se realizaron ensayos de inhibición del crecimiento en M3 sólido suplementado con EDDHA 100 µM o FeCl₃ 37 µM, conteniendo 1x10⁶ células de *S. meliloti* 1021 o de Bfr-. En la Fig. 53 se muestran algunas placas de este ensayo, donde se observan claramente los halos de inhibición de crecimiento alrededor de los discos que contenían 10 µl de H₂O₂ 0,892

M, pero no alrededor de los discos que fueron sembrados con 10 µl de paraquat 70 mM. En la Fig. 54 se grafican los diámetros de los halos de inhibición en cultivos de *S. meliloti* 1021 salvaje y en la cepa mutante Bfr-.

De acuerdo a estos resultados, la ausencia de la bacterioferritina en células de *S. meliloti* confiere una mayor resistencia frente al estrés oxidativo provocado por H₂O₂ exógeno. Esta diferencia no se observó con el agregado de paraquat (datos no mostrados)

Cinética de nodulación

Para determinar si la presencia de la bacterioferritina afecta las etapas iniciales de la simbiosis *S. meliloti*-alfalfa, se determinó la tasa de nodulación para la cepa salvaje y para la mutante Bfr-, considerándose un tubo como positivo cuando al menos una planta de las dos presentes en el tubo, posee al menos un nódulo. En la Fig. 55 se muestran los resultados de cinética de nodulación obtenidos en dos ensayos independientes, con plantas de alfalfa inoculadas con *S. meliloti* 1021 o con la mutante Bfr-, expresados en porcentaje de tubos positivos con respecto a los días post-inoculación (dpi). En el primer ensayo, en el que se contaba con 12 réplicas por tratamiento, se constató la presencia de nódulos hacia el 9^{no} dpi para la cepa Bfr- y el 10^{mo} dpi para la cepa salvaje. Este ensayo fue continuado hasta 16 dpi, en el que se encontró un número similar de tubos positivos para las plántulas tratadas con células de *S. meliloti* 1021 y de la mutante Bfr-. El ensayo se realizó nuevamente, con 10 réplicas por tratamiento, continuando hasta 20 dpi. En este ensayo, nuevamente se observó más tempranamente la nodulación de plántulas inoculadas con Bfr- (al 4^{to} dpi), mientras que en las plántulas inoculadas con la cepa salvaje, los nódulos comienzan a observarse el 7^{mo} dpi. Al final del experimento se observó, al

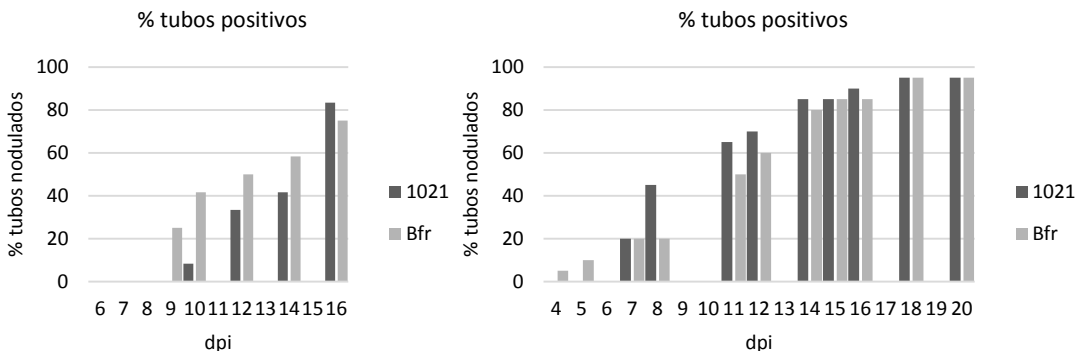


Fig. 55: Cinética de nodulación en plantas de alfalfa
En esta figura se muestran los gráficos de cinética de nodulación obtenidos en dos experimentos independientes, en los que se inocularon plantas de alfalfa con suspensiones conteniendo aproximadamente 1×10^6 células de *S. meliloti* 1021 o de la mutante Bfr-. Como se muestra mediante barras claras, la nodulación en las plantas inoculadas con la cepa Bfr- comenzó antes que para las plantas inoculadas con la cepa salvaje (barras oscuras), pero enseguida se comienzan a observar nódulos en las plantas inoculadas con la cepa salvaje, y hacia el final de los ensayos, las tasas de tubos positivos para ambas cepas se iguala.

igual que en el ensayo anterior, que el número de tubos positivos para cada tratamiento fue similar.

Promoción del crecimiento vegetal

Una de las hipótesis de este trabajo consistió en que la bacterioferritina de *S. meliloti* es utilizada por la bacteria como fuente de hierro para satisfacer la alta demanda que implica la enzima clave del proceso de la fijación biológica del nitrógeno. Para comprobar si esto es cierto, se realizaron ensayos de promoción del crecimiento vegetal en condiciones gnotobióticas, en las que se inocularon plantas de alfalfa con suspensiones de células de *S. meliloti* 1021 y Bfr- respectivamente, a ser contrastados entre ellos y con los controles negativo y positivo.

Como se muestra en los gráficos representados en la Fig. 56, no se encontraron diferencias significativas en los pesos secos de las plantas tratadas con células de *S. meliloti* 1021 o con Bfr-. En el caso del gráfico del centro, en el que se encontraron diferencias entre los tratamientos 1021 y Bfr- con respecto al control positivo se debió a que este ensayo transcurrió un menor período de tiempo que los restantes dos.

Estos resultados indican que la presencia de la bacterioferritina no es esencial para el establecimiento de una simbiosis efectiva con plantas de alfalfa, y que por lo tanto, el hierro almacenado en la bacterioferritina no sería utilizado como fuente de hierro para el proceso de fijación biológica del nitrógeno.

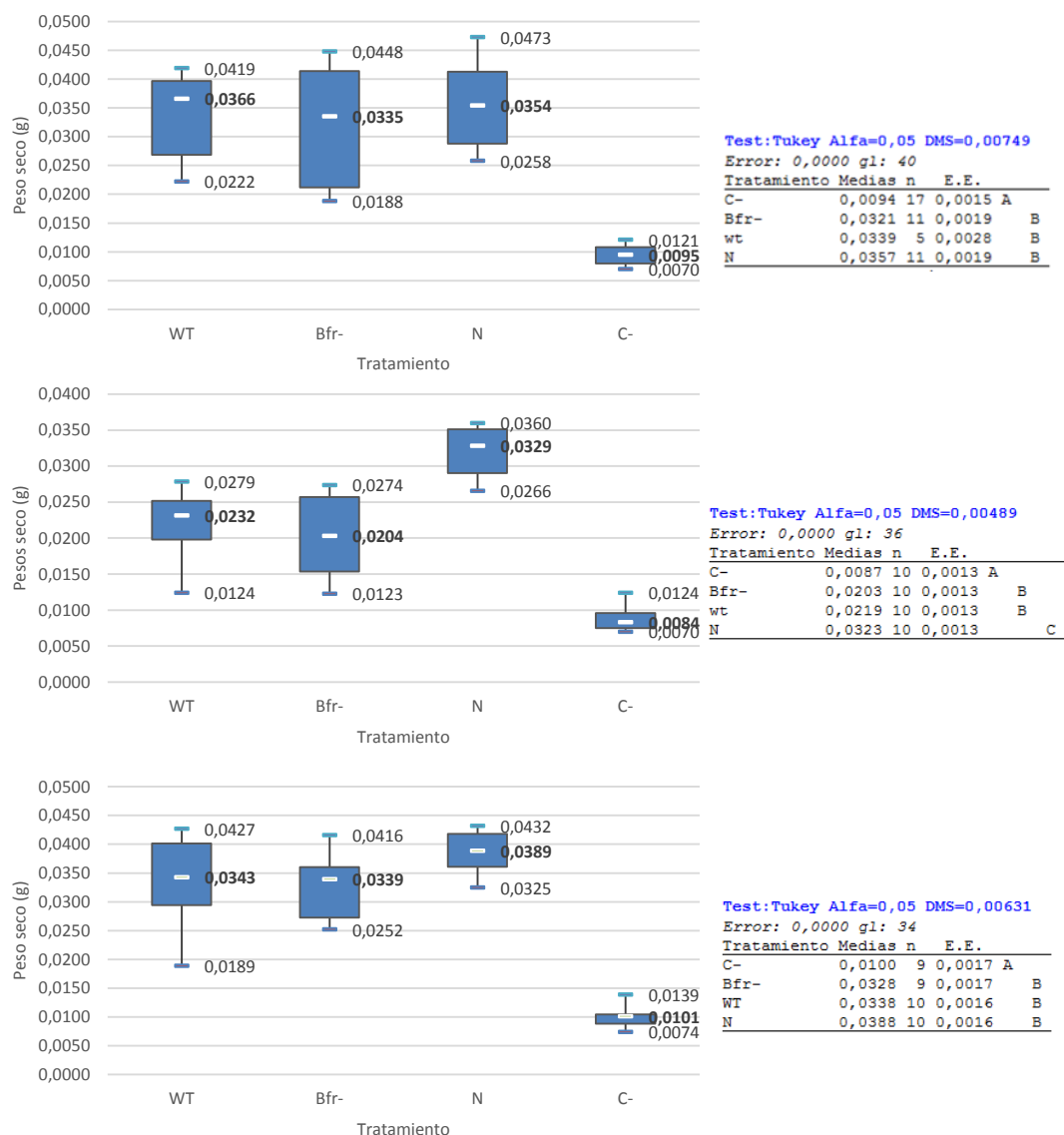


Fig. 56: Ensayos de promoción del crecimiento vegetal

Resultados de tres ensayos independientes de promoción del crecimiento vegetal en plantas de alfalfa, en los que se grafica el peso seco por tubo conteniendo dos plantas, sometidas a los tratamientos 1021 (WT), Bfr-, N y C-. Los valores representados corresponden a máximo, mediana y mínimo respectivamente. A la derecha de cada gráfico se muestra la tabla correspondiente al Test de Tukey realizado para cada ensayo, con un nivel de significancia de 0,05. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Discusión

Una de las funciones que se les atribuye en general a las proteínas tipo ferritinas, es el almacenamiento del hierro internalizado por las células cuando se encuentran en un medio con disponibilidad del metal. (22). En algunos casos, el hierro almacenado en la bacterioferritina puede utilizarse como fuente nutricional en condiciones de insuficiencia en el medio, o simplemente el ión ferroso libre en exceso en el citoplasma es almacenado en forma de ión férrico para evitar posibles daños producidos por estrés oxidativo. Para determinar si la bacterioferritina de *S. meliloti* almacena hierro cuando crece en presencia del mismo, se realizó la cuantificación del hierro intracelular mediante espectroscopía de llama en cultivos de la cepa salvaje de *S. meliloti* o de la mutante carente en bacterioferritina, en presencia y ausencia de hierro. Este ensayo arrojó como resultado una mayor cantidad de hierro en la cepa *S. meliloti* salvaje que en la mutante Bfr- cuando la bacteria crece en presencia de hierro lo cual estaría indicando que la bacterioferritina de esta bacteria tiene como función el almacenamiento de hierro.

La espectroscopía de masas es una técnica muy sensible, que permite la detección de hierro del orden del $\mu\text{g/ml}$. La cuantificación de hierro realizada en este trabajo se realizó en una sola réplica biológica, por lo que no se puede confirmar ciertamente que las diferencias encontradas fueran significativas y con sentido biológico. Además, debido a la sensibilidad de la técnica utilizada, la presencia de contaminación por hierro en el material utilizado representa una importante fuente de error. Por lo tanto para confirmar que la bacterioferritina efectivamente es responsable del almacenamiento de hierro en *S. meliloti* se deberán realizar nuevas determinaciones, con por lo menos tres réplicas biológicas de cada cepa a estudiar, y tener en cuenta el error asociado a la contaminación, minimizando su aporte en las medidas.

A pesar de que las bacterioferritinas son, por definición, proteínas de almacenamiento de hierro, se han reportado casos en los que el contenido intracelular de hierro de la cepa salvaje y de la mutante Bfr- son similares. Tal es el caso de la bacterioferritina de *E. coli* (22), donde se demostró que esta proteína no contribuye al pool intracelular de hierro, pero la ferritina bacteriana (Ftn) sí estaría cumpliendo esta función (64). En el caso de *S. meliloti*, al no encontrarse otras proteínas de almacenamiento codificadas en el genoma, es de esperar que la bacterioferritina cumpla la función de almacenar hierro. Un caso similar es el del género *Brucella*, donde la única proteína de almacenamiento es la bacterioferritina, y es el principal pool de hierro celular disponible (77).

Las curvas de crecimiento realizadas en presencia y ausencia de hierro en los diferentes medios de cultivo de las cepas de *S. meliloti* salvaje y Bfr- demostraron que la mutante se encuentra comprometida en su crecimiento en ausencia de hierro, por lo que se puede inferir que la bacterioferritina de *S. meliloti* almacenaría hierro y que el hierro depositado en su cavidad es utilizado para cumplir las funciones metabólicas cuando las células son cultivadas en ausencia del mismo. Esta hipótesis es respaldada por el hecho de que la expresión de *bfr* aumenta significativamente en presencia de hierro, según se demostró en el capítulo anterior.

La capacidad de proveer el hierro necesario para cumplir funciones metabólicas ha sido reportada en diversas bacterioferritinas. Por ejemplo, se demostró que en *B. abortus* 2308, la mutante carente en bacterioferritina tiene un crecimiento deficiente en un medio MG sin hierro agregado en comparación con la cepa salvaje (77). Un caso similar fue reportado en *Neisseria gonorrhoeae*, donde se demostró que el crecimiento de la cepa carente de Bfr fue considerablemente menor en un medio suplementado con el quelante de hierro desferal, en comparación con la cepa salvaje bajo las mismas condiciones (126).

Considerando la posibilidad que al estar ausente la bacterioferritina, y por lo tanto tener menores cantidades de hierro intracelular, la cepa Bfr- podría responder mediante la producción de mayores cantidades de sideróforos en un medio de cultivo limitado en hierro, se decidió evaluar la producción de rizobactina 1021. Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron que no existen diferencias detectables en su producción con respecto a la cepa salvaje. Por consiguiente, los sistemas que regulan la adquisición de hierro mediada por sideróforos endógenos no se verían afectados por la presencia de la bacterioferritina en *S. meliloti*.

Un comportamiento similar se había observado en el fitopatógeno *Erwinia chrysanthemi* 3937, en el que se cuantificaron los niveles de los sideróforos crisobactina y acromobactina, sin encontrar diferencias en la producción de ninguno de ellos en la cepa deficiente en bacterioferritina con respecto a la cepa salvaje (127). En el caso de la bacterioferritina de *B. abortus* 2308, por el contrario se había reportado una mayor producción de sideróforos en la cepa carente de Bfr (77). Se desconocen las razones del porqué la respuesta parecería ser específica para cada bacteria.

Se había indicado en la introducción que entre los roles cumplidos por las bacterioferritinas es de gran importancia la protección frente al estrés oxidativo. Para evaluar si la bacterioferritina de *S. meliloti* cumple este rol de protección, se analizó la respuesta frente a diferentes fuentes de estrés oxidativo. Si la bacterioferritina protege frente al estrés oxidativo mediante el secuestro del hierro en exceso del citosol para evitar la catálisis en la producción de especies

reactivas del oxígeno, se podría esperar una mayor sensibilidad en la cepa carente de bacterioferritina al ser enfrentada a altas concentraciones de hierro. Los resultados obtenidos indican que la bacterioferritina de *S. meliloti* no participa en la protección contra el estrés oxidativo causado por el exceso de hierro, o bien los mecanismos de adquisición son suficientemente robustos para impedir que las concentraciones intracelulares del metal alcancen niveles letales. Para comprobar este punto, se hace necesaria la realización de experimentos similares a los realizados en este trabajo, utilizando una mutante con los mecanismos de adquisición de hierro desreprimidos y además carente en bacterioferritina y evaluar la capacidad de crecimiento con respecto a la mutante incapaz de reprimir los sistemas de transporte de alta afinidad por hierro. Otra estrategia presente en las células para eliminar el exceso de hierro consiste en exportarlo, a través de una proteína tipo ferritina anclada a la membrana. Tal es el caso de la proteína Mbf (Membrane Bound Ferritin) de *B. japonicum*, una proteína de membrana interna que es expresada en condiciones de alta concentración de hierro, siendo su expresión reprimida por Irr en ausencia de hierro. Se demostró que en *B. japonicum*, mutantes deficientes en *mbf* tienen un fenotipo aberrante dependiente de hierro, además de ser más sensibles al estrés oxidativo causado por H₂O₂ y tener un contenido intracelular de hierro dos veces mayor al encontrado en la cepa parental (128). En el genoma de *S. meliloti* 1021 se encuentra el ORF SMc00359, que codifica una proteína hipotética transmembrana de 327 aminoácidos que presenta un 60,31 % de identidad con la proteína codificada por el gen Blr7895 de *B. japonicum*.

Al evaluar la tolerancia a la presencia de grandes concentraciones de hemina, no se encontraron diferencias significativas entre las cepas de *S. meliloti* salvaje y Bfr- bajo las condiciones ensayadas, lo cual estaría indicando que el hierro liberado de la hemina por la acción de hemooxigenasas no supone un riesgo de estrés en la cepa carente en bacterioferritina. Debido a que ya se había establecido que la presencia de la bacterioferritina no supone una ventaja al exponer a *S. meliloti* a grandes concentraciones de hierro, la liberación de éste a partir de hemina no supondría una mayor sensibilidad en la mutante carente en bacterioferritina. Por otro lado, la unión de hemo a la bacterioferritina no es significativa como mecanismo de defensa al estrés causado por hemo, ya que en ausencia de esta proteína no se detectó una sensibilidad exacerbada.

El H₂O₂ es causante de estrés oxidativo, debido a que según la química de Fenton, el H₂O₂ es reducido a radicales hidroxilo, los cuales son altamente deletéreos para las células. Lehman y Long (2013) demostraron que en *S. meliloti* la toxicidad mediada por H₂O₂ es dependiente de hierro, debido a que al realizar ensayos de exposición a H₂O₂ en presencia del quelante 2,2'-

dipirilo a una concentración de 1 mM, se encontró que disminuye la sensibilidad al agente oxidante (129), encontrando que las tasas de supervivencia en presencia del quelante llegan casi al 100 %. Los ensayos de resistencia al H₂O₂ realizados en este trabajo indicaron que la cepa salvaje responde de forma similar en presencia y en ausencia de hierro, sin embargo, la cepa carente de bacterioferritina, demostró ser más resistente en presencia de hierro que en ausencia del mismo, al contrario de lo reportado por Lehman y Long (129). Para tener certezas sobre el fenotipo demostrado en este experimento, es necesaria la repetición del mismo, para obtener un número significativo de réplicas en experimentos independientes. Además, deben realizarse otros abordajes para la determinación de la sensibilidad al estrés oxidativo causado por H₂O₂. En este trabajo sólo se evaluó la exposición a una concentración de H₂O₂ en ensayos de inhibición en agar, pero se ha reportado que el comportamiento en respuesta al estrés oxidativo puede variar con respecto a la concentración del agente oxidante de una forma no lineal para las cepas salvajes y carentes en bacterioferritina. Por ejemplo, en *N. gonorrhoeae*, los diámetros de inhibición alrededor de discos sembrados con 5 µmol de H₂O₂ fueron similares para la mutante carente en bacterioferritina que para la cepa salvaje, pero al sembrar 2,5 µmol de H₂O₂ la cepa mutante resultó más sensible (126). Para eliminar el efecto de la saturación con H₂O₂, por ejemplo, podría evaluarse el crecimiento en presencia de diferentes concentraciones del agente oxidante y determinar la concentración mínima inhibitoria. El comportamiento encontrado en este trabajo contradice lo reportado en otras bacterias, donde la ausencia de la bacterioferritina afecta negativamente la sensibilidad al estrés oxidativo (77, 78, 126). Sin embargo y en forma análoga a lo encontrado por nosotros, en *H. pylori*, se reportó que la resistencia al estrés oxidativo provocado por paraquat es mayor en la cepa carente en bacterioferritina que en la cepa salvaje, requiriéndose una mayor dosis del agente oxidante en la cepa mutante que en la salvaje para inhibir el crecimiento (63). Una posible explicación de este fenotipo puede ser debido a mayor actividad exportadora de hierro en estas bacterias.

Los ensayos en planta realizados permiten estudiar dos efectos de importancia en el establecimiento de una simbiosis efectiva, como lo son el proceso de infección y la fijación biológica del nitrógeno. Durante el proceso de infección, la planta responde a la invasión bacteriana liberando H₂O₂ y ·O₂· entre otros agentes oxidantes a la zona de infección, para contener la misma, de manera que en las primeras etapas de la infección, la planta recibe al rizobio como si se tratase de un patógeno (Rev. por 130). Partiendo de la hipótesis de que el hierro almacenado en la bacterioferritina es utilizado para el proceso de fijación biológica del nitrógeno, se esperaría que en ausencia de la bacterioferritina la promoción del crecimiento vegetal estuviera comprometida. Sin embargo no se observaron diferencias significativas en la

promoción del crecimiento vegetal entre la mutante y la cepa salvaje, indicando que esta proteína no es esencial para la fijación biológica de nitrógeno.

El estudio de la cinética de nodulación permite conocer si la mutación practicada compromete las etapas iniciales de la simbiosis rizobio-leguminosa, es decir, la colonización y la infección de las células radiculares. Para determinar si el contenido de hierro o, más precisamente la presencia de la bacterioferritina supone una ventaja en el proceso de colonización de las raíces, sería necesaria la realización de ensayos utilizando cepas de *S. meliloti* salvaje y mutante carente en bacterioferritina marcadas con diferentes fluoróforos y evaluar la competitividad de ambas cepas en la adhesión y colonización. En este trabajo, con el fin de determinar si la bacterioferritina es importante a la hora de infectar y genera las estructuras nodulares, se realizaron ensayos de cinética de nodulación en plantas crecidas en medio Jensen conteniendo 67 μM de hierro. Al evaluar la aparición de nódulos, se encontró que en las plantas inoculadas con la cepa carente en bacterioferritina, la nodulación fue más temprana que en las plantas inoculadas con la cepa salvaje. Esto estaría indicando que la ausencia de la bacterioferritina supone una ventaja en la infección de las raíces de *M. sativa*, bajo las condiciones ensayadas.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, donde habíamos encontrado que la ausencia de la bacterioferritina disminuye la sensibilidad al H_2O_2 , en condiciones de disponibilidad de hierro podría considerarse que la presencia de la bacterioferritina en células de *S. meliloti* 1021 reduce la capacidad infectiva, debido a una mayor sensibilidad al estrés oxidativo.

Conclusiones

En este trabajo comprobamos que la bacterioferritina de *S. meliloti* 1021 modula el contenido de hierro intracelular de forma que en ausencia de la proteína el contenido es levemente menor, respaldando su función como proteína de almacenamiento de hierro.

Además de almacenar hierro, puede servir como fuente de hierro nutricional para la bacteria cuando ésta se enfrenta a un medio con baja disponibilidad del metal.

A diferencia de lo reportado para otras bacterias, la bacterioferritina de *S. meliloti* parece influir negativamente sobre la resistencia al estrés oxidativo provocado por H₂O₂. Sin embargo, su presencia no es esencial para la respuesta a concentraciones elevadas de hierro o de hemina.

Los ensayos *in planta* demostraron que la bacterioferritina no es esencial para el establecimiento de una simbiosis efectiva. Sin embargo la infección bacteriana resultó ser más temprana en ausencia de la proteína, lo cual concuerda con su mayor tolerancia al estrés oxidativo.

Conclusiones generales

Conclusiones generales

En este trabajo se evaluaron tanto la función como la expresión de la bacterioferritina de la bacteria simbiote de alfalfa *S. meliloti* 1021. Dado la importancia de mantener la homeostasis de hierro, y el particular estilo de vida de los rizobios, se partió de la hipótesis que las proteínas de almacenamiento de hierro tendrían que tener un papel importante en estos organismos. En un trabajo anterior (99), se había descrito el gen *bfr* como el único implicado en el almacenamiento de hierro presente en el genoma de *S. meliloti* 1021, por lo que se elaboró una estrategia para la construcción de una mutación en el mismo, mediante la inserción del cassette *lacZGm^R*.

Los objetivos principales fueron determinar las condiciones necesarias para su expresión, analizar su implicancia en el mantenimiento de la homeostasis de hierro y en el establecimiento de la asociación simbiótica con su planta hospedera.

La incorporación de la mutación en *bfr* permitió realizar ensayos de expresión mediante medidas de actividad betagalactosidasa en diferentes condiciones de disponibilidad de hierro en el medio de cultivo, encontrándose una mayor expresión en condiciones de disponibilidad de hierro. Esto concuerda con una función de almacenamiento de hierro bajo estas condiciones al encontrarse que la cantidad de hierro intracelular detectada en la mutante carente de Bfr fue menor a la encontrada en la cepa parental. Si bien en condiciones de disponibilidad de hierro la ausencia de la bacterioferritina no compromete el crecimiento bacteriano, se demostró que en ausencia de hierro, la presencia de esta proteína confiere una ventaja a las células, cuando los cultivos son preincubados en condiciones suficientes del metal, confirmando la función de la bacterioferritina de *S. meliloti* como fuente intracelular de hierro en condiciones en las que el metal es escaso. Según los resultados de la cuantificación de hierro total intracelular en cultivos de las cepas *S. meliloti* 1021 salvaje y de la mutante Bfr- en presencia de hierro, se desprende que la bacterioferritina de *S. meliloti* 1021 sería responsable del almacenamiento de alrededor 50.000 átomos de hierro lo que equivale a un 13,5% del total de metal presente en una célula.

La incorporación de la mutación *bfr::lacZGmR* en el contexto génico de la mutante *irr* de *S. meliloti* 1021, permitió reconocer a Irr como proteína reguladora, actuando como represor en condiciones de disponibilidad de hierro. Debido a la presencia simultánea de dos cajas RirA y de una caja Irr corriente arriba del gen *bfr*, ubicadas en el presunto promotor del operón SMC03787-*bfr*, se propuso estudiar además el efecto de RirA, y el efecto concertado de ambas proteínas reguladoras. Para esto, se siguieron dos estrategias experimentales. La primera fue mediante el uso del gen reportero *gfp*, clonado bajo la acción de regiones posiblemente

promotoras, evaluándose la fluorescencia mediante espectrofluorimetría y citometría de flujo. Ambos abordajes resultaron ser útiles para estudiar la actividad promotora de estas regiones, destacándose la utilización de la citometría de flujo para detectar patrones de expresión no homogéneos en la población. Los resultados encontrados indicaron que la región corriente arriba de SMc03787 presenta mayor actividad promotora en ausencia de hierro, y que las proteínas Irr y RirA ejercen una acción activadora directa o indirectamente en esta región. Estos resultados fueron confirmados mediante qRT-PCR en condiciones de disponibilidad de hierro. Además los resultados obtenidos sugieren un rol de la región corriente arriba del gen *bfr*, en particular del ARN pequeño aún no caracterizado SmelC759, como elemento regulatorio que ejerce una acción negativa sobre la expresión de Bfr.

Por otra parte, los datos obtenidos sugieren que la expresión de SMc03787/SmelC759 y *bfr* es consecuencia de la acción concertada de RirA e Irr, de forma que en presencia de ambas proteínas habría un equilibrio entre los sitios de unión libres y ocupados en una misma célula.

A partir de las evidencias experimentales presentadas en este trabajo se elaboró un modelo hipotético de expresión en presencia de hierro, en el que la unión de RirA en la región promotora de SMc03787 reprime la expresión del ARN pequeño SmelC759 mientras que Irr activa o contribuye a la desrepresión aunque la acción de Irr es débil en presencia de hierro y de RirA. La presencia del ARN pequeño SmelC759 tendría un efecto negativo (posiblemente indirecto) en la expresión del gen *bfr*, por lo que en estas condiciones la expresión a partir del transcripto T2 se vería favorecida. En condiciones de escasez de hierro, el promotor de SmelC759 estaría activo, inhibiendo la expresión de T2. Sin embargo la presencia de un terminador “goteante” luego del pequeño ARN permitiría continuar la transcripción obteniéndose así el transcripto largo T3 y por consiguiente una expresión limitada de Bfr. En este caso, la activación de Irr se vería fortalecida por la presencia de SmelC759. Si bien el modelo propuesto para la condición de ausencia de hierro es más especulativo, explicaría los resultados obtenidos en este trabajo.

El perfil de expresión de Bfr reportado en este trabajo indica, como se mencionó anteriormente, una activación en presencia de hierro. Bajo esta condición las células se exponen a los efectos tóxicos de las especies reactivas del oxígeno producidas debido a la catálisis dependiente de hierro. Los estudios realizados en este trabajo demostraron que la bacterioferritina de *S. meliloti* 1021 no aporta una ventaja frente al estrés causado por exceso de hierro o de hemina. Sin embargo, al enfrentar las células al peróxido de hidrógeno, se encontró que la presencia de la bacterioferritina, lejos de brindar protección como se ha descrito en otras bacterias, confiere una mayor sensibilidad.

Por último, debido a la importancia de la homeostasis del hierro en el establecimiento de la simbiosis entre rizobios y plantas leguminosas, se estudió la implicancia de la bacterioferritina en este punto. Aquí se demostró que si bien la bacterioferritina de *S. meliloti* 1021 no es esencial para la promoción del crecimiento vegetal, su ausencia resulta en una infección más temprana, debido posiblemente a una menor sensibilidad al ataque del hospedador durante la etapa de infección.

Anexo I: Abreviaturas utilizadas

Amp:	Ampicilina
c.s.p.:	cantidad suficiente para
dpi:	días postinoculación
EDDHA:	ácido etilendiamino-o-hidroxifenilacético
EDTA:	ácido etilendiamino tetra-acético
Gm:	Gentamicina
Km:	Kanamicina
MG:	Gherardt medium
MSC:	Sitio de clonado múltiple
Nm:	Neomicina
p.i.:	postinoculación
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
Sac:	sacarosa
SDS:	Dodecil sulfato de sodio
Spc:	Spectinomicina
Str:	Streptomicina
TAE:	Tris Acético EDTA
UFC:	Unidades formadoras de colonias
UTR:	Región no traducida

Anexo II: Composición de medios de cultivo

Medio mínimo M3 (121)

20 ml KH_2PO_4 5 % (m/v) anhidro

20 ml K_2HPO_4 5 % (m/v) anhidro

2 ml CaCl_2 2,5 % (m/v) anhidro

2 ml Biotina 0,1 g/l

10 ml Manitol 10 % (m/v)

Se lleva a pH 7 con NaOH

Agua destilada c.s.p. 1 l

Autoclavar

Complementar con:

1,5 ml/l metionina 0,2 M filtrado

10 ml/l glutamato 10 % (m/v)

Medio mínimo M9 (108)

Solución salina 5x:

34 g Na_2HPO_4 anh

15 g KH_2PO_4

2,5 g NaCl

5 g NH_4Cl
2 ml MgSO_4 1 M
20 ml Glucosa 20 %
100 μl CaCl_2 1 M
1,5 ml/l metionina 0,2 M

TY (102)

5 g Triptona
3 g Extracto de levadura
2 ml CaCl_2 2,5% (m/v) anhidro
Agua destilada c.s.p. 1 l

LB (107)

10 g Triptona
5 g Extracto de levadura
10 g NaCl

Jensen (131)

1 g CaHPO_4
0,2 g K_2HPO_4
0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0,2 g NaCl
0,01 g FeCl_3
1 ml solución de micronutrientes
Agua c.s.p. 1000 ml

Anexo III: Composición de soluciones y buffers

Buffer Z

Na_2HPO_4 0,06 M
 NaH_2PO_4 0,04 M
KCl 0,01 M
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001 M

Buffer fosfato de sodio pH 8

7 ml NaH_2PO_4 0,2 M

18 ml Na_2HPO_4 0,2 M

Agua destilada c.s.p. 50 ml

TAE

121 g Tris base

28,55 ml ácido acético glacial

50 ml EDTA 0,5 M pH 8

Agua destilada c.s.p. 1 l

Soluciones utilizadas en el Southern blot

Solución de bloqueo

75 ml SDS 10 % (m/v)

18,75 ml NaCl 1 M

37,5 ml Buffer P

SSC 20x

NaCl 3 M

Citrato de sodio 0,3 M

pH 7

Solución despurinizante

HCl 0,25 M

Solución desnaturalizante

NaOH 0,5 M

NaCl 1,5 M

Solución neutralizante

Tris-HCl 1 M

NaCl 1,5 M

pH 7,5

Solución de Prehibridación

15 ml SSC 20x

6,25 ml Denharts 40x

2,5 ml SDS 10% (m/v)

500 μl ADN desnaturalizado

Agua destilada c.s.p. 50 ml

Solución de lavado I

Solución de bloqueo 1:10 en agua destilada

Solución de lavado II (10x)

Tris-HCl 100 mM

NaCl 100 mM

MgCl₂ 10 mM

pH 9,5

Soluciones para la minipreparación de ADN plasmídico

Solución I

Glucosa 50 mM

Tris-HCl 25 mM

EDTA pH 8 10 mM

Solución II

NaOH 0,2 N

SDS (m/v) 1%

Solución III

60 ml Acetato de potasio 5 M

11,5 ml ácido acético glacial

H₂O c.s.p. 100 ml

Anexo IV:

Cebadores diseñados

cebador	secuencia	MW	% GC	Tm (°C)	Uso
3787 F	5' TTG AAG CTT GGG CGC CCC TGT GTA 3'	7.349	58,3	68,6	pOT1-P3787 y pOT1-P3787T
P3787 R	5' TCC TCT AGA TCG TCG TGT CCA TCA TAC 6 3'	8.452	50	70,1	
P3787 Trad R	5' TAC TCT AGA CGG GCG TGA TAT TGC 3'	7.375	50	65,3	pOT1-P3787T
Pbfr F	5' GTC AAG CTT ATG GAA AAA CGC GGC C 3'	7.683	52	67,4	pOT1-Pbfr y pOT1-PbfrT
Pbfr R	5' ATC TCT AGA CGC CCT CCG GTT TTC TTC A 3'	8.390	50	70,1	
Pbfr Trad R	5' GTC TCT AGA ATT CTT ATA GGC CGT GC 3'	7.915	46,2	66,2	pOT1-PbfrT
bfd F	5' GGA CGC CGA TAT ATT TGA TTT C 3'	6.740	41	51,1	qRT-PCR
bfd R	5' CGT CGC CTT TCA AGA TCC 3'	5.410	56	50,3	qRT-PCR
bfr F	5' CGA TTA CGT CTC GAT GAA GC 3'	6.117	50	51,8	qRT-PCR
bfr R	5' CTG GCC GTA TTT TTC CTC AC 3'	6,157	50	51,8	qRT-PCR
sRNA F	5' TTG CGT ATG ATG GAC ACG AC 3'	6,157	50	51,8	qRT-PCR
s RNA R	5' ACG ATC AAC TGC CAA CAG TC 3'	6.055	50	51,8	qRT-PCR

Anexo V:

Datos de expresión de GFP mediante espectrofluorimetría

Tabla 12: Datos de expresión GFP

Ensayo 1

Cepa	Construcción	Condición	DO	F	F/DO
Blanco	Blanco	-Fe	0,050851	0,230858	4,53989105
Blanco	Blanco	-Fe	0,0513227	0,147854	2,88086948
Blanco	Blanco	-Fe	0,0493521	0,256571	5,19878587
Blanco	Blanco	-Fe	0,0526039	0,117464	2,23299033
Blanco	Blanco	-Fe	0,0486591	0,250968	5,15767863
Blanco	Blanco	-Fe	0,0621287	0,111598	1,7962391
Blanco	Blanco	-Fe	0,0406077	0,177056	4,3601583
Blanco	Blanco	-Fe	0,0537777	0,121743	2,26381939
Blanco	Blanco	-Fe	0,0643323	0,289822	4,50507754
Blanco	Blanco	-Fe	0,0784901	0,138208	1,76083353
Blanco	Blanco	-Fe	0,0398867	0,210649	5,28118395
Blanco	Blanco	-Fe	0,0532397	0,11815	2,2192086
Blanco	Blanco	-Fe	0,0428125	0,240309	5,61305693
Blanco	Blanco	-Fe	0,0499959	0,12622	2,52460702
Blanco	Blanco	-Fe	0,0435	0,202115	4,64632184
Blanco	Blanco	-Fe	0,0498191	0,111846	2,24504256
Blanco	Blanco	+Fe	0,0463704	0,174551	3,76427635
Blanco	Blanco	+Fe	0,0538387	0,11445	2,12579427
Blanco	Blanco	+Fe	0,368342	1,10896	3,01068029
Blanco	Blanco	+Fe	0,052229	0,117553	2,25072278
Blanco	Blanco	+Fe	0,0502563	0,216777	4,31342936
Blanco	Blanco	+Fe	0,071626	0,160404	2,23946612
Blanco	Blanco	+Fe	0,0564188	0,207393	3,67595553
Blanco	Blanco	+Fe	0,110863	0,164225	1,48133282
Blanco	Blanco	+Fe	0,0565537	0,161029	2,84736454
Blanco	Blanco	+Fe	0,0505076	0,137982	2,73190569
Blanco	Blanco	+Fe	0,05302	0,263756	4,97465108
Blanco	Blanco	+Fe	0,0509721	0,118595	2,32666498
Blanco	Blanco	+Fe	0,0741441	0,54238	7,31521456
Blanco	Blanco	+Fe	0,050104	0,14288	2,85166853
Blanco	Blanco	+Fe	0,0726176	0,211591	2,91377022
Blanco	Blanco	+Fe	0,0537796	0,135043	2,51104508
wt	pOT1	-Fe	0,579473	2,6249	4,52980553
wt	pOT1	-Fe	0,492812	2,03072	4,12067888
wt	pOT1	-Fe	0,462212	2,11192	4,56915874
wt	pOT1	-Fe	0,411329	2,03392	4,94475225
wt	pOT1	+Fe	0,637448	1,70359	2,67251603
wt	pOT1	+Fe	0,678281	1,76531	2,6026234
wt	pOT1	+Fe	0,876532	2,28139	2,60274582
wt	pOT1	+Fe	1,18319	6,04848	5,11201075
wt	P3787	-Fe	1,03143	110,161	106,804146
wt	P3787	-Fe	0,603608	62,1728	103,001948
wt	P3787	-Fe	0,469204	47,7166	101,696916
wt	P3787	-Fe	0,367474	27,488	74,8025711
wt	P3787	+Fe	0,75354	16,3673	21,7205457
wt	P3787	+Fe	0,797149	16,0537	20,138895
wt	P3787	+Fe	1,16205	20,3536	17,5152532
wt	P3787	+Fe	1,21914	25,6316	21,0243286
wt	P3787 T	-Fe	0,569412	25,8737	45,4393304
wt	P3787 T	-Fe	0,32925	14,4753	43,9644647
wt	P3787 T	-Fe	0,287836	11,5489	40,1231952
wt	P3787 T	-Fe	0,269187	11,2888	41,9366463

wt	P3787 T	+Fe	0,589123	6,58321	11,1745934
wt	P3787 T	+Fe	0,568931	6,69876	11,7742925
wt	P3787 T	+Fe	0,624405	7,0856	11,3477631
wt	P3787 T	+Fe	1,23119	19,0635	15,4838002
wt	Pbfr	-Fe	0,775916	2,03809	2,62668897
wt	Pbfr	-Fe	0,347008	1,19834	3,45334978
wt	Pbfr	-Fe	0,517966	1,5883	3,06641749
wt	Pbfr	-Fe	0,452887	1,16403	2,57024379
wt	Pbfr	+Fe	0,588234	1,06442	1,80951798
wt	Pbfr	+Fe	0,559118	0,894818	1,60040993
wt	Pbfr	+Fe	0,783017	1,26172	1,6113571
wt	Pbfr	+Fe	1,2042	4,10427	3,40829596
wt	Pbfr T	-Fe	0,971099	5,07125	5,22217611
wt	Pbfr T	-Fe	0,464424	2,9478	6,3472172
wt	Pbfr T	-Fe	0,488069	3,26098	6,68139136
wt	Pbfr T	-Fe	0,356756	2,48632	6,96924509
wt	Pbfr T	+Fe	0,623218	2,24473	3,60183756
wt	Pbfr T	+Fe	0,586821	2,08986	3,56132449
wt	Pbfr T	+Fe	1,22854	8,7966	7,16020642
wt	Pbfr T	+Fe	1,21971	11,3139	9,27589345
lrr	pOT1	-Fe	0,455124	2,26757	4,98231251
lrr	pOT1	-Fe	0,301972	1,17844	3,90248102
lrr	pOT1	-Fe	0,178026	0,699616	3,92985294
lrr	pOT1	-Fe	0,144896	0,534947	3,69193767
lrr	pOT1	+Fe	0,779238	1,52214	1,95336983
lrr	pOT1	+Fe	1,02863	2,1292	2,06993768
lrr	pOT1	+Fe	1,07716	2,93486	2,72462772
lrr	pOT1	+Fe	1,22522	3,05172	2,49075268
lrr	P3787	-Fe	0,478427	19,3461	40,4368901
lrr	P3787	-Fe	0,290992	9,6049	33,0074366
lrr	P3787	-Fe	0,199623	6,35452	31,8326045
lrr	P3787	-Fe	0,187497	5,52644	29,4748183
lrr	P3787	+Fe	0,79457	5,12674	6,45221944
lrr	P3787	+Fe	0,785669	7,61737	9,69539335
lrr	P3787	+Fe	1,15832	9,91447	8,5593532
lrr	P3787	+Fe	1,17989	10,8954	9,23425065
lrr	P3787 T	-Fe	0,495072	4,95386	10,0063425
lrr	P3787 T	-Fe	0,265163	2,75084	10,3741472
lrr	P3787 T	-Fe	0,234075	2,05751	8,78996048
lrr	P3787 T	-Fe	0,223349	1,92059	8,5990535
lrr	P3787 T	+Fe	0,756629	3,86823	5,11245273
lrr	P3787 T	+Fe	0,59119	3,09449	5,23434091
lrr	P3787 T	+Fe	0,736295	3,62047	4,91714598
lrr	P3787 T	+Fe	0,818489	3,995	4,88094525
lrr	Pbfr	-Fe	0,398951	1,96768	4,93213452
lrr	Pbfr	-Fe	0,279909	1,39997	5,00151835
lrr	Pbfr	-Fe	0,205775	1,10611	5,37533714
lrr	Pbfr	-Fe	0,296156	1,2614	4,25924175
lrr	Pbfr	+Fe	0,663523	1,67149	2,51911388
lrr	Pbfr	+Fe	0,58275	1,49462	2,56477048
lrr	Pbfr	+Fe	0,571587	1,38707	2,4266997
lrr	Pbfr	+Fe	0,611766	1,65315	2,70225871
lrr	Pbfr T	-Fe	0,290388	28,9382	99,653567
lrr	Pbfr T	-Fe	0,423244	32,3573	76,4506998
lrr	Pbfr T	-Fe	0,399157	29,3111	73,432509
lrr	Pbfr T	-Fe	0,371472	28,1612	75,8097515
lrr	Pbfr T	+Fe	0,873487	6,55458	7,50392393
lrr	Pbfr T	+Fe	1,1945	7,9916	6,69033068
lrr	Pbfr T	+Fe	0,61394	4,4213	7,20151806
lrr	Pbfr T	+Fe	0,703563	5,65765	8,04142628
RirA	pOT1	-Fe	0,138163	1,49636	10,830396

RirA	pOT1	-Fe	0,130946	1,42996	10,9202267
RirA	pOT1	-Fe	0,132766	1,45042	10,9246343
RirA	pOT1	-Fe	0,125633	1,41891	11,2940867
RirA	pOT1	+Fe	0,245334	2,02694	8,26196124
RirA	pOT1	+Fe	0,668254	3,21219	4,80683991
RirA	pOT1	+Fe	0,900163	4,84966	5,38753537
RirA	pOT1	+Fe	0,784797	5,38679	6,86392787
RirA	P3787	-Fe	0,135872	5,07807	37,3739255
RirA	P3787	-Fe	0,121799	4,43837	36,4401186
RirA	P3787	-Fe	0,128708	5,34863	41,5563135
RirA	P3787	-Fe	0,121777	4,56805	37,5115991
RirA	P3787	+Fe	0,567065	31,4609	55,480236
RirA	P3787	+Fe	0,590021	30,0792	50,9798804
RirA	P3787	+Fe	0,695132	35,4184	50,9520494
RirA	P3787	+Fe	0,839245	48,7732	58,1155682
RirA	P3787 T	-Fe	0,166677	3,02303	18,1370555
RirA	P3787 T	-Fe	0,12901	2,45881	19,0590652
RirA	P3787 T	-Fe	0,118865	2,46677	20,7527026
RirA	P3787 T	-Fe	0,109885	2,25741	20,5433863
RirA	P3787 T	+Fe	0,754613	14,1556	18,7587545
RirA	P3787 T	+Fe	0,574901	12,0757	21,0048339
RirA	P3787 T	+Fe	0,701943	14,0319	19,9900847
RirA	P3787 T	+Fe	0,787085	16,6939	21,2097804
RirA	Pbfr	-Fe	0,524585	1,30432	2,48638448
RirA	Pbfr	-Fe	0,523966	1,10875	2,11607242
RirA	Pbfr	-Fe	0,526582	1,12492	2,13626748
RirA	Pbfr	-Fe	0,399971	1,16141	2,90373552
RirA	Pbfr	+Fe	1,54635	4,08667	2,64278462
RirA	Pbfr	+Fe	1,3358	3,99447	2,99032041
RirA	Pbfr	+Fe	0,843808	2,82387	3,34657884
RirA	Pbfr	+Fe	1,37738	6,31525	4,58497292
RirA	Pbfr T	-Fe	0,464875	2,78586	5,99270772
RirA	Pbfr T	-Fe	0,381972	2,29042	5,99630339
RirA	Pbfr T	-Fe	0,305349	2,13823	7,00257738
RirA	Pbfr T	-Fe	0,235355	1,91531	8,1379618
RirA	Pbfr T	+Fe	1,33536	9,2409	6,92015636
RirA	Pbfr T	+Fe	1,05019	8,4295	8,0266428
RirA	Pbfr T	+Fe	0,687885	4,36306	6,34271717
RirA	Pbfr T	+Fe	1,24789	12,778	10,2396846
Irr/RirA	pOT1	-Fe	0,650471	1,16088	1,78467603
Irr/RirA	pOT1	-Fe	0,536649	0,90377	1,68409892
Irr/RirA	pOT1	-Fe	0,50067	0,934942	1,86738171
Irr/RirA	pOT1	-Fe	0,499448	0,978936	1,96003588
Irr/RirA	pOT1	+Fe	1,02635	1,96885	1,91830272
Irr/RirA	pOT1	+Fe	1,25713	3,04354	2,42102249
Irr/RirA	pOT1	+Fe	1,21048	2,94361	2,43177087
Irr/RirA	pOT1	+Fe	1,53132	4,60701	3,00852206
Irr/RirA	P3787	-Fe	0,50456	32,1118	63,6431743
Irr/RirA	P3787	-Fe	0,491433	30,515	62,0939172
Irr/RirA	P3787	-Fe	0,452525	28,1506	62,2078338
Irr/RirA	P3787	-Fe	0,4423	31,8842	72,0872711
Irr/RirA	P3787	+Fe	1,53375	125,883	82,0753056
Irr/RirA	P3787	+Fe	1,50377	121,936	81,0868683
Irr/RirA	P3787	+Fe	1,47301	115,897	78,6803891
Irr/RirA	P3787	+Fe	1,62214	144,605	89,1445868
Irr/RirA	P3787 T	-Fe	0,425601	4,73563	11,126924
Irr/RirA	P3787 T	-Fe	0,358913	4,20603	11,7188009
Irr/RirA	P3787 T	-Fe	0,358992	4,33373	12,0719403
Irr/RirA	P3787 T	-Fe	0,244277	3,57557	14,6373584
Irr/RirA	P3787 T	+Fe	0,96557	22,4415	23,2417121
Irr/RirA	P3787 T	+Fe	0,650818	13,9179	21,3852413

Irr/RirA	P3787 T	+Fe	0,700015	14,0765	20,1088548
Irr/RirA	P3787 T	+Fe	0,664073	13,3574	20,1143549
Irr/RirA	Pbfr	-Fe	0,177882	1,55537	8,74383018
Irr/RirA	Pbfr	-Fe	0,164694	1,60423	9,74067058
Irr/RirA	Pbfr	-Fe	0,140697	1,4138	10,048544
Irr/RirA	Pbfr	-Fe	0,146368	1,55326	10,612019
Irr/RirA	Pbfr	+Fe	0,552224	4,31325	7,81068914
Irr/RirA	Pbfr	+Fe	0,802411	5,29045	6,59319227
Irr/RirA	Pbfr	+Fe	0,805909	5,01553	6,22344458
Irr/RirA	Pbfr	+Fe	0,936361	5,84721	6,24461079
Irr/RirA	Pbfr T	-Fe	0,674624	3,26733	4,84318672
Irr/RirA	Pbfr T	-Fe	0,560861	2,73638	4,87889156
Irr/RirA	Pbfr T	-Fe	0,513416	2,62002	5,10311326
Irr/RirA	Pbfr T	-Fe	0,448761	2,47748	5,52071147
Irr/RirA	Pbfr T	+Fe	1,11148	6,50125	5,84918307
Irr/RirA	Pbfr T	+Fe	0,552298	3,71523	6,7268576
Irr/RirA	Pbfr T	+Fe	0,73727	4,67391	6,33948214
Irr/RirA	Pbfr T	+Fe	1,13772	10,2681	9,02515557

Tabla 13: Datos de expresión GFP
Ensayo 2

Cepa	Construcción	Condición	F	DO	F/DO
blanco	blanco	+Fe	0,232	0,051	4,532
blanco	blanco	+Fe	0,175	0,045	3,892
blanco	blanco	+Fe	0,222	0,045	4,911
blanco	blanco	+Fe	0,200	0,048	4,202
blanco	blanco	+Fe	0,248	0,048	5,171
blanco	blanco	+Fe	0,235	0,052	4,523
blanco	blanco	+Fe	0,325	0,075	4,338
blanco	blanco	+Fe	0,342	0,062	5,506
blanco	blanco	-Fe	0,258	0,045	5,737
blanco	blanco	-Fe	0,241	0,044	5,506
blanco	blanco	-Fe	0,241	0,043	5,561
blanco	blanco	-Fe	0,227	0,050	4,584
blanco	blanco	-Fe	0,243	0,051	4,736
blanco	blanco	-Fe	0,254	0,043	5,868
blanco	blanco	-Fe	0,189	0,045	4,209
blanco	blanco	-Fe	0,220	0,047	4,716
wt	pOT1	+Fe	1,303	0,392	3,322
wt	pOT1	+Fe	1,102	0,517	2,132
wt	pOT1	-Fe	3,025	0,701	4,312
wt	pOT1	-Fe	2,747	0,313	8,782
wt	P3787	+Fe	8,731	0,449	19,437
wt	P3787	+Fe	9,437	0,502	18,817
wt	P3787	-Fe	28,108	0,419	67,138
wt	P3787	-Fe	12,581	0,308	40,909
wt	P3787 T	+Fe	6,258	0,373	16,788
wt	P3787 T	+Fe	3,713	0,508	7,305
wt	P3787 T	-Fe	10,585	0,373	28,352
wt	P3787 T	-Fe	3,915	0,198	19,751
wt	Pbfr	+Fe	0,754	0,433	1,742
wt	Pbfr	+Fe	0,837	0,570	1,469
wt	Pbfr	-Fe	3,139	0,348	9,033
wt	Pbfr	-Fe	0,576	0,189	3,047
wt	Pbfr T	+Fe	2,491	0,921	2,705
wt	Pbfr T	+Fe	1,444	0,416	3,472
wt	Pbfr T	-Fe	3,284	0,318	10,323
wt	Pbfr T	-Fe	0,525	0,093	5,678
Irr	pOT1	+Fe	1,362	0,807	1,689

Irr	pOT1	+Fe	1,158	0,779	1,486
Irr	pOT1	-Fe	1,122	0,255	4,397
Irr	pOT1	-Fe	0,825	0,178	4,640
Irr	P3787	+Fe	3,367	0,502	6,705
Irr	P3787	+Fe	3,311	0,487	6,794
Irr	P3787	-Fe	4,061	0,177	22,887
Irr	P3787	-Fe	7,037	0,231	30,399
Irr	P3787 T	+Fe	2,262	0,558	4,056
Irr	P3787 T	+Fe	2,477	0,600	4,128
Irr	P3787 T	-Fe	1,131	0,136	8,343
Irr	P3787 T	-Fe	1,837	0,185	9,925
Irr	Pbfr	+Fe	1,336	0,617	2,166
Irr	Pbfr	+Fe	1,294	0,699	1,851
Irr	Pbfr	-Fe	0,813	0,197	4,125
Irr	Pbfr	-Fe	0,796	0,165	4,829
Irr	Pbfr T	+Fe	4,226	0,818	5,165
Irr	Pbfr T	+Fe	3,970	0,775	5,120
Irr	Pbfr T	-Fe	3,859	0,147	26,300
Irr	Pbfr T	-Fe	2,751	0,119	23,144
RirA	pOT1	+Fe	0,878201	0,394662	2,225
RirA	pOT1	+Fe	1,13821	0,497367	2,288
RirA	pOT1	-Fe	2,1111	0,271007	7,790
RirA	pOT1	-Fe	1,31571	0,324546	4,054
RirA	P3787	+Fe	2,22769	0,405924	5,488
RirA	P3787	+Fe	2,43081	0,46761	5,198
RirA	P3787	-Fe	1,80821	0,195111	9,268
RirA	P3787	-Fe	6,72508	0,350054	19,212
RirA	P3787 T	+Fe	7,81007	0,245136	31,860
RirA	P3787 T	+Fe	11,2565	0,301149	37,379
RirA	P3787 T	-Fe	10,6402	0,289485	36,756
RirA	P3787 T	-Fe	12,3653	0,387461	31,914
RirA	Pbfr	+Fe	0,623573	0,230803	2,702
RirA	Pbfr	+Fe	0,714705	0,256318	2,788
RirA	Pbfr	-Fe	0,957269	0,203134	4,713
RirA	Pbfr	-Fe	2,55016	0,322267	7,913
RirA	Pbfr T	+Fe	1,27562	0,284186	4,489
RirA	Pbfr T	+Fe	1,37199	0,318074	4,313
RirA	Pbfr T	-Fe	0,389014	0,0764216	5,090
RirA	Pbfr T	-Fe	0,838234	0,119535	7,012
Irr/RirA	pOT1	+Fe	2,60233	0,832145	3,127
Irr/RirA	pOT1	+Fe	3,69408	1,10996	3,328
Irr/RirA	pOT1	-Fe	0,160812	0,0749363	2,146
Irr/RirA	pOT1	-Fe	1,46422	0,422816	3,463
Irr/RirA	P3787	+Fe	31,0022	0,901163	34,402
Irr/RirA	P3787	+Fe	98,3297	1,12962	87,047
Irr/RirA	P3787	-Fe	45,1385	0,714953	63,135
Irr/RirA	P3787	-Fe	61,3671	0,672527	91,249
Irr/RirA	P3787 T	+Fe	5,40259	0,495715	10,899
Irr/RirA	P3787 T	+Fe	25,0457	1,04106	24,058
Irr/RirA	P3787 T	-Fe	12,7252	0,533106	23,870
Irr/RirA	P3787 T	-Fe	14,4516	0,481716	30,000
Irr/RirA	Pbfr	+Fe	1,79231	0,598361	2,995
Irr/RirA	Pbfr	+Fe	4,3574	1,05532	4,129
Irr/RirA	Pbfr	-Fe	1,78308	0,427507	4,171
Irr/RirA	Pbfr	-Fe	1,43867	0,326587	4,405
Irr/RirA	Pbfr T	+Fe	6,38907	1,10973	5,757
Irr/RirA	Pbfr T	+Fe	8,72039	1,13126	7,709
Irr/RirA	Pbfr T	-Fe	1,48931	0,29489	5,050
Irr/RirA	Pbfr T	-Fe	1,43944	0,25463	5,653

Tabla 14: Datos de expresión GFP					
Ensayo 3					
Cepa	Construcción	Condición	DO	F	F/DO
Blanco	Blanco	-Fe	0,044	0,261	5,986
Blanco	Blanco	-Fe	0,044	0,264	5,969
Blanco	Blanco	-Fe	0,044	0,238	5,358
Blanco	Blanco	-Fe	0,045	0,234	5,243
Blanco	Blanco	-Fe	0,045	0,276	6,096
Blanco	Blanco	-Fe	0,044	0,295	6,750
Blanco	Blanco	-Fe	0,044	0,232	5,275
Blanco	Blanco	-Fe	0,046	0,306	6,702
Blanco	Blanco	-Fe	0,046	0,267	5,787
Blanco	Blanco	-Fe	0,044	0,262	5,972
Blanco	Blanco	-Fe	0,043	0,243	5,718
Blanco	Blanco	-Fe	0,045	0,297	6,637
Blanco	Blanco	+Fe	0,045	0,244	5,427
Blanco	Blanco	+Fe	0,042	0,234	5,498
Blanco	Blanco	+Fe	0,043	0,261	6,124
Blanco	Blanco	+Fe	0,045	0,222	4,932
Blanco	Blanco	+Fe	0,042	0,233	5,521
Blanco	Blanco	+Fe	0,042	0,250	5,901
Blanco	Blanco	+Fe	0,040	0,248	6,168
Blanco	Blanco	+Fe	0,039	0,264	6,747
Blanco	Blanco	+Fe	0,041	0,297	7,182
Blanco	Blanco	+Fe	0,045	0,237	5,225
Blanco	Blanco	+Fe	0,048	0,294	6,167
Blanco	Blanco	+Fe	0,045	0,242	5,391
wt	pOT1	-Fe	0,413	1,658	4,013
wt	pOT1	-Fe	0,402	1,467	3,648
wt	pOT1	-Fe	0,509	1,537	3,020
wt	pOT1	+Fe	1,410	3,666	2,601
wt	pOT1	+Fe	1,381	3,564	2,581
wt	pOT1	+Fe	1,398	3,896	2,786
wt	P3787	-Fe	0,508	40,280	79,353
wt	P3787	-Fe	0,509	47,592	93,457
wt	P3787	-Fe	0,415	37,911	91,367
wt	P3787	+Fe	1,636	25,853	15,803
wt	P3787	+Fe	1,531	28,485	18,606
wt	P3787	+Fe	1,423	27,188	19,103
wt	P3787 T	-Fe	0,285	9,202	32,285
wt	P3787 T	-Fe	0,216	7,066	32,712
wt	P3787 T	-Fe	0,211	6,806	32,195
wt	P3787 T	+Fe	0,459	3,500	7,623
wt	P3787 T	+Fe	1,191	9,091	7,630
wt	P3787 T	+Fe	1,138	7,220	6,344
lrr	pOT1	-Fe	0,240	0,821	3,424
lrr	pOT1	-Fe	0,311	0,793	2,549
lrr	pOT1	-Fe	0,506	0,917	1,811
lrr	pOT1	+Fe	0,600	1,003	1,673
lrr	pOT1	+Fe	0,548	3,381	6,170
lrr	pOT1	+Fe	0,853	1,430	1,677
lrr	P3787	-Fe	0,274	10,287	37,592
lrr	P3787	-Fe	0,339	14,826	43,795
lrr	P3787	-Fe	0,481	24,291	50,516
lrr	P3787	+Fe	0,606	4,574	7,547
lrr	P3787	+Fe	0,554	4,558	8,229
lrr	P3787	+Fe	0,565	4,466	7,907
lrr	P3787 T	-Fe	0,210	1,860	8,876
lrr	P3787 T	-Fe	0,216	2,074	9,607
lrr	P3787 T	-Fe	0,290	2,527	8,710

Irr	P3787 T	+Fe	0,452	2,339	5,177
Irr	P3787 T	+Fe	0,395	1,976	5,001
Irr	P3787 T	+Fe	0,440	2,195	4,989
RirA	pOT1	-Fe	0,643	1,486	2,311
RirA	pOT1	-Fe	0,776	1,522	1,962
RirA	pOT1	-Fe	0,647	1,193	1,844
RirA	pOT1	+Fe	0,835	1,357	1,624
RirA	pOT1	+Fe	0,834	1,388	1,664
RirA	pOT1	+Fe	1,003	1,258	1,254
RirA	P3787	-Fe	0,370	4,644	12,561
RirA	P3787	-Fe	0,389	5,377	13,837
RirA	P3787	-Fe	0,449	5,857	13,042
RirA	P3787	+Fe	0,818	8,778	10,734
RirA	P3787	+Fe	0,764	8,450	11,054
RirA	P3787	+Fe	0,788	7,904	10,027
RirA	P3787 T	-Fe	0,321	13,986	43,637
RirA	P3787 T	-Fe	0,409	18,360	44,916
RirA	P3787 T	-Fe	0,394	18,359	46,593
RirA	P3787 T	+Fe	1,350	80,108	59,347
RirA	P3787 T	+Fe	0,380	17,637	46,467
RirA	P3787 T	+Fe	0,613	31,683	51,672
Irr/RirA	pOT1	-Fe	0,810	1,618	1,998
Irr/RirA	pOT1	-Fe	0,681	1,608	2,360
Irr/RirA	pOT1	-Fe	0,707	1,319	1,866
Irr/RirA	pOT1	+Fe	1,623	3,617	2,229
Irr/RirA	pOT1	+Fe	0,886	1,788	2,018
Irr/RirA	pOT1	+Fe	1,553	4,886	3,145
Irr/RirA	P3787	-Fe	0,664	51,076	76,890
Irr/RirA	P3787	-Fe	0,830	84,452	101,703
Irr/RirA	P3787	-Fe	0,748	55,062	73,656
Irr/RirA	P3787	+Fe	1,934	213,719	110,534
Irr/RirA	P3787	+Fe	1,873	156,478	83,565
Irr/RirA	P3787	+Fe	1,771	155,716	87,943
Irr/RirA	P3787 T	-Fe	0,688	22,099	32,099
Irr/RirA	P3787 T	-Fe	0,680	20,371	29,958
Irr/RirA	P3787 T	-Fe	0,741	22,059	29,785
Irr/RirA	P3787 T	+Fe	1,275	25,659	20,128
Irr/RirA	P3787 T	+Fe	1,284	26,125	20,349
Irr/RirA	P3787 T	+Fe	1,331	25,468	19,139

**Tabla 15: Datos de expresión GFP
Ensayo 4**

Construcción	Cepa	Condición	DO	F	F/DO
blanco	blanco	-Fe	0,0570082	0,271257	4,76
blanco	blanco	-Fe	0,0520676	0,26338	5,06
blanco	blanco	-Fe	0,0414468	0,218414	5,27
blanco	blanco	-Fe	0,0580167	0,250425	4,32
blanco	blanco	-Fe	0,0480032	0,278862	5,81
blanco	blanco	-Fe	0,0433468	0,248777	5,74
blanco	blanco	-Fe	0,0440421	0,257594	5,85
blanco	blanco	-Fe	0,0449551	0,214684	4,78
blanco	blanco	-Fe	0,0587306	0,265504	4,52
blanco	blanco	-Fe	0,0530218	0,278764	5,26
blanco	blanco	-Fe	0,0290874	0,243395	8,37
blanco	blanco	-Fe	0,056795	0,260515	4,59
blanco	blanco	+Fe	0,063849	0,201937	3,16
blanco	blanco	+Fe	0,0581687	0,234328	4,03
blanco	blanco	+Fe	0,0625312	0,214651	3,43
blanco	blanco	+Fe	0,0875797	0,202564	2,31

blanco	blanco	+Fe	0,106733	0,227783	2,13
blanco	blanco	+Fe	0,0526542	0,212424	4,03
blanco	blanco	+Fe	0,07309	0,200377	2,74
blanco	blanco	+Fe	0,0490338	0,21906	4,47
blanco	blanco	+Fe	0,0385231	0,187676	4,87
blanco	blanco	+Fe	0,0536983	0,230724	4,30
blanco	blanco	+Fe	0,0660308	0,500243	7,58
1021	pOT1	-Fe	0,501916	1,71875	3,42
1021	pOT1	-Fe	0,681756	1,90338	2,79
1021	pOT1	-Fe	0,543613	1,6081	2,96
1021	pOT1	+Fe	1,37665	3,98035	2,89
1021	pOT1	+Fe	1,42152	4,05518	2,85
1021	pOT1	+Fe	1,49892	4,13184	2,76
1021	P3787	-Fe	0,720729	34,5606	47,95
1021	P3787	-Fe	0,448715	31,6448	70,52
1021	P3787	+Fe	1,05598	23,4804	22,24
1021	P3787	+Fe	0,976483	21,8485	22,37
1021	P3787	+Fe	1,29594	21,5621	16,64
1021	P3787 T	-Fe	0,430025	10,3432	24,05
1021	P3787 T	-Fe	0,542741	11,938	22,00
1021	P3787 T	-Fe	0,78777	22,334	28,35
1021	P3787 T	+Fe	1,47069	18,6615	12,69
1021	P3787 T	+Fe	1,36633	13,5112	9,89
1021	P3787 T	+Fe	1,33645	13,1142	9,81
Irr	pOT1	-Fe	0,338472	0,76733	2,27
Irr	pOT1	-Fe	0,391577	0,7006	1,79
Irr	pOT1	-Fe	0,438561	0,731864	1,67
Irr	pOT1	+Fe	1,09001	1,75645	1,61
Irr	pOT1	+Fe	1,08059	1,75336	1,62
Irr	pOT1	+Fe	1,46019	2,85758	1,96
Irr	P3787	-Fe	0,330947	8,36261	25,27
Irr	P3787	-Fe	0,30796	7,72049	25,07
Irr	P3787	-Fe	0,491164	11,5763	23,57
Irr	P3787	+Fe	0,99548	9,46831	9,51
Irr	P3787	+Fe	0,987359	8,86569	8,98
Irr	P3787	+Fe	1,11826	8,67502	7,76
Irr	P3787 T	-Fe	0,299208	1,82199	6,09
Irr	P3787 T	-Fe	0,283533	2,11589	7,46
Irr	P3787 T	-Fe	0,438325	2,90123	6,62
Irr	P3787 T	+Fe	1,20999	6,97518	5,76
Irr	P3787 T	+Fe	1,22248	6,11775	5,00
Irr	P3787 T	+Fe	1,19611	6,19671	5,18
RirA	pOT1	-Fe	0,302976	1,01166	3,34
RirA	pOT1	-Fe	0,336808	1,20347	3,57
RirA	pOT1	-Fe	0,313169	1,06424	3,40
RirA	pOT1	+Fe	0,45624	1,45878	3,20
RirA	pOT1	+Fe	0,45917	1,53593	3,35
RirA	pOT1	+Fe	0,5101	1,55874	3,06
RirA	P3787	-Fe	0,445151	5,52418	12,41
RirA	P3787	-Fe	0,499714	5,59914	11,20
RirA	P3787	-Fe	0,644819	7,97685	12,37
RirA	P3787	+Fe	0,726446	7,95075	10,94
RirA	P3787	+Fe	0,797361	8,22373	10,31
RirA	P3787	+Fe	0,752742	7,59111	10,08
RirA	P3787 T	-Fe	0,32748	12,6076	38,50
RirA	P3787 T	-Fe	0,339635	12,2013	35,92
RirA	P3787 T	-Fe	0,372493	15,0261	40,34
RirA	P3787 T	+Fe	0,421746	15,66	37,13
RirA	P3787 T	+Fe	0,445784	17,4337	39,11
RirA	P3787 T	+Fe	0,384377	16,5863	43,15
Irr/RirA	pOT1	-Fe	0,326294	1,11363	3,41

Irr/RirA	pOT1	-Fe	0,285934	0,955827	3,34
Irr/RirA	pOT1	-Fe	0,343295	1,08354	3,16
Irr/RirA	pOT1	+Fe	0,377054	1,37968	3,66
Irr/RirA	pOT1	+Fe	0,370272	1,42706	3,85
Irr/RirA	pOT1	+Fe	0,369513	1,54789	4,19
Irr/RirA	P3787	-Fe	0,530674	35,9962	67,83
Irr/RirA	P3787	-Fe	0,62134	41,1994	66,31
Irr/RirA	P3787	-Fe	0,497085	32,0822	64,54
Irr/RirA	P3787	+Fe	0,991238	53,739	54,21
Irr/RirA	P3787	+Fe	1,054	46,1263	43,76
Irr/RirA	P3787	+Fe	0,569637	27,9283	49,03
Irr/RirA	P3787 T	-Fe	0,219036	4,09715	18,71
Irr/RirA	P3787 T	-Fe	0,29872	5,79795	19,41
Irr/RirA	P3787 T	-Fe	0,307863	5,62897	18,28
Irr/RirA	P3787 T	+Fe	0,598946	9,48425	15,83
Irr/RirA	P3787 T	+Fe	0,314771	5,55054	17,63
Irr/RirA	P3787 T	+Fe	0,2479	3,88387	15,67

Anexo VI

Datos de cuantificaciones de fluorescencia mediante citometría de flujo

Fig. 57: Citometría de flujo de células de *S. meliloti* 1021 pOT1

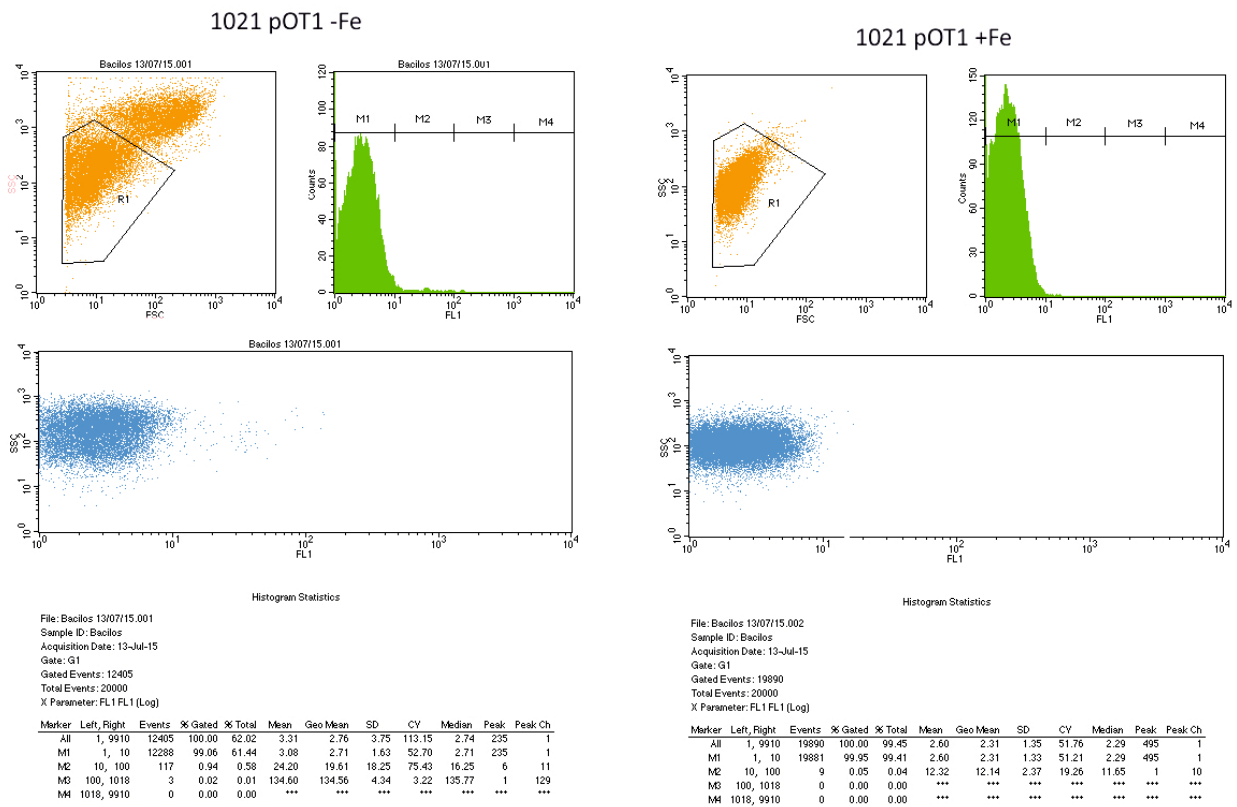


Fig. 58: Citometría de flujo de células de *S. meliloti* 1021 pOT1 P3787

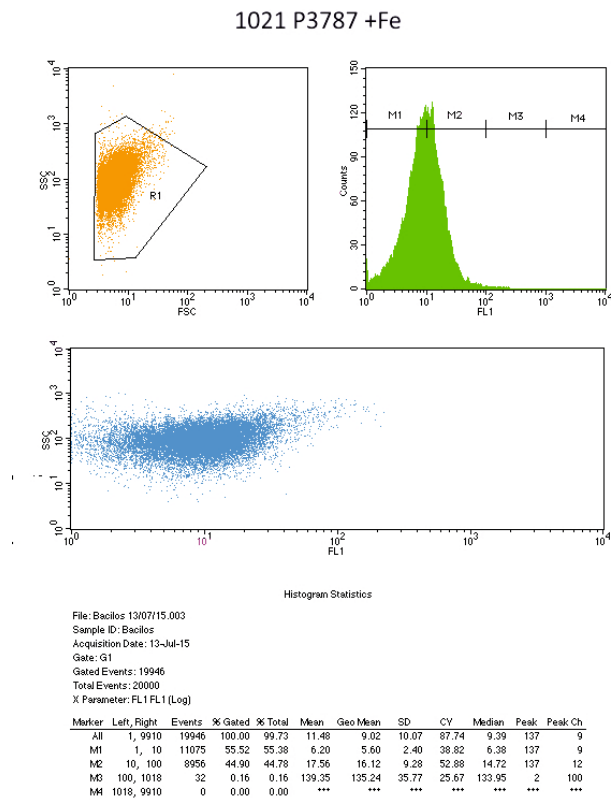


Fig. 59: Citometría de flujo de células de *S. meliloti* 1021 pOT1 P3787 T

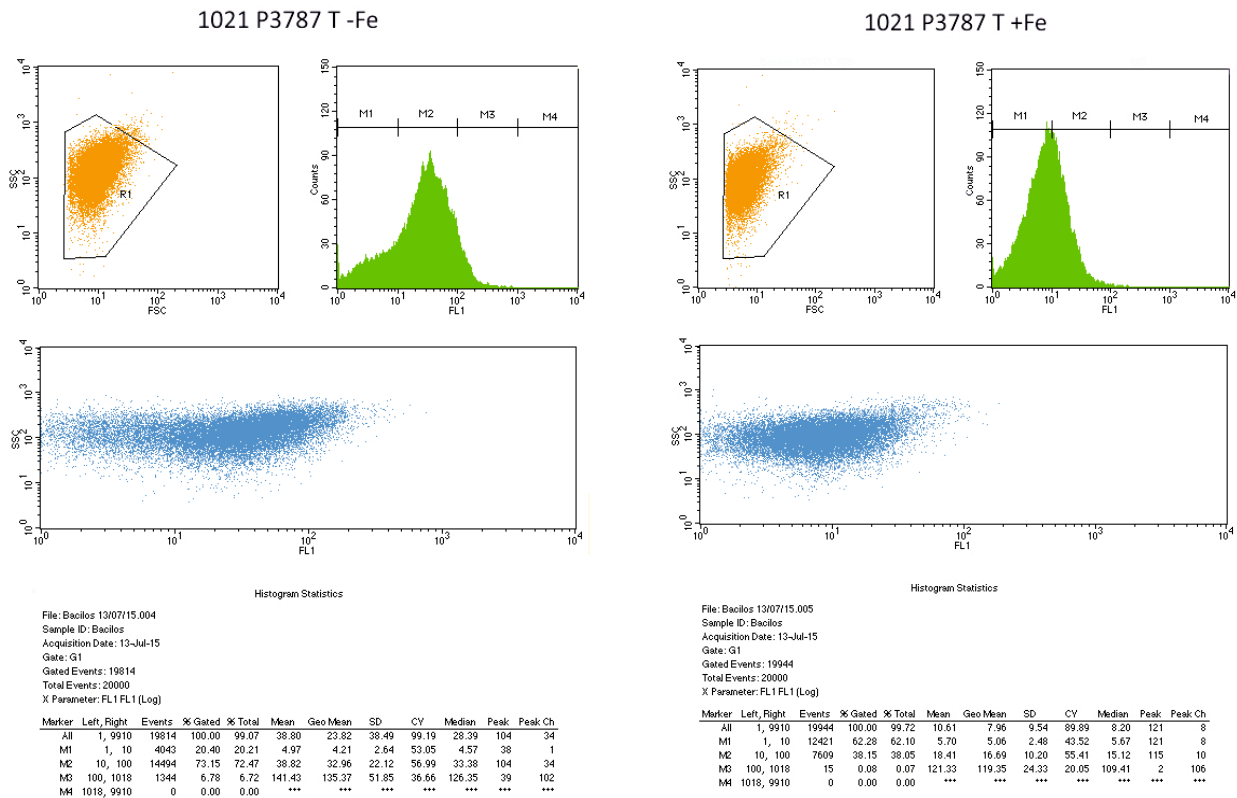


Fig. 60: Citometría de flujo de células de *S. meliloti* 1021 Irr pOT1

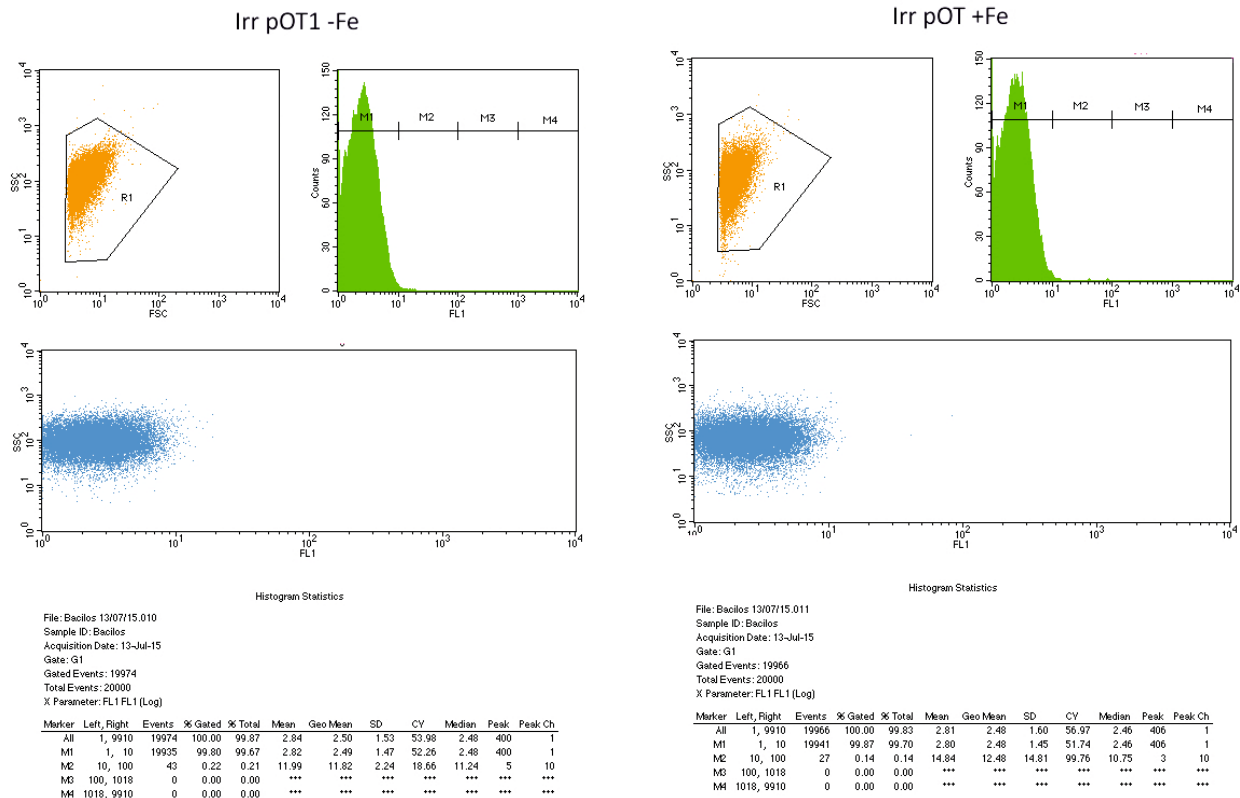


Fig. 61: Citometría de flujo de células de *S. meliloti* 1021 Irr pOT1 P3787

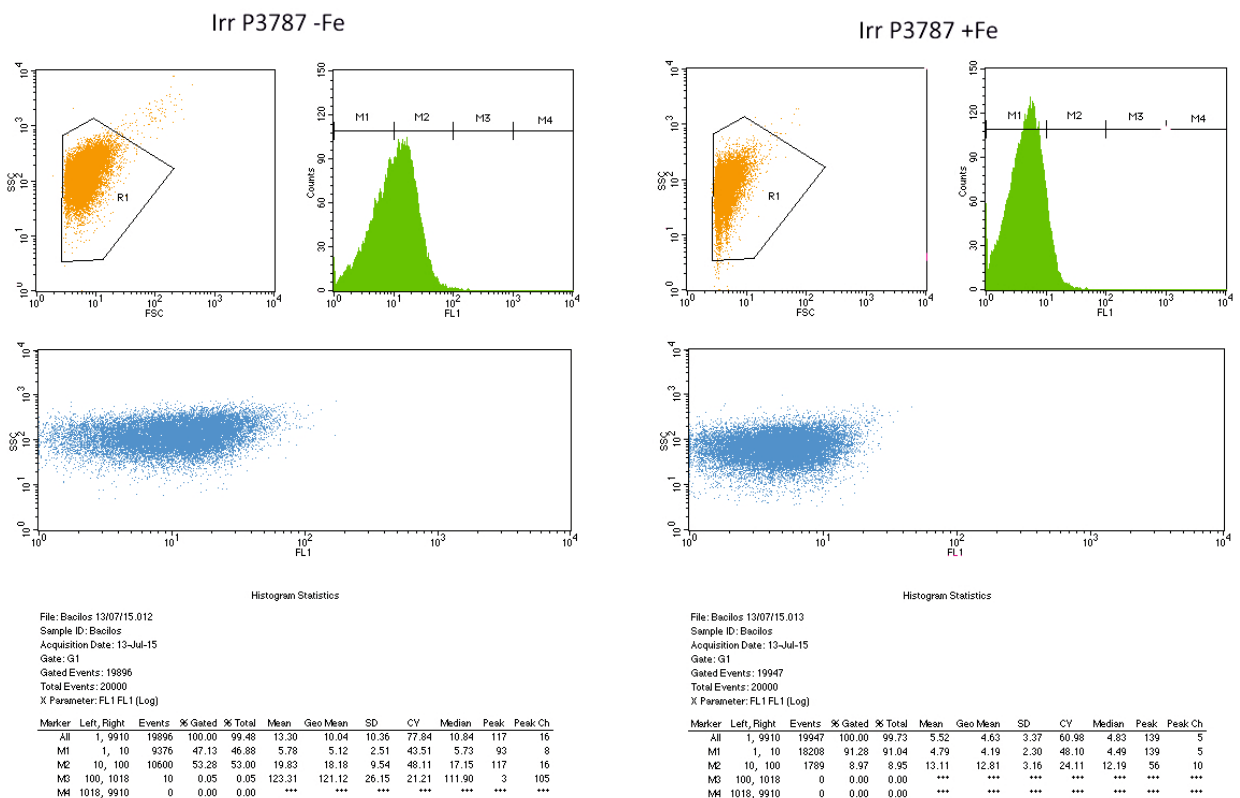


Fig. 62: Citometría de flujo de células de *S. meliloti* 1021 Irr pOT1 P3787 T

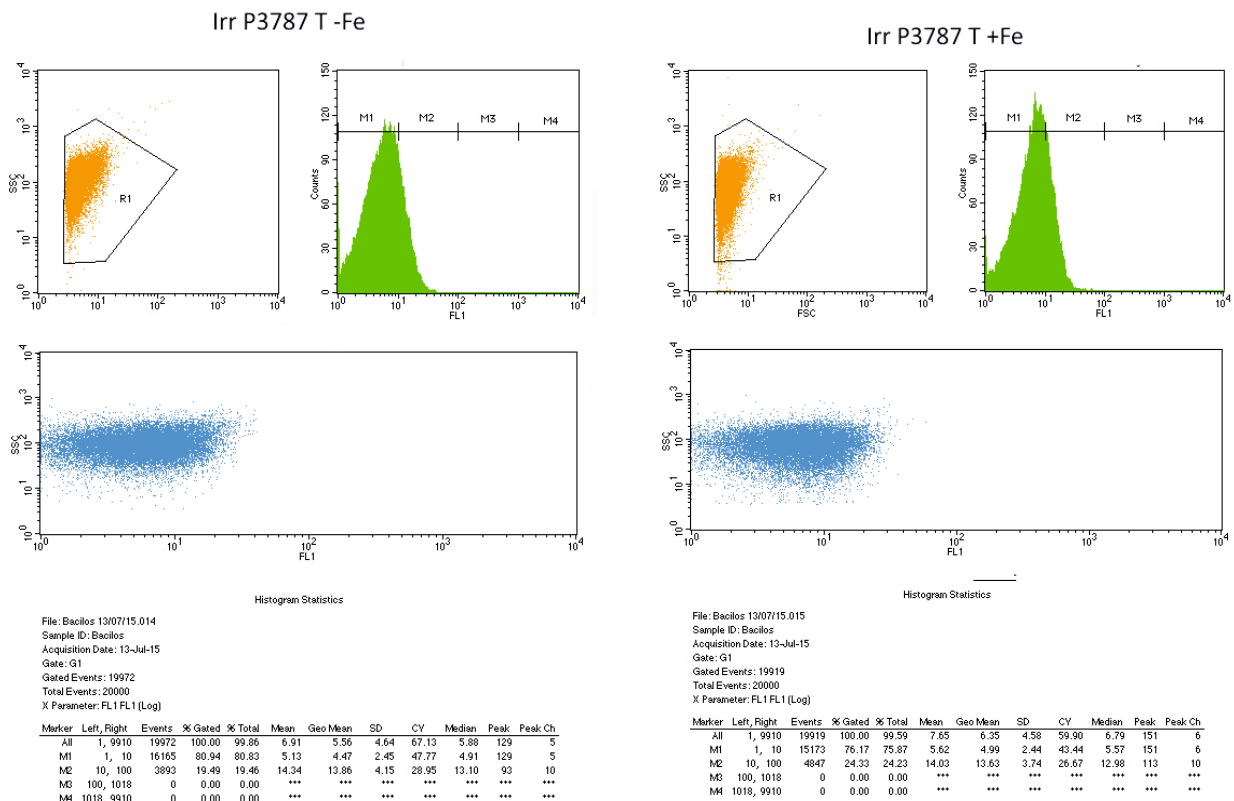


Fig. 63: Citometría de flujo de células de *S. meliloti* 1021 RirA pOT1

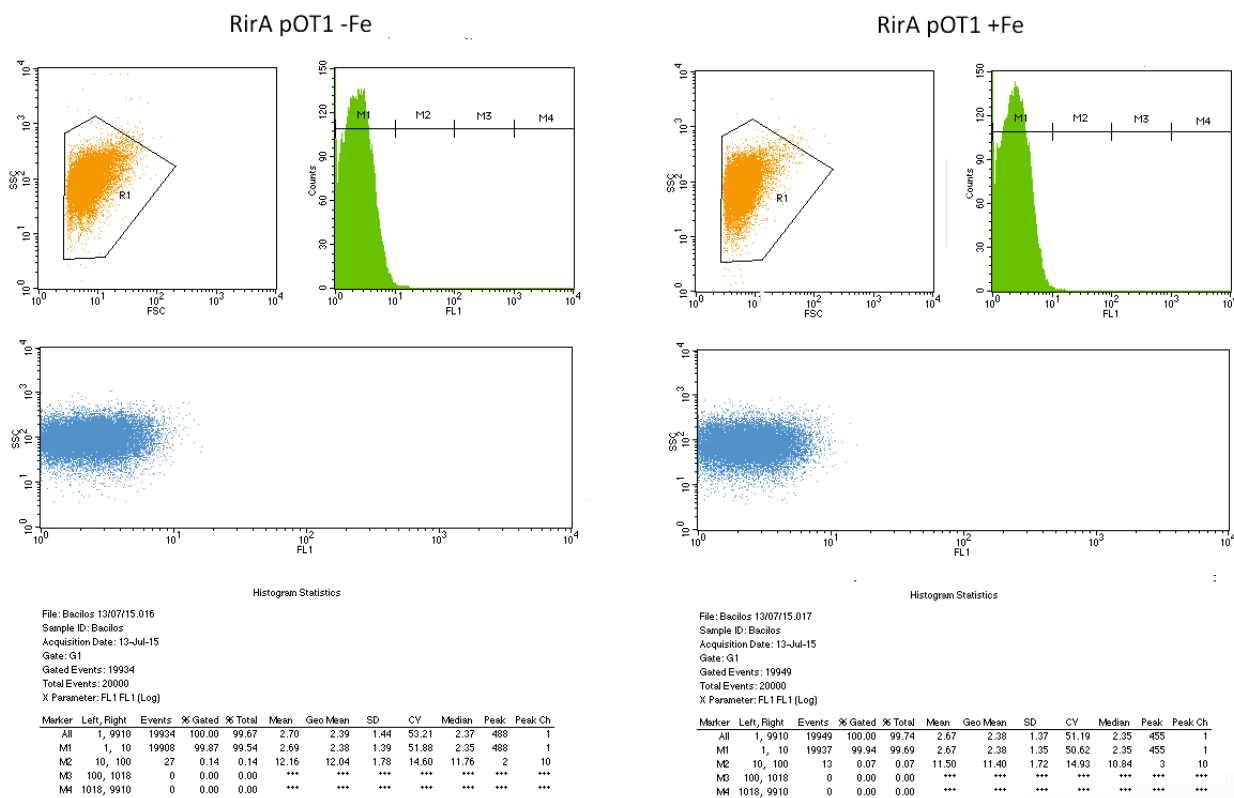


Fig. 64: Citometría de flujo de células de *S. meliloti* 1021 RirA pOT1 P3787

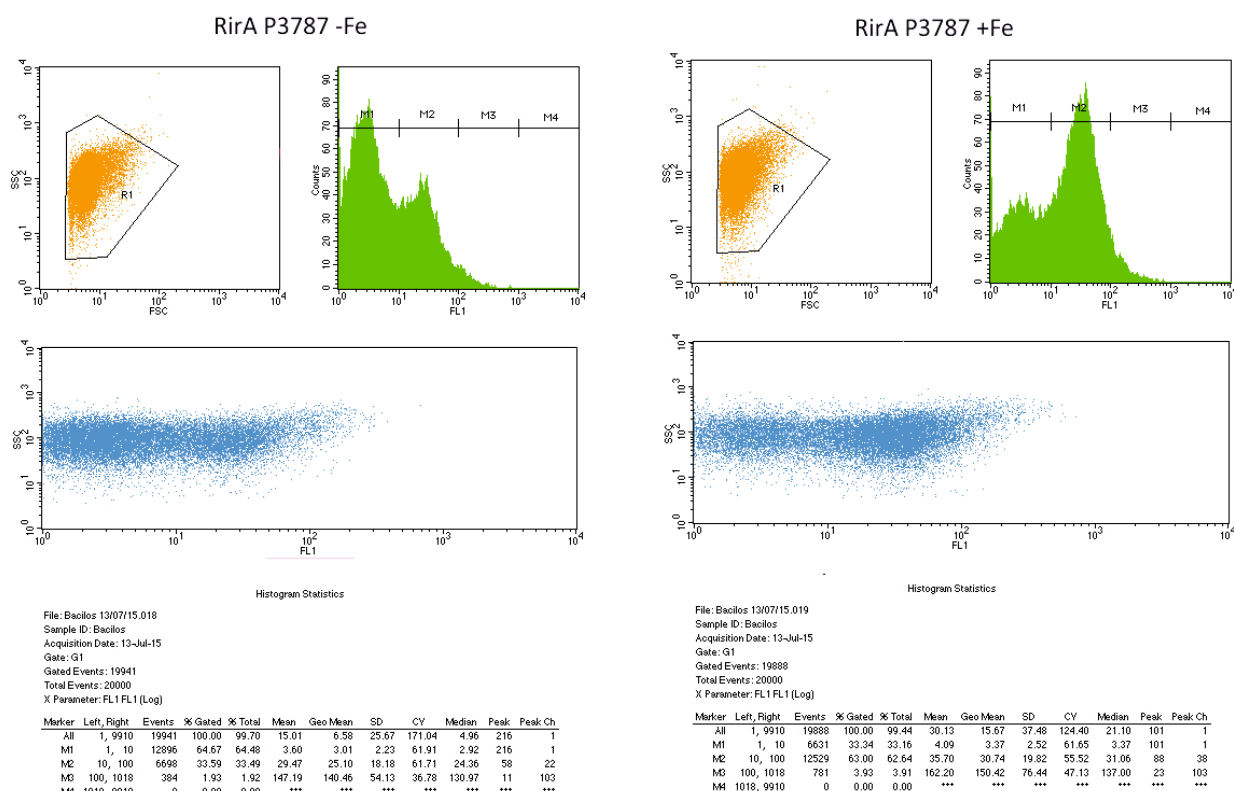


Fig. 65: Citometría de flujo de células de *S. meliloti* 1021 RirA pOT1 P3787 T

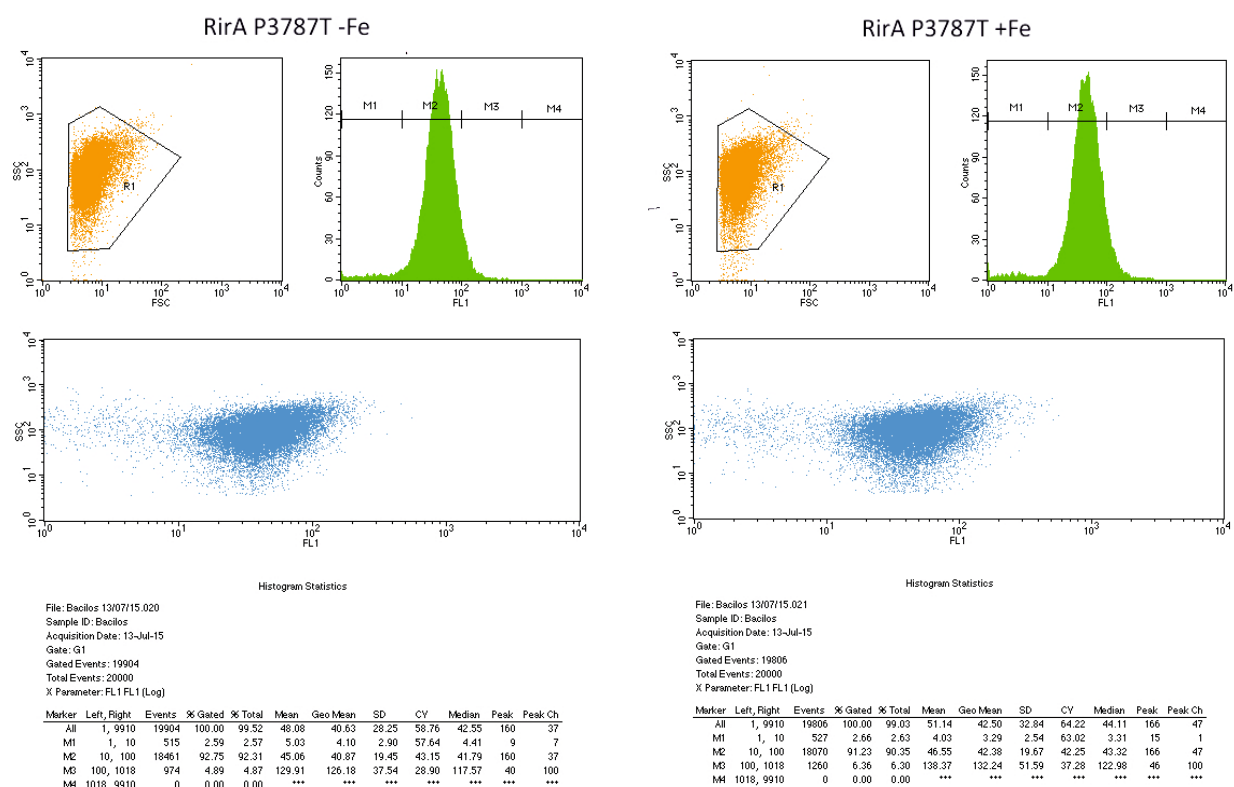


Fig. 66: Citometría de flujo de células de *S. meliloti* 1021 Irr RirA pOT1

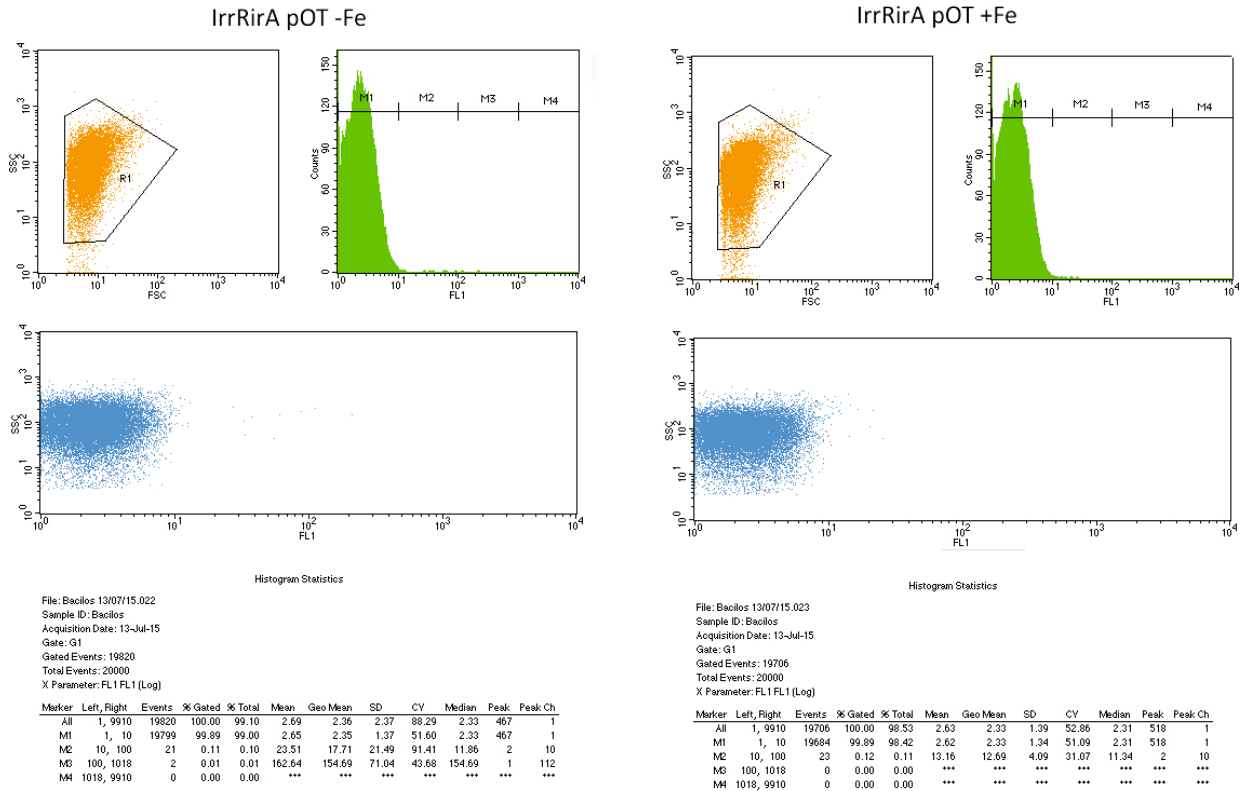


Fig. 67: Citometría de flujo de células de *S. meliloti* 1021 Irr RirA pOT1 P3787

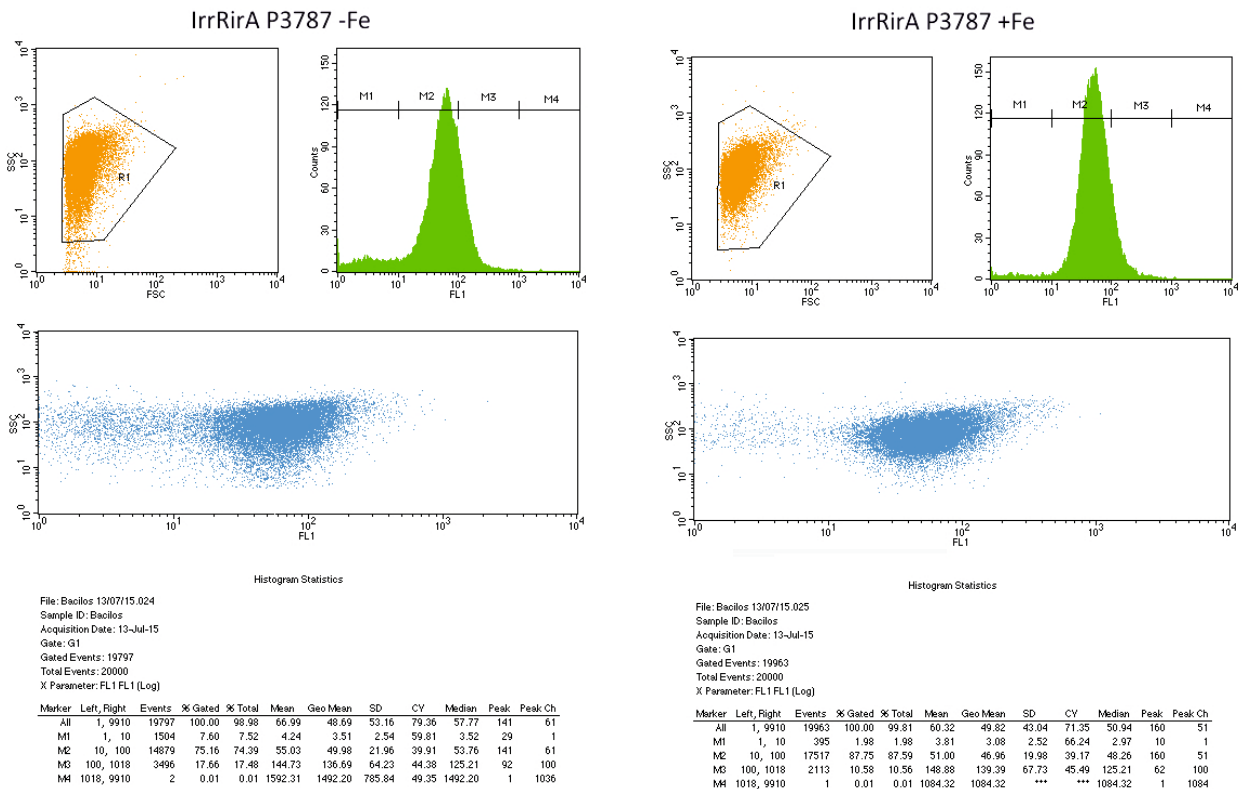


Fig. 68: Citometría de flujo de células de *S. meliloti* 1021 Irr RirA pOT1 P3787 T

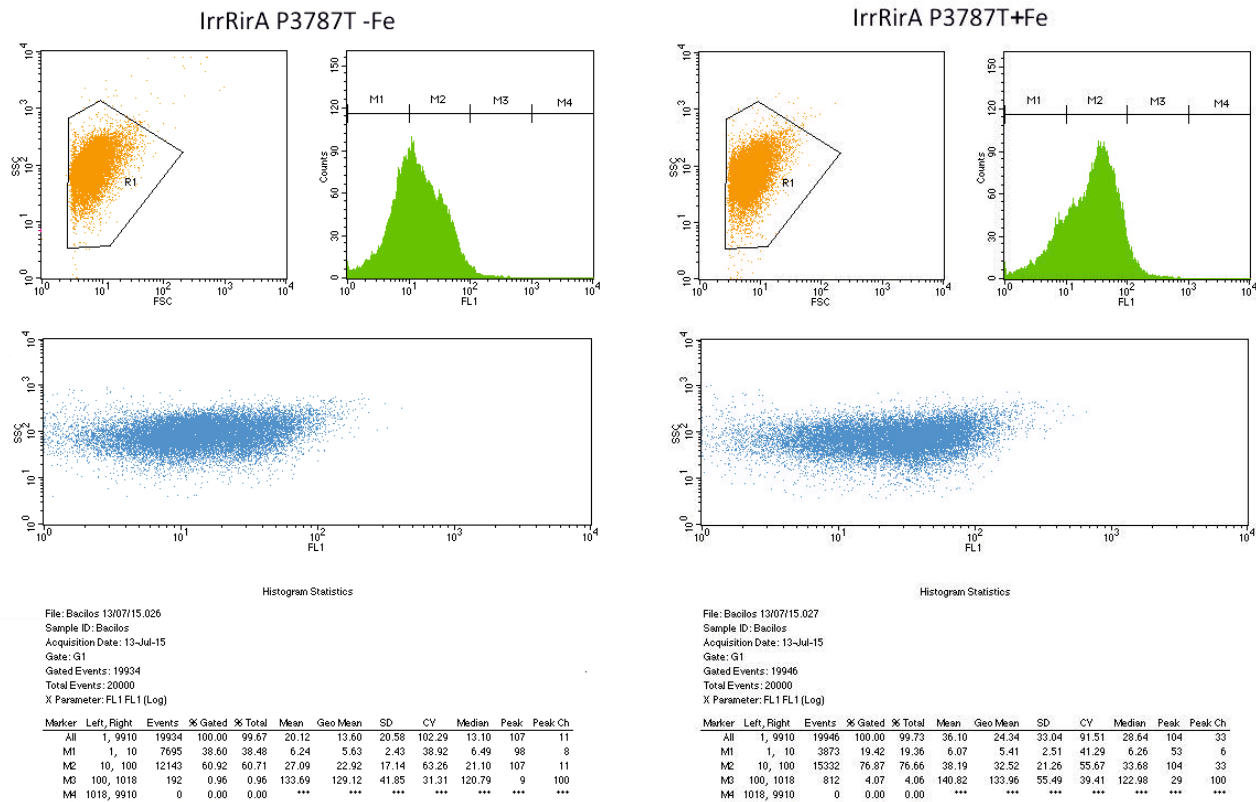


Tabla 16: Análisis de las emisiones de fluorescencia mediante citometría de flujo por segmento

Contexto génico	Construcción	Condición	Segmento	Número de eventos	Porcentaje del total	F media	SD
W	P3787	+Fe	M1	11075	55,52	6,2	2,4
			M2	8956	44,9	17,56	9,28
			M3	32	0,16	139,35	35,77
	P3787 Trad	-Fe	M1	4043	20,4	4,97	2,64
			M2	14494	73,15	38,82	22,12
			M3	1344	6,78	141,43	51,85
		+Fe	M1	12421	62,28	5,7	2,48
			M2	7609	38,15	18,41	10,2
			M3	15	0,08	121,33	24,33
I	P3787	-Fe	M1	9376	47,13	5,78	2,51
			M2	10600	53,28	19,83	9,54
			M3	10	0,05	123,31	26,15
		+Fe	M1	18208	91,28	4,79	2,3
			M2	1789	8,97	13,11	3,16
	P3787 Trad	-Fe	M1	16165	80,94	5,13	2,45
			M2	3893	19,49	14,34	4,15
		+Fe	M1	15173	76,17	5,62	2,44
			M2	4847	24,33	14,03	3,74
R	P3787	-Fe	M1	12896	64,67	3,6	2,23
			M2	66908	33,59	28,47	18,18
			M3	384	1,93	147,19	54,13
		+Fe	M1	6631	33,38	4,09	2,52
			M2	12529	63	35,7	19,82
			M3	781	3,93	162,2	76,44
	P3787 Trad	-Fe	M1	515	2,59	5,03	2,9
			M2	18461	92,75	45,06	19,45
			M3	974	4,89	129,91	37,54
	+Fe	M1	527	2,66	4,02	2,54	
		M2	18070	91,23	46,55	19,67	
		M3	1260	6,3	138,37	51,59	
IR	P3787	-Fe	M1	1504	7,6	4,24	2,54
			M2	14879	75,16	55,03	21,96
			M3	3496	17,66	144,73	64,23
			M4	2	0,01	1592,31	785,84
		+Fe	M1	395	1,98	3,81	2,52
			M2	17517	87,75	51	19,98
			M3	2113	10,58	148,88	67,73
			M4	1	0,01	1084,32	-
	P3787 Trad	-Fe	M1	7695	38,6	6,24	2,43
			M2	12143	60,92	27,09	17,14
			M3	192	0,96	133,69	41,85
		+Fe	M1	3873	19,42	6,07	2,51
			M2	15332	76,87	38,19	21,26
			M3	812	4,07	140,82	55,49

Bibliografía

1. **Young JPW, Haukka KE.** 1996. Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytol* **133**:87-94.
2. **Weir BS.** 2012. The current taxonomy of rhizobia | NZ Rhizobia.
3. **Galloway JN, Dentener FJ, Capone DG, Boyer EW, Howarth RW, Seitzinger SP, Asner GP, Cleveland CC, Green PA, Holland EA, Karl DM, Michaels AF, Porter JH, Townsend AR, Vörösmarty CJ.** 2004. Nitrogen Cycles: Past, Present, and Future. *Biogeochemistry* **70**:153-226.
4. **Leigh GJ.** 1971. Abiological fixation of molecular nitrogen. *Chem Biochem nitrogen Fixat* **19**.
5. **Rees DC, Akif Tezcan F, Haynes CA, Walton MY, Andrade S, Einsle O, Howard JB.** 2005. Structural basis of biological nitrogen fixation. *Philos Trans R Soc A Math Phys Eng Sci* **363**:971-984.
6. **Monza J, Márquez A.** 2004. El Metabolismo del nitrógeno en las plantas Agricultura y ganadería. Colección Agricultura y Ganadería Almuzara.
7. **Hu Y, Ribbe MW.** 2011. Biosynthesis of the Metalloclusters of Molybdenum Nitrogenase. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**:664-677.
8. **Gallon JR.** 1981. The oxygen sensitivity of nitrogenase: a problem for biochemists and micro-organisms. *Trends Biochem Sci* **6**:19-23.
9. **Dixon R, Kahn D.** 2004. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat Rev Microbiol* **2**:621-31.
10. **Fred EB, Baldwin IL, McCoy E, Starkey RL.** 1933. Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants. *Soil Sci* **35**.
11. **Jordan DC.** 1982. NOTES: Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a Genus of Slow-Growing, Root Nodule Bacteria from Leguminous Plants. *Int J Syst Bacteriol* **32**:136-139.
12. **Kuykendall LD, Kerr A, Young JM, Martínez-Romero E, Sawada H.** 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*,. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**:89-103.
13. **Moulin L, Munive A, Dreyfus B, Boivin-Masson C.** 2001. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature* **411**:948-50.
14. **Young JM.** 2010. Sinorhizobium versus Ensifer: may a taxonomy subcommittee of the ICSP contradict the Judicial Commission? *Int J Syst Evol Microbiol* **60**:1711-1713.

15. **Badri D V., Weir TL, van der Lelie D, Vivanco JM.** 2009. Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Curr Opin Biotechnol* **20**:642-50.
16. **Cooper JE.** 2007. Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *J Appl Microbiol* **103**:1355-65.
17. **Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X, Batut J.** 2009. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol* **17**:458-466.
18. **Van Rhijn P, Vanderleyden J.** 1995. The Rhizobium-plant symbiosis. *Microbiol Rev* **59**:124-142.
19. **Jones KM, Kobayashi H, Davies BW, Taga ME, Walker GC.** 2007. How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium–Medicago model. *Nat Rev Microbiol* **5**:619-633.
20. **Guerinot ML.** 1991. Iron uptake and metabolism in the rhizobia / legume symbioses*. *Plant Soil* 199-209.
21. **Puppo A, Groten K, Bastian F, Carzaniga R, Soussi M, Lucas MM, De Felipe MR, Harrison J, Vanacker H, Foyer CH.** 2004. Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytol* **165**:683-701.
22. **Andrews SC, Robinson AK, Rodríguez-Quñones F.** 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**:215-237.
23. **Archibald F.** 1983. *Lactobacillus plantarum* , an organism not requiring iron. *FEMS Microbiol Lett* **19**:29-32.
24. **Kosman DJ.** 2013. Iron metabolism in aerobes: managing ferric iron hydrolysis and ferrous iron autoxidation. *Coord Chem Rev* **257**:210-217.
25. **Pierre JL, Fontecave M, Crichton RR.** 2002. Chemistry for an essential biological process: the reduction of ferric iron. *Biometals* **15**:341-6.
26. **Storz G, Tartaglia LA, Farr SB, Ames BN.** 1990. Bacterial defenses against oxidative stress. *Trends Genet* **6**:363-368.
27. **Luo Y, Han Z, Chin SM, Linn S.** 1994. Three chemically distinct types of oxidants formed by iron-mediated Fenton reactions in the presence of DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:12438-42.
28. **Battistoni F, Platero R, Noya F, Arias A, Fabiano E.** 2002. Intracellular Fe content influences nodulation competitiveness of Sinorhizobium meliloti strains as inocula of alfalfa. *Soil Biol Biochem* **34**:593-597.
29. **Becker A, Bergès H, Krol E, Bruand C, Rüberg S, Capela D, Lauber E, Meilhoc E, Ampe F, de Bruijn FJ, Fourment J, Francez-Charlot A, Kahn D, Küster H, Liebe C, Pühler A, Weidner S, Batut J.** 2004. Global changes in gene expression in Sinorhizobium meliloti 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Mol Plant Microbe Interact* **17**:292-303.

30. **Ragland M, Theil EC.** 1993. Ferritin (mRNA, protein) and iron concentrations during soybean nodule development. *Plant Mol Biol* **21**:555-560.
31. **Rodríguez-Haas B, Finney L, Vogt S, González-Melendi P, Imperial J, González-Guerrero M.** 2013. Iron distribution through the developmental stages of *Medicago truncatula* nodules. *Metallomics* **5**:1247-53.
32. **Hibbing ME, Fuqua C.** 2011. Antiparallel and interlinked control of cellular iron levels by the *Irr* and *RirA* regulators of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **193**:3461-3472.
33. **Ngok-Ngam P, Ruangkiattikul N, Mahavithakanont A, Virgem SS, Sukchawalit R, Mongkolsuk S.** 2009. Roles of *Agrobacterium tumefaciens* *RirA* in iron regulation, oxidative stress response, and virulence. *J Bacteriol* **191**:2083-90.
34. **Chao T, Buhrmester J, Hansmeier N, Pu A, Weidner S, Pühler A, Weidner S.** 2005. Role of the Regulatory Gene *rirA* in the Transcriptional Response of *Sinorhizobium meliloti* to Iron Limitation. *Appl Environ Microbiol* **71**:5969-5982.
35. **Cuív PÓ, Clarke P, Lynch D, O'Connell M.** 2004. Identification of *rhtX* and *fptX*, Novel Genes Encoding Proteins That Show Homology and Function in the Utilization of the Siderophores Rhizobactin 1021 by *Sinorhizobium meliloti* and Pyochelin by *Pseudomonas aeruginosa*, Respectively. *J Bacteriol* **186**:2996-3005.
36. **Carter RA, Worsley P, Sawers G, Challis GL, Dilworth MJ, Carson KC, Lawrence J, Wexler M, Johnston AWB, Yeoman KH.** 2002. The *vbs* genes that direct synthesis of the siderophore vicibactin in *Rhizobium leguminosarum*: their expression in other genera requires ECF σ factor Rpol. *Mol Microbiol* **44**:1153-1166.
37. **Wandersman C, Delepelaire P.** 2004. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol* **58**:611-647.
38. **Fabiano E, O'Brian MR.** 2012. Mechanisms and regulation of iron homeostasis in the rhizobia, p. 41-75. *En Expert, D, O'Brian, MR (eds.), Molecular Aspects of Iron Metabolism in Pathogenic and Symbiotic Plant-Microbe Associations.* Springer Netherlands, Dordrecht.
39. **Platero R, Jaureguy M, Battistoni F, Fabiano E.** 2003. Mutations in *sit B* and *sit D* genes affect manganese-growth requirements in *Sinorhizobium meliloti*. *FEMS Microbiol Lett* **218**:65-70.
40. **Andrews SC, Norton I, Salunkhe AS, Goodluck H, Aly WSM, Mourad-Agha H, Cornelis P.** 2013. *Metallomics and the Cell*. Springer Netherlands, Dordrecht.
41. **Rodionov DA, Gelfand MS, Todd JD, Curson ARJ, Johnston AWB.** 2006. Computational reconstruction of iron- and manganese-responsive transcriptional networks in alpha-proteobacteria. *PLoS Comput Biol* **2**:e163.
42. **Miethke M.** 2013. Molecular strategies of microbial iron assimilation: from high-affinity complexes to cofactor assembly systems. *Metallomics* **5**:15-28.

43. **Crichton RR, Boelaert JR, Braun V, Hantke K, Marx JJM, Santos M, Ward R.** 2001. Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism: From Molecular Mechanisms to Clinical Consequences. John Wiley & Sons.
44. **Lynch D, O'Brien J, Welch T, Clarke P, Cuív PÓ, Crosa JH, O'Connell M.** 2001. Genetic organization of the region encoding regulation, biosynthesis, and transport of rhizobactin 1021, a siderophore produced by *Sinorhizobium meliloti*. J Bacteriol **183**:2576-2585.
45. **Donadio S, Monciardini P, Sosio M.** 2007. Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics. Nat Prod Rep **24**:1073.
46. **Noya F, Arias A, Fabiano E.** 1997. Heme compounds as iron sources for nonpathogenic *Rhizobium* bacteria. J Bacteriol **179**:3076-3078.
47. **Cescau S, Cwerman H, Létoffé S, Delepelaire P, Wandersman C, Biville F.** 2007. Heme acquisition by hemophores. BioMetals **20**:603-613.
48. **Briat J-F.** 1992. Review Article Iron assimilation and storage in prokaryotes 2475-2483.
49. **Le Brun NE, Crow A, Murphy MEP, Mauk AG, Moore GR.** 2010. Iron core mineralisation in prokaryotic ferritins. Biochim Biophys Acta - Gen Subj **1800**:732-744.
50. **Cornelis P, Andrews SC.** 2010. Iron Uptake and Homeostasis in Microorganisms. Caister Academic Press.
51. **Andrews SC.** 1998. Iron storage in bacteria. Advances in microbial physiology.
52. **Calhoun LN, Kwon YM.** 2011. Structure, function and regulation of the DNA-binding protein Dps and its role in acid and oxidative stress resistance in *Escherichia coli*: a review. J Appl Microbiol **110**:375-86.
53. **Andrews SC.** 2010. The Ferritin-like superfamily: Evolution of the biological iron storeman from a rubrerythrin-like ancestor. Biochim Biophys Acta - Gen Subj **1800**:691-705.
54. **Pena MMO, Bullerjahn GS.** 1995. The DpsA Protein of *Synechococcus* sp. Strain PCC7942 Is a DNA-binding Hemoprotein: LINKAGE OF THE Dps AND BACTERIOFERRITIN PROTEIN FAMILIES. J Biol Chem **270**:22478-22482.
55. **Chiancone E, Ceci P.** 2010. The multifaceted capacity of Dps proteins to combat bacterial stress conditions: Detoxification of iron and hydrogen peroxide and DNA binding. Biochim Biophys Acta - Gen Subj **1800**:798-805.
56. **Crichton RR, Declercq J-P.** 2010. X-ray structures of ferritins and related proteins. Biochim Biophys Acta **1800**:706-18.
57. **Ebrahimi KH, Hagedoorn P-L, Hagen WR.** 2015. Unity in the biochemistry of the iron-storage proteins ferritin and bacterioferritin. Chem Rev **115**:295-326.
58. **Crichton RR, Declercq JP.** 2010. X-ray structures of ferritins and related proteins. Biochim Biophys Acta - Gen Subj **1800**:706-718.

59. **Smith JL.** 2004. The physiological role of ferritin-like compounds in bacteria. *Crit Rev Microbiol* **30**:173-185.
60. **Pfaffen S, Abdulqadir R, Le Brun NE, Murphy MEP.** 2013. Mechanism of Ferrous Iron Binding and Oxidation by Ferritin from a Pennate Diatom. *J Biol Chem* **288**:14917-14925.
61. **Wai SN, Nakayama K, Umene K, Moriya T, Amako K.** 1996. Construction of a ferritin-deficient mutant of *Campylobacter jejuni*: contribution of ferritin to iron storage and protection against oxidative stress. *Mol Microbiol* **20**:1127-1134.
62. **Ratnayake DB, Wai SN, Shi Y, Amako K, Nakayama H, Nakayama K.** 2000. Ferritin from the obligate anaerobe *Porphyromonas gingivalis*: purification, gene cloning and mutant studies. *Microbiology* **146** (Pt 5):1119-27.
63. **Waidner B, Greiner S, Odenbreit S, Kavermann H, Velayudhan J, Stähler F, Guhl J, Bissé E, Van Vliet AHM, Andrews SC, Kusters JG, Kelly DJ, Haas R, Kist M, Bereswill S.** 2002. Essential role of ferritin Pfr in *Helicobacter pylori* iron metabolism and gastric colonization. *Infect Immun* **70**:3923-3929.
64. **Abdul-Tehrani H, Hudson AJ, Chang YS, Timms AR, Hawkins C, Williams JM, Harrison PM, Guest JR, Andrews SC.** 1999. Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and fur mutants are iron deficient. *J Bacteriol* **181**:1415-1428.
65. **Ceci P, Cellai S, Falvo E, Rivetti C, Rossi GL, Chiancone E.** 2004. DNA condensation and self-aggregation of *Escherichia coli* Dps are coupled phenomena related to the properties of the N-terminus. *Nucleic Acids Res* **32**:5935-44.
66. **Kwak Y, Schwartz JK, Huang VW, Boice E, Kurtz DM, Solomon EI.** 2015. CD/MCD/VTXH-MCD Studies of *Escherichia coli* Bacterioferritin Support a Binuclear Iron Cofactor Site. *Biochemistry* **54**:7010-7018.
67. **Bradley JM, Moore GR, Le Brun NE.** 2014. Mechanisms of iron mineralization in ferritins: one size does not fit all. *J Biol Inorg Chem* **19**:775-85.
68. **Crow A, Lawson TL, Lewin A, Moore GR, Le Brun NE.** 2009. Structural basis for iron mineralization by bacterioferritin. *J Am Chem Soc* **131**:6808-13.
69. **Wong SG, Grigg JC, Le Brun NE, Moore GR, Murphy MEP, Mauk AG.** 2015. The B-type channel is a major route for iron entry into the ferroxidase center and central cavity of bacterioferritin. *J Biol Chem* **290**:3732-9.
70. **Andrews SC, Le Brun NE, Barynin V, Thomson AJ, Moore GR, Guest JR, Harrison PM.** 1995. Site-directed Replacement of the Coaxial Heme Ligands of Bacterioferritin Generates Heme-free Variants. *J Biol Chem* **270**:23268-23274.
71. **Yasmin S, Andrews SC, Moore GR, Le Brun NE.** 2011. A new role for heme, facilitating release of iron from the bacterioferritin iron biomineral. *J Biol Chem* **286**:3473-3483.
72. **Weeratunga SK, Gee CE, Lovell S, Zeng Y, Woodin CL, Rivera M.** 2009. Binding of *Pseudomonas aeruginosa* Apo-Bacterioferritin Associated Ferredoxin to Bacterioferritin

B Promotes Heme Mediation of Electron Delivery and Mobilization of Core Mineral Iron. *Biochemistry* **11**:7420-7431.

73. **Yao H, Wang Y, Lovell S, Kumar R, Ruvinsky AM, Battaile KP, Vakser IA, Rivera M.** 2012. The structure of the BfrB-Bfd complex reveals protein-protein interactions enabling iron release from bacterioferritin. *Changes* **29**:997-1003.
74. **Wang Y, Yao H, Cheng Y, Lovell S, Battaile KP, Midaugh CR, Rivera M.** 2015. Characterization of the Bacterioferritin/Bacterioferritin Associated Ferredoxin Protein-Protein Interaction in Solution and Determination of Binding Energy Hot Spots. *Biochemistry* **54**:6162-75.
75. **Quail MA, Jordan P, Grogan JM, Butt JN, Lutz M, Thomson AJ, Andrews SC, Guest JR.** 1996. Spectroscopic and voltammetric characterisation of the bacterioferritin-associated ferredoxin of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **229**:635-42.
76. **Keren N, Aurora R, Pakrasi HB.** 2004. Critical roles of bacterioferritins in iron storage and proliferation of cyanobacteria. *Plant Physiol* **135**:1666-1673.
77. **Almirón MA, Ugalde RA.** 2010. Iron homeostasis in *Brucella abortus*: The role of bacterioferritin. *J Microbiol* **48**:668-673.
78. **Reddy PV, Puri RV, Khera A, Tyagi AK.** 2012. Iron storage proteins are essential for the survival and pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis* in THP-1 macrophages and the guinea pig model of infection. *J Bacteriol* **194**:567-75.
79. **Velayudhan J, Castor M, Richardson A, Main-Hester KL, Fang FC.** 2007. The role of ferritins in the physiology of *Salmonella enterica* sv. Typhimurium: a unique role for ferritin B in iron-sulphur cluster repair and virulence. *Mol Microbiol* **63**:1495-507.
80. **Hantke K.** 1984. Cloning of the repressor protein gene of iron-regulated systems in *Escherichia coli* K12. *MGG Mol Gen Genet* **197**:337-341.
81. **Fillat MF.** 2014. The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: diversity and versatility of key transcriptional regulators. *Arch Biochem Biophys* **546**:41-52.
82. **Troxell B, Hassan HM.** 2013. Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Front Cell Infect Microbiol* **3**:59.
83. **Nandal A, Huggins CCO, Woodhall MR, McHugh JP, Rodríguez-Quñones F, Quail MA, GUEST JR, Andrews SC.** 2010. Induction of the ferritin gene (*ftnA*) of *Escherichia coli* by Fe 2 + – Fur is mediated by reversal of H-NS silencing and is RyhB independent **75**:637-657.
84. **Gilbreath JJ, West AL, Pich OQ, Carpenter BM, Michel S, Merrell DS.** 2012. Fur activates expression of the 2-oxoglutarate oxidoreductase genes (*oorDABC*) in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* **194**:6490-7.
85. **Platero R, Peixoto L, O'Brian MR, Fabiano E.** 2004. Fur is involved in manganese-dependent regulation of *mntA* (*sitA*) expression in *Sinorhizobium meliloti*. *Appl Environ Microbiol* **70**:4349-4355.

86. **Chao T, Becker A, Buhrmester J, Weidner S, Pu A.** 2004. The *Sinorhizobium meliloti* fur Gene Regulates , with Dependence on Mn (II), Transcription of the sitABCD Operon , Encoding a Metal-Type Transporter The *Sinorhizobium meliloti* fur Gene Regulates , with Dependence on Mn (II), Transcription of the sitABC. *J Bacteriol* **186**:3609-3620.
87. **Johnston AWB, Todd JD, Curson ARJ, Lei S, Nikolaidou-Katsaridou N, Gelfand MS, Rodionov DA.** 2007. Living without Fur: The subtlety and complexity of iron-responsive gene regulation in the symbiotic bacterium *Rhizobium* and other α -proteobacteria. *BioMetals* **20**:501-511.
88. **Rudolph G, Hennecke H, Fischer H-M.** 2006. Beyond the fur paradigm: Iron-controlled gene expression in rhizobia. *FEMS Microbiol Rev* **30**:631-648.
89. **Hamza I, Chauhan S, Hassett R, O'Brian MR.** 1998. The Bacterial Irr Protein Is Required for Coordination of Heme Biosynthesis with Iron Availability. *J Biol Chem* **273**:21669-21674.
90. **O'Brian MR.** 2015. Perception and Homeostatic Control of Iron in the Rhizobia and Related Bacteria. *Annu Rev Microbiol* **69**:229-245.
91. **Hamza I, Qi Z, King ND, O'Brian MR.** 2000. Fur-independent regulation of iron metabolism by Irr in *Bradyrhizobium japonicum*. *Microbiology* **146** (Pt 3):669-76.
92. **Wexler M, Todd JD, Kolade O, Bellini D, Hemmings AM, Sawers G, Johnston AWB.** 2003. Fur is not the global regulator of iron uptake genes in *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology* **149**:1357-1365.
93. **Martínez M, Ugalde RA, Almirón M.** 2005. Dimeric *Brucella abortus* Irr protein controls its own expression and binds haem. *Microbiology* **151**:3427-33.
94. **Yang J, Ishimori K, O'Brian MR.** 2005. Two heme binding sites are involved in the regulated degradation of the bacterial iron response regulator (Irr) protein. *J Biol Chem* **280**:7671-6.
95. **Singleton C, White GF, Todd JD, Marritt SJ, Cheesman MR, Johnston AWB, Le Brun NE.** 2010. Heme-responsive DNA binding by the global iron regulator Irr from *Rhizobium leguminosarum*. *J Biol Chem* **285**:16023-31.
96. **Rudolph G, Semini G, Hauser F, Lindemann A, Friberg M, Hennecke H, Fischer H-M.** 2006. The iron control element, acting in positive and negative control of iron-regulated *Bradyrhizobium japonicum* genes, is a target for the Irr protein. *J Bacteriol* **188**:733-744.
97. **Todd JD, Wexler M, Sawers G, Yeoman KH, Poole PS, Johnston AWB.** 2002. RirA, an iron-responsive regulator in the symbiotic bacterium *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology* **148**:4059-4071.
98. **Bhubhanil S, Niamyim P, Sukchawalit R, Mongkolsuk S.** 2014. Cysteine desulphurase-encoding gene *sufS2* is required for the repressor function of RirA and oxidative resistance in *Agrobacterium tumefaciens*. *Microbiology* **160**:79-90.

99. **Costa D.** 2011. Construcción de una mutante carente en bacterioferritina en *Sinorhizobium meliloti* 1021. Universidad de la República.
100. **Schlüter J-P, Reinkensmeier J, Barnett MJ, Lang C, Krol E, Giegerich R, Long SR, Becker A.** 2013. Global mapping of transcription start sites and promoter motifs in the symbiotic alpha-proteobacterium *Sinorhizobium meliloti* 1021. *BMC Genomics* **14**:156.
101. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** 1989. Molecular cloning. Cold spring harbor laboratory press New York.
102. **Beringer JE.** 1974. R Factor Transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* **84**:188-198.
103. **Meade HM, Long SR, Ruvkun GB, Brown SE, Ausubel FM.** 1982. Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J Bacteriol* **149**:114-122.
104. **Browning DF, Busby SJ.** 2004. The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat Rev Microbiol* **2**:57-65.
105. **Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A.** 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: Selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**:69-73.
106. **Allaway D, Schofield N a., Leonard ME, Gilardoni L, Finan TM, Poole PS.** 2001. Use of differential fluorescence induction and optical trapping to isolate environmentally induced genes. *Environ Microbiol* **3**:397-406.
107. 2001. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
108. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor laboratory press New York.
109. **Ditta G, Stanfield S, Corbin D, Helinski DR.** 1980. Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria : Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti* **77**.
110. **Miller JH.** 1972. Experiments in molecular genetics.
111. **Zhang X, Bremer H.** 1995. Control of the *Escherichia coli* rrnB P1 promoter strength by ppGpp. *J Biol Chem* **270**:11181-11189.
112. **Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW.** 2011. InfoStat. 24. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
113. **Becker A, Schmidt M, Jäger W, Pühler A.** 1995. New gentamicin-resistance and lacZ promoter-probe cassettes suitable for insertion mutagenesis and generation of transcriptional fusions. *Gene* **162**:37-39.

114. **Gay P, Le Coq D, Steinmetz M, Berkelman T, Kado CI.** 1985. Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **164**:918-921.
115. **Southern EM.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**:503-517.
116. **Pfaffl MW.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**:45e-45.
117. **Sangwan I, Small SK, O'Brian MR.** 2008. The Bradyrhizobium japonicum Irr protein is a transcriptional repressor with high-affinity DNA-binding activity. *J Bacteriol* **190**:5172-5177.
118. **Viguier C, Cuív PÓ, Clarke P, O'Connell M.** 2005. RirA is the iron response regulator of the rhizobactin 1021 biosynthesis and transport genes in Sinorhizobium meliloti 2011. *FEMS Microbiol Lett* **246**:235-242.
119. **Todd JD, Sawers G, Johnston AWB.** 2005. Proteomic analysis reveals the wide-ranging effects of the novel, iron-responsive regulator RirA in Rhizobium leguminosarum bv. viciae. *Mol Genet Genomics* **273**:197-206.
120. **Levine E, Zhang Z, Kuhlman T, Hwa T.** 2007. Quantitative characteristics of gene regulation by small RNA. *PLoS Biol* **5**:e229.
121. **Battistoni F, Platero R, Duran R, Cerveñansky C, Battistoni J, Arias A, Fabiano E.** 2002. Identification of an iron-regulated, hemin-binding outer membrane protein in Sinorhizobium meliloti. *Appl Environ Microbiol* **68**:5877-5881.
122. **Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC.** 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**:76-85.
123. **Carson KC, Holliday S, Glenn AR, Dilworth MJ.** 1992. Siderophore and organic acid production in root nodule bacteria. *Arch Microbiol* **157**:264-271.
124. 2012. *Molecular Aspects of Iron Metabolism in Pathogenic and Symbiotic Plant-Microbe Associations*. Springer Netherlands, Dordrecht.
125. **Anzaldi LL, Skaar EP.** 2010. Overcoming the heme paradox: Heme toxicity and tolerance in bacterial pathogens. *Infect Immun* **78**:4977-4989.
126. **Chen C-Y, Morse SA.** 1999. Neisseria gonorrhoeae bacterioferritin: structural heterogeneity, involvement in iron storage and protection against oxidative stress. *Microbiology* **145** (Pt 1):2967-75.
127. **Boughammoura A, Matzanke BF, Böttger L, Reverchon S, Lesuisse E, Expert D, Franza T.** 2008. Differential role of ferritins in iron metabolism and virulence of the plant-pathogenic bacterium Erwinia chrysanthemi 3937. *J Bacteriol* **190**:1518-1530.

128. **Sankari S, O'Brian MR.** 2014. A Bacterial Iron Exporter for Maintenance of Iron Homeostasis. *J Biol Chem* **289**:16498-16507.
129. **Lehman AP, Long SR.** 2013. Exopolysaccharides from *Sinorhizobium meliloti* can protect against H₂O₂-dependent damage. *J Bacteriol* **195**:5362-5369.
130. **Tavares F, Santos CL, Sellstedt A.** 2007. Reactive oxygen species in legume and actinorhizal nitrogen-fixing symbioses: the microsymbiont's responses to an unfriendly reception. *Physiol Plant* **130**:344-356.
131. **Schwartz W.** 2007. J. M. Vincent, A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria (IBP Handbuch No. 15 des International Biology Program, London). XI u. 164 S., 10 Abb., 17 Tab., 7 Taf. Oxford-Edinburgh 1970: Blackwell Scientific Publ., 45 s. *Z Allg Mikrobiol* **12**:440-440.
132. **Fadeev EA, Luo M, Groves JT.** 2005. Synthesis and structural modeling of the amphiphilic siderophore rhizobactin-1021 and its analogs. *Bioorg Med Chem Lett* **15**:3771-4.