

Sistemas de adquisición de hierro mediados por sideróforos en *Herbaspirillum seropedicae* Z67

PEDECIBA Biología, Tesis de doctorado

Federico Rosconi Hill

**Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable**

Tutores: Dra. Elena Fabiano

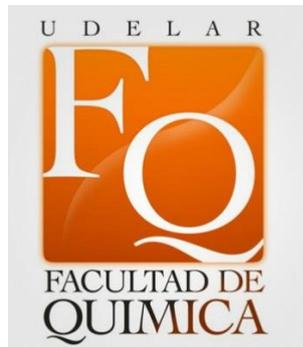
Q. F. Alicia Arias

Tribunal: Dr. Jorge Monza

Dra. Ana Fernández

Dr. Pablo Zunino





AGRADECIMIENTOS

Este trabajo nunca lo podría haber realizado sin el apoyo de tutores y colaboradores “no oficiales” que pusieron siempre sus ganas e interés en mi trabajo: Emanuel de Souza en Curitiba que nos abrió las puertas a más de un uruguayo en su departamento, Danilo Davyt que fue invaluable su aporte y conocimiento de química orgánica y su interés en las serobactinas, al personal del UByPA del Instituto Pasteur de Montevideo (Rosario y Madelón), el de la plataforma de HPLC del IIBCE (Juan Andrés y Marcela) y a Alison Butler que me recibió dos veces en su departamento y fue de muchísima ayuda para concretar el final de uno de los trabajos publicados. Obviamente que atrás de todos ellos hay un montón de estudiantes de sus grupos que me ayudaron tanto en la parte científica como en la social mientras estuve viviendo fuera del país.

Le doy muchísimas gracias a mi tutora Elena por su tutoría de estos años y su compañerismo y amistad, dentro y fuera del trabajo en viajes y salidas de campos. Y le agradezco a mí cotutora Alicia por la gauchada que nos hizo al principio de esta tesis y por ser Alicia.

¿Qué sería de mi vida en este laboratorio sin esa banda de gente que lo hace tan divertido durante la semana y varios fines de semana (a veces demasiados)? Y que supieron estar conmigo en momentos bien bravos. Montones de gracias a Vane, Rubia, Ceci Callejas, Batti, Rufo y aledaños ahora conocidos como *#previarancios1800ynosecuantomas*. ¡LOS QUIERO!!!!

A todo el resto del grupo, vamos arriba ¡BIOGEM!!!, en especial a Fernanda que me aguanta de tutor sin quejarse demasiado, ja. Y muchas gracias a todo LEM y MICROMOL, especialmente Susan que me metiste en este gallinero.

A mis padres, que aceptaron sin chistar que no fuera ni contador ni ingeniero, y hoy orgullosos le cuentan a todo el mundo que viajo por todos lados y esto y aquello y lo otro...mis hermanos Vero, Caro, Martín, mis sobrinos Lucas, Cata, Lu y Guille, ah, y Gero o Jero que todavía no llegó.

Y gracias a esos que entramos y seguimos juntos desde el principio de la facu, Majo, Checha, Gastón, Anagab, Silvia, Maite y las que están más lejos, Vale, Norah...<3.

Y a todos esos amigos fuera de la ciencia (¡qué necesarios que son!!!!) que siguen estando conmigo que no me dan las páginas para nombrarlos a todos y agradecerles, pero igual creo nunca van a hojear la tesis, jajajaja.

Tabla de contenidos

RESUMEN GENERAL	8
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL	11
Bacterias endófitas.....	11
Historia y definición	11
Aplicaciones biotecnológicas de los endófitos	13
Endófitos en la planta de arroz	17
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> : un endófito modelo	20
El género <i>Herbaspirillum</i>	20
Mecanismos de colonización e invasión del hospedero por <i>H.seropedicae</i>	21
El genoma de <i>H. seropedicae</i>	25
Fijación de nitrógeno en <i>H.seropedicae</i>	28
Sistemas de adquisición de hierro mediados por sideróforos	35
Importancia biológica del hierro.....	35
Sideróforos.....	36
Transporte y regulación de la biosíntesis de sideróforos	41
Otros aspectos de la biología de sideróforos.....	45
Participación de los sideróforos en las interacciones bacteria-hospedero	47
Péptidos de síntesis no ribosomal	50
Péptidos de biosíntesis no ribosomal	50
Bioinformática aplicada al estudio de NRPs	53
Objetivos	56
Objetivo general.....	56
Objetivos específicos.....	56
CAPÍTULO 2: BÚSQUEDA DE GENES IMPLICADOS EN LA ADQUISICIÓN DE HIERRO EN <i>H. seropedicae</i>	57

Resumen.....	57
Antecedentes	57
Objetivos	58
Materiales y métodos	58
Bacterias y condiciones de crecimiento.....	58
Identificación de loci interrumpidos	59
Análisis de secuencias	60
Ensayo de actividad nitrogenasa	60
Resultados y discusión	60
Mutantes en genes relacionados con la adquisición de hierro	61
Mutantes en rutas biosintéticas de aminoácidos.....	63
Mutantes en genes relacionados al metabolismo del carbono.....	65
Otras mutantes identificadas.....	67
Fijación de nitrógeno	67
Conclusiones	70
CAPÍTULO 3: LA RESTRICCIÓN DE HIERRO AFECTA LA ACTIVIDAD NITROGENASA Y LA EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>nifA</i> Y <i>nifH</i> EN <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	71
Resumen.....	71
Objetivos	71
Principales resultados y conclusiones.....	71
Contribución personal al trabajo y aporte a los objetivos planteados.....	72
CAPÍTULO 4: IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS SEROBACTINAS, UN GRUPO DE SIDERÓFOROS LIPOPEPTÍDICOS PRODUCIDOS POR <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	80
Resumen.....	80
Objetivos	80
Principales resultados	80
Conclusiones	81

Contribución personal al trabajo y aporte a los objetivos planteados.....	81
CAPÍTULO 5: BÚSQUEDA Y ANÁLISIS DE SISTEMAS DE TRANSPORTE DE SEROBACTINAS Y REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE SEROBACTINAS Y SU SISTEMA DE TRANSPORTE	106
Resumen.....	106
Introducción.....	106
Transportadores y transductores TonB-dependientes.....	107
Factores sigma de función extracelular	109
Transporte y regulación de las pioverdinas en <i>Pseudomonas</i> spp.....	109
Transporte y regulación de las ornibactinas en <i>Burkholderia</i> spp.....	112
Objetivos	114
Materiales y métodos	117
Crecimiento bacteriano.....	117
Bioensayos	117
Análisis in silico.....	118
Extracción de proteínas de membrana externa	118
Identificación de proteínas por espectrometría de masas.....	118
Técnicas generales de biología molecular	119
Construcción de plásmidos para mutagénesis y obtención de mutantes por conjugación	120
Construcción de plásmidos para complementación y obtención de complementantes	122
Resultados.....	124
Identificación de dos posibles receptores para serobactinas mediante análisis in silico	124
FhuA actúa como receptor de las serobactinas.....	125
CirA puede participar del transporte de serobactinas cuando se encuentra en alto número de copias	130
PfrrI es esencial para la producción de serobactinas.....	132
CirA actúa como un transductor TonB-dependiente.....	133
Discusión	134

CAPÍTULO 6: DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES	137
Análisis funcional de genes en <i>H. seropedicae</i>	137
La disponibilidad de hierro afecta la fijación de nitrógeno en <i>H. seropedicae</i>	138
Los sideróforos producidos por <i>H. seropedicae</i> son lipopéptidos fotorreactivos.....	139
El transporte y la transducción de señal de las serobactinas son realizadas por proteínas diferentes	141
Propuestas y perspectivas.....	143
Referencias bibliográficas	¡Error! Marcador no definido.
ANEXOS	157
Anexo I: Medio CAS.....	157
Soluciones	158
Anexo II: Programas de ciclado	158
FHUAsense-FHUAanti.....	158
CIRAsense-CIRAanti.....	158
InvCIRAsense-InvCIRAanti.....	158
PFRIsense-PFRlanti.....	159
2348sense-2348anti.....	159
2348sense-M13rev	159
M13 rev-2348anti	159
Anexo III: Mapas de los plásmidos utilizados	160

ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo 2

Tabla 1. Caracterización e identificación de los loci interrumpidos en los mutantes derivados de <i>H. seropedicae</i> Z67 afectados en la internalización o producción de sideróforos.....	59
Tabla 2. Actividad nitrogenasa de la cepa salvaje y diferentes mutantes cultivados en medio NfbHP-malato semi-sólido.....	67

Capítulo 5

Tabla 1. Cebadores utilizados.....	120
Tabla 2. Cepas utilizadas.....	122
Tabla 3. Plásmidos utilizadas.....	123

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Clasificación de endófitos.....	11
Figura 2. Hipótesis del balance de antagonismos en la relación planta-microorganismo.....	12
Figura 3. Aplicaciones y beneficios brindados por los endófitos.....	13
Figura 4. Funciones, proteínas y genes probablemente utilizados por los endófitos de arroz en su interacción con la planta.....	17
Figura 5. Colonización de plantas hospederas por <i>H. seropedicae</i>	20
Figura 6. Evidencia microscópica de la colonización de plantas por <i>H. seropedicae</i>	22
Figura 7. El genoma de <i>H. seropedicae</i> SmR1.....	24
Figura 8. Expresión de <i>pnif::gusA</i> en <i>H. seropedicae</i> LR15 en gramíneas colonizadas.....	26
Figura 9. Funciones, proteínas y genes probablemente utilizados por <i>H. seropedicae</i> en su interacción con la planta.....	27
Figura 10. Estructura cristalográfica del complejo nitrogenasa.....	29
Figura 11. Organización estructural del grupo de genes <i>nif</i> y <i>fix</i> en el genoma de <i>H. seropedicae</i>	30
Figura 12. Estructura de la proteína NifA de <i>H. seropedicae</i>	31
Figura 13. Modelo de la regulación transcripcional de la fijación de nitrógeno en <i>H. seropedicae</i>	32
Figura 14. Sideróforos representativos de las diferentes clases.....	36
Figura 15. Biosíntesis de la aerobactina.....	38

Figura 16. Sideróforos anfífilicos producidos por bacterias terrestres.....	42
Figura 17. Sistemas de adquisición de hierro mediados por sideróforos en bacterias Gram-.....	47
Figura 18. Síntesis de péptidos no ribosomales.....	50
Figura 19. Ejemplo del uso de la minería de genomas.....	52

Capítulo 2

Figura 1. Fenotipo en medio CAS de la cepa salvaje <i>H. seropedicae</i> Z67 y de las mutantes 4.3 y 44.46 (<i>exbD::mTn5</i>).....	61
Figura 2. Localización genómica de los genes mutados relacionados con la adquisición de hierro..	62
Figura 3. Localización genómica de los genes mutados en rutas biosintéticas de aminoácidos.....	63
Figura 4. Fenotipo en medio CAS de la cepa salvaje <i>H. seropedicae</i> Z67 y las mutantes 44.46 (<i>exbD::mTn5</i>), 39.15 (<i>cysl::mTn5</i>) y 25.40 (<i>gltB::mTn5</i>) con el agregado al medio de cisteína 0,5 mM y glutamato 5 mM..	65
Figura 5. Localización genómica de los genes mutados relacionados al metabolismo del carbono.....	66
Figura 6. Localización genómica de los genes mutados en otras mutantes identificadas.....	67
Figura 7. Actividad nitrogenasa y proteínas totales de <i>H. seropedicae</i> Z67 y de la mutante 25.40 (<i>gltB::mTn5</i>) crecidas en medio semi-sólido NfbHP-malato con concentraciones crecientes de glutamato..	69

Capítulo 5

Figura 1. El transporte de citrato férrico en <i>E. coli</i> y su sistema de regulación.....	108
Figura 2. Estructura del sideróforo pioverdina I producido por <i>P. aeruginosa</i>	110
Figura 3. Organización genómica de los genes involucrados en la biosíntesis, transporte y regulación de las pioverdinas.....	111
Figura 4. Sistemas de adquisición de hierro mediados por el sideróforo pioverdina en <i>P. aeruginosa</i>	112
Figura 5. Estructura del sideróforo ornibactina F producido por <i>Burkholderia</i> spp.....	114
Figura 6. Organización genómica de los genes involucrados en la biosíntesis, transporte y regulación de las ornibactinas en <i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315.....	115
Figura 7. Sistemas de adquisición de hierro mediados por el sideróforo ornibactina en <i>B. cenocepacia</i>	118
Figura 8. Casete genómico que contiene el gen que codifica para la NRP-Sintetasa responsable de la biosíntesis de las serobactinas y análisis de dominios Pfam de los genes homólogos a receptores TonB-dependientes presentes en dicho casete.....	125
Figura 9. Alineamiento por MUSCLE de las secuencias aminoacídicas de FhuA y CirA.....	127

Figura 10. Perfil de proteínas de membrana externa de la cepa <i>H. seropedicae</i> Z67 crecida en medio TY con diferentes condiciones de disponibilidad de hierro.....	128
Figura 11. Perfil proteínas de membrana externa de la cepa salvaje <i>H. seropedicae</i> Z67 y de las mutantes 44.46 (<i>exbD::mTn5</i>) y 4.3 (<i>Hsero_2343::mTn5</i>) crecidas en medio NfbHP-GG con diferentes condiciones de disponibilidad de hierro.....	129
Figura 12. : Fenotipo en medio CAS de la cepa salvaje <i>H. seropedicae</i> Z67 y de las mutantes Z67- <i>fhuA::lacZ</i> y Z67- Δ <i>fhuA</i>	130
Figura 13. Fenotipo de crecimiento de la cepa <i>H. seropedicae</i> Z67 y la mutante Z67- Δ <i>fhuA</i>	131
Figura 14. : Utilización de diferentes fuentes de Fe ³⁺ evaluadas mediante bioensayos en <i>H. seropedicae</i> Z67 y la mutante Z67- Δ <i>fhuA</i>	132
Figura 15. Fenotipo en medio CAS de la cepa salvaje <i>H. seropedicae</i> Z67 y la mutante Z67- <i>pfri::lacZ</i>	133
Figura 16. Fenotipo en medio CAS de la cepa salvaje <i>H. seropedicae</i> Z67 y la mutante Z67- Δ <i>cirA</i>	134
Figura 17. Sistemas de adquisición de hierro mediados por serobactinas en <i>H. seropedicae</i>	136

RESUMEN GENERAL

Las bacterias endófitas colonizan los tejidos internos de las plantas sin causar signos externos de infección o un efecto negativo en su hospedero. Los requisitos para considerar una bacteria como endófito verdadero son la evidencia microscópica de la colonización interna de la planta y la capacidad de re-infectar las plantas hospederas. Este grupo de bacterias presentan un gran interés biotecnológico ya que pueden producir compuestos con usos medicinales e industriales, mejorar la fitorremediación, contribuir a la fertilidad del suelo y promover el crecimiento de las plantas. Teniendo en cuenta las 300.000 especies de plantas que existen en la tierra y que cada planta es sede de una o más bacterias endófitas, la oportunidad de encontrar microorganismos nuevos y beneficiosos es considerable.

Herbaspirillum seropedicae es un endófito verdadero perteneciente al grupo de las β -Proteobacteria, subclase que incluye muchos géneros de bacterias asociados a plantas (*Azoarcus*, *Burkholderia* o *Ralstonia*). Coloniza y sobrevive dentro de varias gramíneas de importancia agroeconómica como arroz, sorgo, trigo, maíz y caña de azúcar. Es un organismo capaz de fijar nitrógeno atmosférico y se ha demostrado que los genes que codifican para la nitrogenasa, la enzima responsable de fijación de nitrógeno, se expresan dentro de la planta colonizada. Estudios de promoción del crecimiento en arroz y caña de azúcar demostraron que existe un incremento significativo en la biomasa total de plantas inoculadas con estas cepas. Los genomas de las cepas *H. seropedicae* SmR1 y Z67 están secuenciados y sólo se diferencian entre ellos por polimorfismos de base simple.

El hierro es un elemento de vital importancia en los mecanismos bioquímicos básicos de prácticamente todas las células. La mayoría de las bacterias requieren hierro como elemento esencial en procesos biológicos claves, como por ejemplo la fijación biológica de nitrógeno. Aunque el requerimiento celular es sólo de concentraciones micromolares, obtener la cantidad necesaria es un problema para los microorganismos debido a la baja disponibilidad del metal en ambientes aerobios con pH neutro. Una de las estrategias ampliamente utilizada por los microorganismos para suplirse del metal es mediante la síntesis y liberación al medio extracelular de compuestos de bajo peso molecular altamente afines por el ion férrico, los sideróforos, conjuntamente con la expresión de sistemas de transporte específicos para el complejo sideróforo-férrico.

A partir de una librería de mutantes derivados de la cepa *H. seropedicae* Z67 obtenidos por transposición, se buscaron e identificaron aquellos afectados en la producción o internalización de

sideróforos. Las secuencias interrumpidas de dichos mutantes presentaron homología con genes codificantes para proteínas relacionadas con el transporte y biosíntesis de sideróforos, para enzimas de las rutas biosintéticas de aminoácidos, para enzimas relacionadas al metabolismo del carbono y para proteínas reguladoras y transportadoras. La capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico fue ensayada en varias de las mutantes. La mutante *H. seropedicae* 44.46 posee el gen Hsero_0689 interrumpido, el cual codifica para la proteína ExbD. Este gen es inducido en respuesta a la limitación de hierro y la mutante resultó incapaz de fijar nitrógeno en medios con baja disponibilidad del metal. La mutante *H. seropedicae* 25.40, con el gen Hsero_3924 interrumpido, codificante para la subunidad mayor de la glutamato sintetasa, es auxótrofa para glutamato y fue incapaz de fijar nitrógeno en todas las condiciones estudiadas.

En este trabajo se analizó la respuesta de *H. seropedicae* Z67 a la deficiencia de hierro en condiciones de fijación de nitrógeno. Cuando existe limitación de hierro, como ocurre en la mutante 44.46, la actividad nitrogenasa se pierde totalmente. Además, se demostró que la expresión de los genes estructurales de la nitrogenasa, *nifHDK*, en el contexto genético de *H. seropedicae*, es máxima únicamente en condiciones ricas en hierro, mientras que se ve severamente reprimida cuando la disponibilidad del metal es limitada. En esas condiciones la expresión del gen *nifA*, que codifica para el activador transcripcional de los genes *nif*, incluidos *nifHDK*, se reduce a la mitad.

Dada la importancia de los sistemas de adquisición de hierro para la fijación de nitrógeno, se propuso el objetivo de identificar y caracterizar los sideróforos producidos por esta bacteria. Un clon, obtenido en la misma librería de mutantes resultó incapaz de producir sideróforos. Dicha mutante tenía insertado el minitransposón en un sintetasa de péptidos no ribosomales (NRP-Sintetasa). La estructura química del sideróforo se predijo usando herramientas genómicas computacionales. La estructura predicha se confirmó por análisis químico. Se encontró que los sideróforos producidos por *H. seropedicae* Z67 son un conjunto de lipopéptidos anfífilos, las serobactinas A, B y C, que varían según la longitud de la cadena de ácido graso. Se demostró además la actividad biológica de las serobactinas como fuentes nutricionales de hierro para *H. seropedicae*, siendo los primeros sideróforos caracterizados estructuralmente, producidos por bacterias endófitas.

Otro objetivo de esta tesis fue realizar estudios funcionales en genes implicados en el transporte y regulación de la producción de serobactinas. Mediante técnicas puestas a punto a lo largo del doctorado se obtuvieron mutantes dirigidos derivados de la cepa Z67, con los cuáles se logró identificar el receptor específico del complejo Fe^{3+} -serobactina (Hsero_2345), el papel regulador

de un factor sigma de función extracelular (Hsero_2338) y el papel modulador de la expresión de sideróforos de un transductor TonB-dependiente (Hsero_2337) no implicado en el transporte de las moléculas. A partir de estos resultados se propone un modelo de transporte y regulación a medio camino entre el descrito para los sideróforos pioverdinas producidos por cepas de *Pseudomonas* y el propuesto para los sideróforos ornibactinas producidos por cepas de *Burkholderia*.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL

Bacterias endófitas

Historia y definición

Los estudios pioneros sobre bacterias que residen en el interior de vegetales datan de la década de 1870 con los trabajos de Pasteur y otros (Revisado por [117]). Sin embargo, la idea dominante en ese entonces era que la presencia de dichas bacterias se debía a una condición patológica latente. Trabajos posteriores de Perotti [147] y de Hennig y Villforth [82] demostraron la presencia de bacterias no dañinas en hojas, tallos y raíces de plantas aparentemente sanas. A partir del año 1940, surgieron numerosos trabajos sobre bacterias endófitas y en la década de 1980 se publicaron los primeros trabajos sobre el aislamiento de endófitos capaces de fijar nitrógeno atmosférico, presentes en gramíneas de interés agronómico. Desde entonces, se ha trabajado mucho con el objetivo de utilizar los endófitos como biofertilizantes [117, 198]. Actualmente la idea de que no existen plantas que no posean microorganismos asociados viviendo en su interior es ampliamente aceptada [162]. La interacción entre la planta y los endófitos puede darse en forma de simbiosis, mutualismo, comensalismo o como una relación neutral.

La definición de “endófito” más ampliamente aceptada es la siguiente: los endófitos son microorganismos que colonizan y sobreviven en el interior de los tejidos vegetales sin causar síntomas visibles de daño o desarrollo de enfermedad en el hospedero [78, 157, 174]. Esta definición se aplica tanto para bacterias como para hongos endófitos. Desde un punto de vista experimental, un endófito verdadero debe cumplir con los tres siguientes requisitos: 1) obtención del aislamiento a partir de tejidos vegetales superficialmente esterilizados, 2) identificación microscópica del microorganismo en el interior del tejido vegetal y 3) capacidad de re-infectar brotes esterilizados de la planta hospedera [80, 156, 160]. Se recomienda que aquellas bacterias en las cuales no se haya podido corroborar alguno de los requisitos sean nombradas como probables endófitos.

La gran mayoría de endófitos bacterianos verdaderos identificados hasta el presente pertenecen al phyla Proteobacteria, pero también se han aislado representantes de los phyla Firmicutes, Actinobacteria y Bacteroidetes [157, 160]. Sin embargo, mediante análisis de diversidad bacteriana independientes de cultivo se observó que la mayoría de los posibles endófitos eran no cultivables [39, 40, 65, 157, 188]. Estos estudios han demostrado también el reto que significa

describir una comunidad de endófitos, ya que la composición de la misma resulta impredecible debido a la acción de factores muy estocásticos. A su vez, estas comunidades varían según el genotipo, etapa de desarrollo y crecimiento de la planta [80, 91, 114, 195]. De acuerdo a la definición, en el caso de las bacterias no cultivables no podrían llamarse estrictamente como endófitos verdaderos, aunque en general y mientras no haya otro tipo de convención se acepta denominarlas genéricamente como endófitos.

Hardoim y colaboradores [80] desglosan esta definición según los estilos de vida y la presencia de mecanismos moleculares que permitan una exitosa colonización y sobrevivencia en el interior vegetal. Primeramente proponen una separación entre los endófitos obligados y facultativos: los primeros no poseen en su ciclo de vida un estadio fuera del hospedero y sólo pueden sobrevivir en el interior del mismo; los segundos son aquellos que pueden colonizar hábitats diferentes al interior del tejido vegetal. Dependiendo del modo de invasión los clasifican en endófitos pasajeros, oportunistas y competentes (Fig. 1). Los endófitos pasajeros son bacterias presentes en la rizósfera o rizoplano de la planta que colonizan el interior de la planta en forma accidental y se mantienen en su interior debido a la ausencia de presión selectiva; los endófitos oportunistas pueden poseer maquinarias quimiotácticas que les permiten colonizar el rizoplano y después invadir los tejidos internos de la planta, pero permanecen confinados a tejidos vegetales particulares externos; los endófitos competentes son las bacterias que poseen el acervo genético necesario (ausente en oportunistas y pasajeros) para colonizar con éxito una planta y sus tejidos específicos, modulando la fisiología del vegetal invadido y siendo positivamente seleccionados por parte del mismo [212].

Las bacterias fitopatógenas no estarían obviamente incluidas en la definición de endófitos. Sin embargo, existen casos de fitopatógenos que en ciertos hospederos y/o condiciones ambientales, desarrollan un estilo de vida típicamente endófito según esta definición [80, 212]. A su vez, distintas cepas de especies clasificadas como endófitas pueden llegar a desarrollar un estilo de vida patógeno [95, 172, 214]. A nivel genómico, tanto endófitos como fitopatógenos poseen genes que codifican para factores de virulencia y la planta puede responder con mecanismos similares de defensa frente a ambos tipos de bacterias. Basados en estos hechos y para explicar estos ejemplos, Schulz y Boyle [174] proponen una hipótesis para la interacción “pacífica” entre una planta y un endófito: el balance de antagonismos (Fig. 2). Dicha hipótesis propone que existe un balance entre los factores de virulencia de la bacteria y las defensas de la planta que resultan en una colonización asintomática. Este balance sería un estado momentáneo y de fragilidad variable, dependiendo de factores bióticos intrínsecos al huésped/hospedero y factores abióticos.

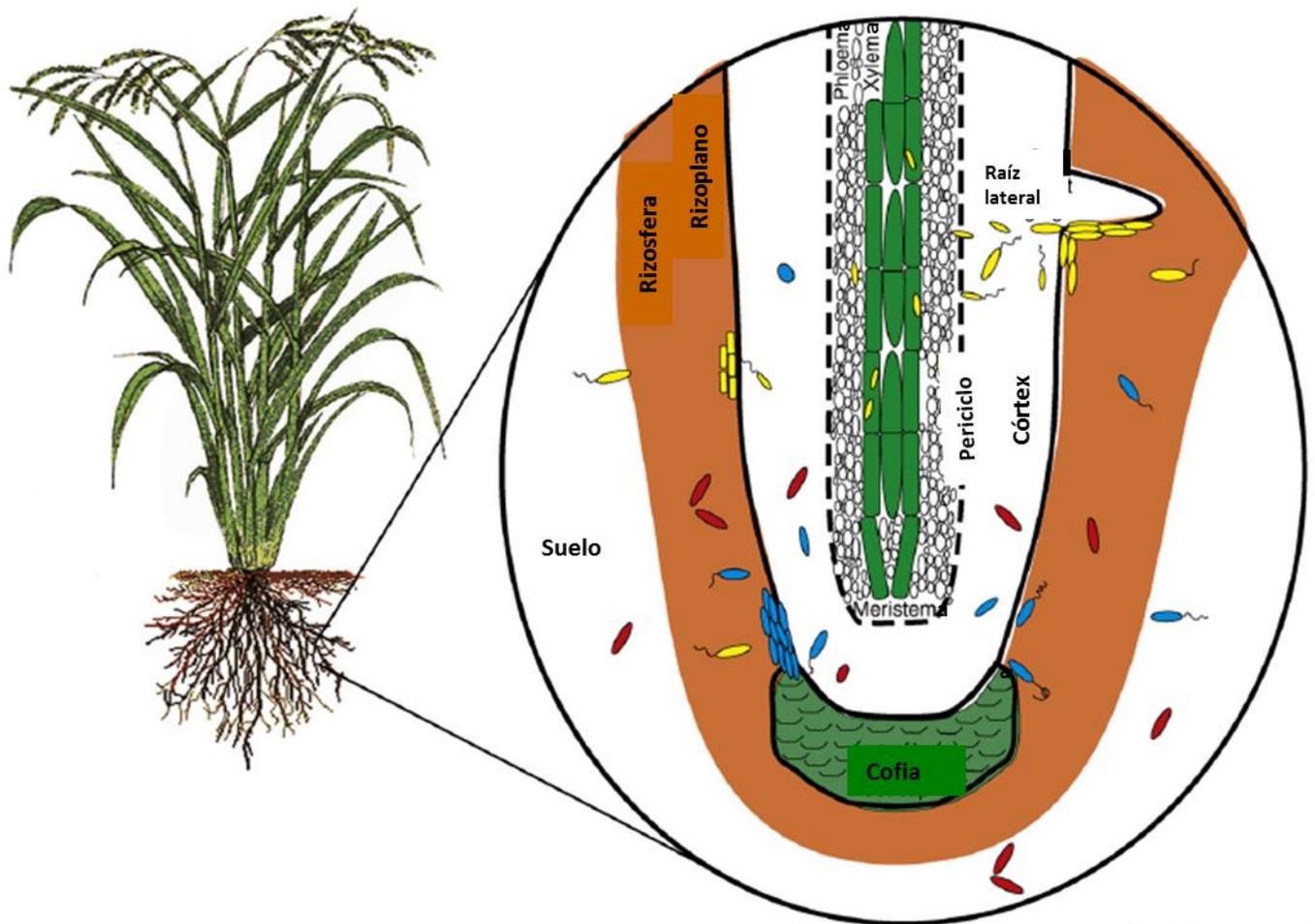


Figura 1: Clasificación de endófitos según Hardoim y col. [82]. Los endófitos pasajeros (células rojas) son habitantes del suelo que colonizan el interior de la planta por azar y su localización está restringida al córtex de la planta. Los endófitos oportunistas (azules) pueden ser atraídos específicamente por las raíces y formar microcolonias en el rizoplano, pero la colonización de la planta se limita a tejidos externos. Los endófitos competentes (amarillos) poseen la maquinaria genética necesaria para reconocer e invadir una planta hospedera, colonizar los tejidos internos y manipular la respuesta de invasión de la planta para lograr un balance armonioso entre ambos. Adaptado de Hardoim y col. [82].

Aplicaciones biotecnológicas de los endófitos

Las aplicaciones descritas para las bacterias endófitas se muestran resumidas en la figura 3. Una de las principales características que ha llevado a los investigadores a interesarse por los endófitos es la capacidad de algunos aislamientos de promover el crecimiento y desarrollo de los vegetales que colonizan. A las bacterias, ya sea endófitas, rizosféricas o simbióticas, que posean esta capacidad se las denomina genéricamente como Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal

(BPCV). Los mecanismos de promoción del crecimiento son variados y pueden dividirse en mecanismos directos o indirectos [73]. Los mecanismos directos más estudiados son aquellos en los cuales las BPCV proporcionan o facilitan la adquisición de un recurso escaso o de difícil acceso a la planta, principalmente nitrógeno fijado y fósforo soluble. Otro mecanismo por el cual los endófitos favorecen el crecimiento de las plantas de manera directa es la producción de fitohormonas o la modulación de los niveles de las mismas en el interior celular [73]. Entre las hormonas producidas o reguladas están citoquininas, giberelinas, auxinas (como el ácido indol acético) y el etileno.

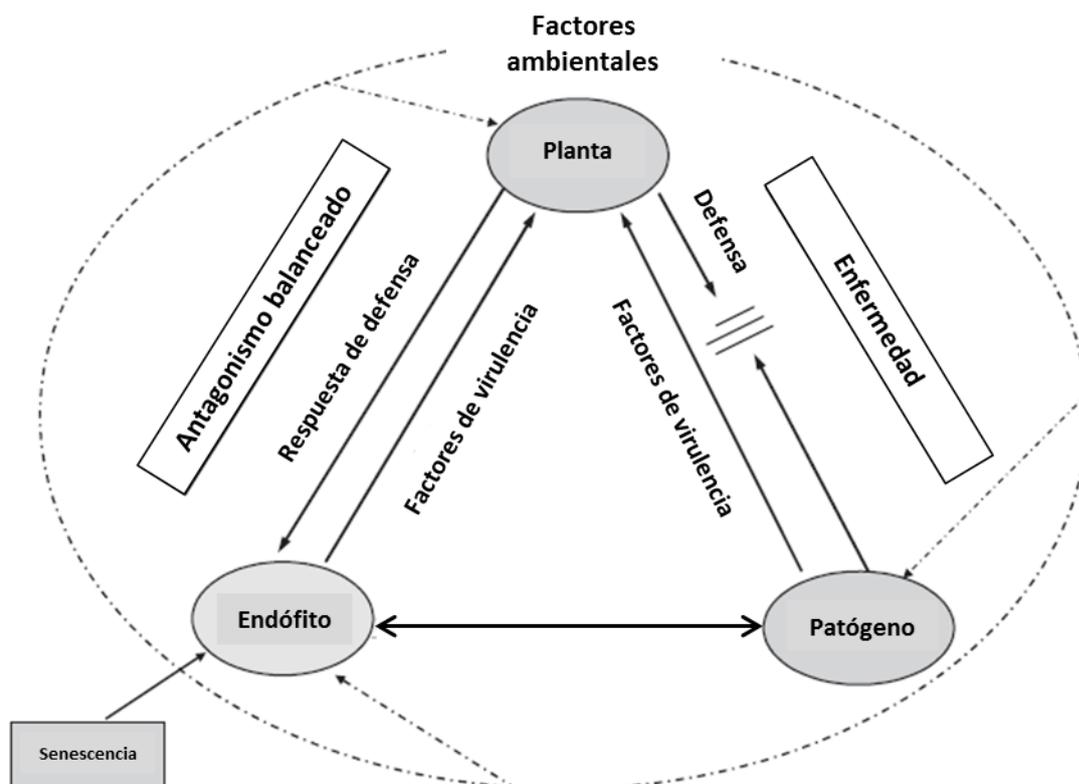
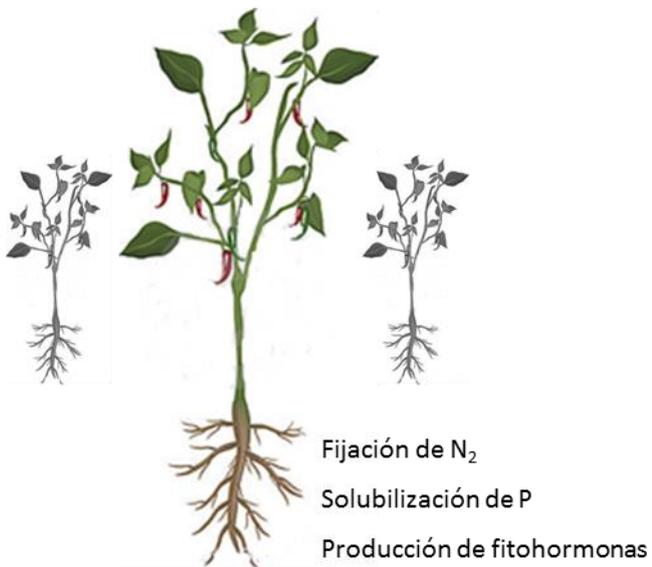
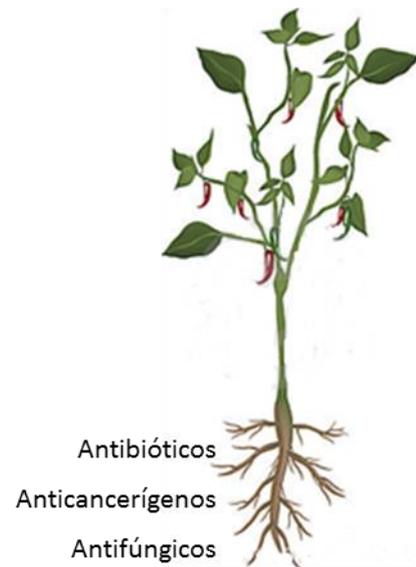


Figura 2: Representación esquemática de la hipótesis del balance de antagonismos en la relación planta-microorganismo propuesto por Schulz y Boyle [176]. Dicha hipótesis plantea que la relación armoniosa entre una planta y un endófito se da por un equilibrio entre las respuestas de defensa de la planta, los factores de virulencia del endófito y las condiciones ambientales en las cuales se da la relación. Adaptado de Schulz y Boyle [176].

PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO



PRODUCCIÓN DE METABOLITOS



BIORREMEDIACIÓN



PROTECCIÓN FRENTE A PATÓGENOS

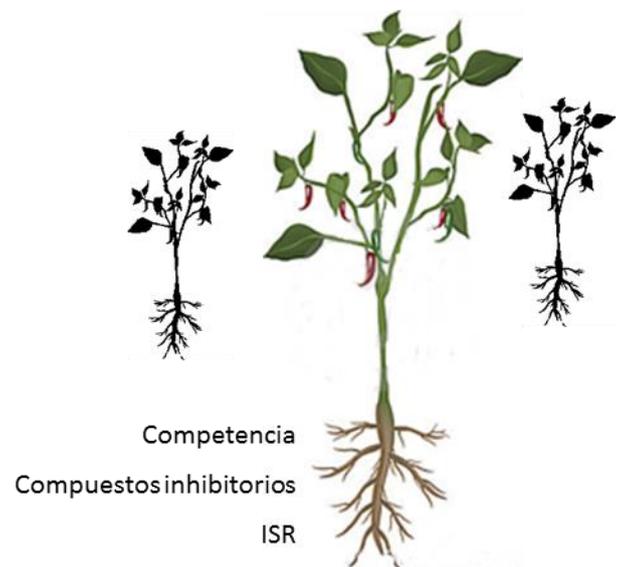


Figura 3: Aplicaciones y beneficios brindados por los endófitos y algunos de los mecanismos utilizados. Basado en Ryan y col. [164].

El nitrógeno fijado es un recurso limitante en casi todos los ambientes, siendo la principal reserva del mismo el N₂ presente en la atmósfera, una forma no asimilable por los vegetales. Únicamente dentro de los procariontas existen especies capaces de fijar el N₂ y reducirlo a la forma asimilable

amonio, mediante un proceso molecular muy complejo y energéticamente costoso: la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN). Los organismos capaces de fijar biológicamente el nitrógeno son conocidos como diazótrofos. El complejo enzimático nitrogenasa es quién cataliza la reducción del N_2 [61]. El uso de bacterias diazótrofas como fertilizantes es una alternativa a la producción de fertilizantes químicos, con la ventaja de poseer un considerable menor costo de producción y un menor impacto ambiental [22]. Es muy conocida y estudiada la interacción simbiótica entre plantas leguminosas y el grupo de los rizobios. En esta simbiosis existe un significativo aporte por parte de la bacteria de nitrógeno fijado a la planta hospedera a cambio de fotosintatos y se estima que casi la mitad del nitrógeno total fijado en el planeta se debe a este tipo de simbiosis [69, 75, 92]. El aporte a la planta del nitrógeno fijado proveniente de endófitos sería bastante menor que aquél suministrado en la interacción leguminosa-rizobio [198]. Sin embargo, existen aislamientos endófitos de gramíneas con gran potencial como proveedores de nitrógeno a sus hospederos, por lo que en la mayoría de los proyectos que buscan BPCV en cultivos de interés, la capacidad de fijar nitrógeno es una de las características más buscadas en los aislamientos [9, 22, 191]. El mecanismo por el cual el nitrógeno fijado es transferido a la planta hospedera todavía no ha sido claramente determinado, siendo probable que ocurra simplemente por un proceso relativamente ineficiente de muerte y mineralización de las bacterias [92].

Los endófitos pueden también promover el crecimiento de las plantas indirectamente actuando como antagonistas de fitopatógenos (denominándose en este caso como biocontroladores). Al igual que en el caso de los fertilizantes químicos y la FBN, el uso de biocontroladores supone una opción ambientalmente más atractiva que los pesticidas químicos [73, 80]. La acción antagonista de un endófito sobre un fitopatógeno puede deberse a la producción de antibióticos o enzimas líticas, la competencia por el nicho ecológico o por la competencia por nutrientes como por ejemplo el hierro (ver más adelante). A su vez, un endófito puede no tener efecto antagonista directo sobre cierto fitopatógeno, pero la invasión de la planta por parte del mismo puede despertar la reacción de “alerta” conocida como ISR (“Induced Systemic Resistance”) [196]. Una planta que ha sido inducida a despertar la respuesta de ISR reacciona de una forma más rápida y fuerte al ataque de un patógeno por inducción de mecanismos de defensa.

Además de los endófitos promotores del crecimiento, otros aislamientos han demostrado gran capacidad para la degradación de xenobióticos. Se encontró que plantas crecidas en suelos contaminados presentaban una población de endófitos capaces de degradar efectivamente los contaminantes presentes en el ambiente [80]. Este grupo de endófitos son altamente prometedores para su empleo en fitorremediación. Una característica atractiva del uso de

bacterias es la facilidad para la manipulación genética que poseen las bacterias en comparación con las plantas, lo que permite que distintas vías metabólicas puedan ser modificadas para mejorar funciones como por ejemplo la biorremediación.

También, se ha demostrado el potencial de los endófitos como productores de metabolitos secundarios de interés médico e industrial. Se ha observado que las propiedades curativas de algunas plantas medicinales de uso milenario son a causa de metabolitos producidos por las bacterias residentes en el interior de las mismas y no por la planta en sí [126, 127]. Teniendo en cuenta las 300.000 especies de plantas que existen en la tierra y que cada planta es sede de una o más bacterias endófitas, la oportunidad de encontrar metabolitos nuevos y beneficiosos es considerable [80].

Aunque ya existen ejemplos de formulaciones comerciales de endófitos hay dos factores importantes para tener en cuenta en el desarrollo y comercialización de estas bacterias. Primero, a pesar de los prometedores resultados positivos que se obtienen con los promotores de crecimiento directo y los biocontroladores en condiciones de laboratorio y/o invernadero, usualmente dichos aislamientos fallan al momento de ser utilizados en el campo. Este fracaso se debe principalmente a una pobre o insuficiente colonización del hospedero. Una mejor comprensión sobre cómo las bacterias beneficiosas colonizan nichos diferentes de plantas no sólo se traducirá en un mayor conocimiento sobre las interacciones microbianas de plantas, sino también dará lugar a un uso más exitoso y confiable de inoculantes bacterianos [39]. En segundo lugar, algunos endófitos pertenecen a géneros y especies bacterianas que incluyen también cepas fitopatógenas e incluso patógenos humanos. En la mayoría de los casos estudiados se ha encontrado que aun perteneciendo a la misma especie bacteriana, los patógenos poseen marcadas diferencias a nivel genómico con respecto a los endófitos. Se espera que en los próximos años, la profundización en el conocimiento de estas diferencias genéticas así como la comprensión de los mecanismos implícitos en el balance de antagonismos descrito anteriormente, permita predecir el potencial patógeno de inoculantes microbianos [39, 174].

Endófitos en la planta de arroz

El arroz (*Oryza sativa*) es el alimento base de más del 50 % de la población mundial. Un aumento en la producción y rendimientos de este cereal son necesarios para acompañar el crecimiento sostenido de la población. Dicho aumento debe ser logrado sin incrementar el uso de fertilizantes químicos y pesticidas, que causan polución ambiental y pueden tener un efecto negativo en la

salud humana. La aplicación de BPCV que actúen positivamente sobre este cultivar es un objetivo crucial y persistente compartido por muchos laboratorios a nivel mundial [64, 93, 117, 177].

Empleando técnicas ya sea dependientes como independientes de cultivo, se ha identificado una gran diversidad de géneros bacterianos como residentes del interior de plantas de arroz [65, 114, 117, 177]. En los casos en que se ha logrado cultivar estas bacterias, los aislamientos fueron obtenidos de tallos, hojas, raíces y hasta semillas, y una considerable parte de ellos presentaron capacidad de fijar nitrógeno. La mayoría de estos géneros estaban también presentes en la rizósfera, rizoplano o filoplano de la planta de arroz, por lo que se supone que el origen de la comunidad endofítica de la planta ingresaría a la misma a través estomas, heridas o lugares de emergencia de las raíces laterales, como se ha descrito para otras plantas [157]. Igualmente existe una fuerte evidencia de transmisión vertical de bacterias endófitas a través de las semillas de arroz. La permanencia de las bacterias en las semillas y la inmediata colonización de la planta recién germinada puede resultar una ventaja a la hora de competir con el resto de la población de endófitos.

Se han encontrado cepas con capacidad de promover el aumento de la biomasa y el rendimiento en la producción de granos de plantas de arroz, pertenecientes a diferentes especies de los géneros *Herbaspirillum*, *Serratia*, *Burkholderia*, *Rhizobium* y *Pantoea*. Una cepa de *Burkholderia* ha demostrado ser eficiente como biocontroladora del fitopatógeno *Burkholderia glumae* y dos cepas de rizobios aún no identificadas a nivel de especie, producen compuestos capaces de despertar una respuesta de defensa sistémica y proveer protección contra el hongo *Rhizoctonia solani*. Todas estas respuestas beneficiosas fueron obtenidas en ensayos en condiciones gnotobióticas de laboratorio o en invernáculo [117].

Como se dijo anteriormente el éxito de estos aislamientos en ensayos de campo dependerá mucho de las capacidades competitivas de los mismos frente a la población microbiana nativa del suelo o a las comunidades ya establecidas en la planta. La identificación de factores necesarios para una efectiva colonización han surgido fundamentalmente a partir de estudios con mutantes isogénicas de cepas de interés realizados en condiciones gnotobióticas. Recientemente, un acercamiento metagenómico de endófitos de raíces de arroz permitió tener una visión más general sobre dichos factores incluyendo aquellos provenientes tanto de bacterias cultivables como no cultivables [177]. En la figura 4 se encuentran esquematizados los diferentes mecanismos propuestos por Sessitsch y col. [177], como involucrados en la interacción de un endófito con raíces de plantas de arroz.

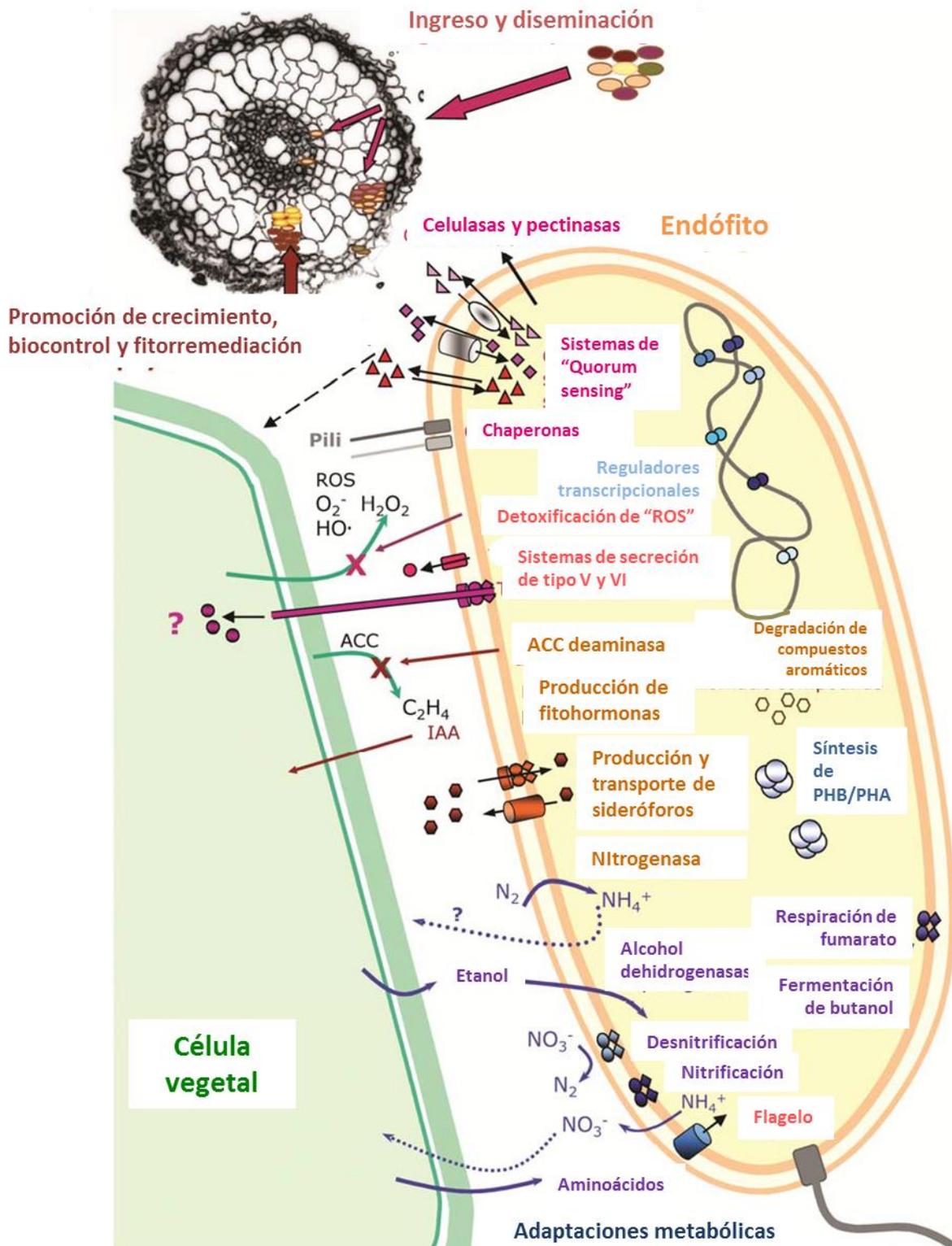


Figura 4: Funciones, proteínas y genes probablemente utilizados por los endófitos de arroz en su interacción con la planta. Dichas funciones se basan en los datos del metagenoma de endófitos de arroz de Sessitsch y col. [179]. La figura representa un solo microorganismo pero las funciones representadas están repartidas en todo el metagenoma y no presentes todas ellas en una sola célula. Adaptado de Sessitsch y col. [179].

***Herbaspirillum seropedicae*: un endófito modelo**

El género *Herbaspirillum*

Debido a sus características morfológicas, fisiológicas y hábitat, los primeros aislamientos del actual género *Herbaspirillum* fueron clasificados como *Azospirillum* [172]. Mediante estudios de hibridación ARN-ARN se demostró que los aislamientos no estaban emparentados con ese género y se clasificaron como pertenecientes a un nuevo género: *Herbaspirillum* (del latín *Herbas*: planta herbácea; *spirillum*: pequeño espiral, o sea: bacterias con forma de pequeñas espiras aisladas de plantas herbáceas) [8, 128]. Las primeras cepas de este género, fueron aisladas del interior de las gramíneas (familia Poaceae) arroz, sorgo y maíz y se denominaron como *H. seropedicae*. El nombre de la especie hace referencia al lugar de donde fueron aisladas, en el Centro Nacional de Agrobiología EMBRAPA, Seropédica, Río de Janeiro, Brasil [8].

El género *Herbaspirillum* pertenece al grupo de las β -Proteobacterias y comprende actualmente 14 especies aceptadas. De esas 14 especies únicamente 5 han sido aisladas del interior de plantas: *H. seropedicae* (arroz, sorgo, maíz, caña de azúcar, pasto kallar, banana y ananá), *H. rubrisubalbicans* (caña de azúcar), *H. frisingense* (*Miscanthus* y *Pennisetum*), *H. lusitanum* (*Phaseolus vulgaris*) y *H. hiltneri* (trigo). Con excepción de esta última, las otras cuatro especies son bacterias diazótrofes. Por su parte, *H. rubrisubalbicans* puede ser un patógeno moderado de variedades susceptibles de caña de azúcar y sorgo. Las restantes 9 especies descritas han sido aisladas de muestras de agua y suelos contaminados y no contaminados. Ninguna de estas especies es capaz de fijar nitrógeno. Otro grupo de aislamientos de *Herbaspirillum* aún no validado como especie contiene aislamientos de muestras clínicas. La característica de poseer dentro del mismo género especies que interaccionan con plantas, fijadores de nitrógeno, aislamientos clínicos y degradadores de contaminantes es compartida con otros géneros de las β -Proteobacterias como *Burkholderia*, *Ralstonia* y *Azoarcus* [128, 172].

Dentro del género, las cepas más estudiadas a nivel molecular, fisiológico y microscópico en vida libre como en asociación con plantas son *H. seropedicae* Z67, aislado de arroz, y *H. seropedicae* SmR1, un mutante espontáneo resistente a estreptomicina de la cepa Z78 aislada de sorgo. El genoma de esta última cepa fue secuenciado y publicado [146]. El genoma de la cepa Z67 también fue secuenciado por el mismo grupo y ambos genomas presentan únicamente diferencias de simple nucleótido (comunicación personal, Emanuel de Souza).

Estudios de promoción del crecimiento en arroz y caña de azúcar demostraron que existe un incremento significativo en la biomasa total de plantas inoculadas [10, 93]. La promoción de crecimiento fue dependiente de la variedad de hospedero estudiado, por ejemplo, *H. seropedicae* Z67 aumentó el peso de raíces y tallos e incrementó los niveles de C y N en variedades de arroz tolerantes al aluminio, pero no en aquellas variedades sensibles [77]. Estos autores explican la diferencia observada por el hecho de que las variedades tolerantes al aluminio, secretan mayor cantidad de ácidos carboxílicos por sus raíces, favoreciendo el crecimiento de las bacterias.

Por la disponibilidad de los genomas y la capacidad demostrada de incrementar la biomasa de sus hospederos, ambas cepas de *H. seropedicae* son un modelo valioso para el estudio de bacterias diazotróficas, útiles para entender las complejidades de la promoción del crecimiento vegetal, particularmente de miembros de la familia Poaceae.

Mecanismos de colonización e invasión del hospedero por *H. seropedicae*

Las cepas de *H. seropedicae* han sido aisladas de la rizósfera, interior de raíces y tallos de diferentes plantas fundamentalmente pertenecientes a la familia Poaceae. También son capaces de llevar un estilo de vida epífita ya que pueden colonizar la superficie de las hojas de las plantas [128]. Trabajos hechos en campo como en laboratorio demostraron que la abundancia de bacterias epífitas es similar a la de endófitas [93].

En la figura 5 se presenta un esquema de la colonización de una gramínea por parte de *H. seropedicae*. Los compuestos carbonados secretados a la rizósfera por la planta iniciarían, mediante una atracción química de las bacterias, la interacción de *H. seropedicae* con su hospedero. Es probable también que, como en la interacción rizobio-leguminosa, exista una comunicación molecular entre la planta y *H. seropedicae* a través de flavonoides como la naringenina [118, 189]. Una vez en contacto con las raíces, la adhesión se da preferentemente en la zona alrededor de los pelos radiculares, observándose a veces protrusiones desde las bacterias, lo que indicaría modificaciones de la pared celular.

El ingreso a los tejidos internos de la raíz se observó, en condiciones de laboratorio, a nivel de la emergencia de raíces laterales y de la zona de elongación [93]. Otros autores han visto que la colonización interna comienza en heridas o fracturas de la epidermis. Estas discontinuidades pueden ser más abundantes en el campo, donde existen partículas que pueden generar estas heridas mediante fricción.

Otro factor descrito como importante para la colonización del interior de las plantas, es la producción de enzimas degradadoras de la pared vegetal, como celulasas y pectinasas. Se ha

encontrado que *H. seropedicae* tiene una baja actividad celulolítica y pectinolítica *in vitro*, sin embargo, en el genoma de *H. seropedicae* SmR1 no se han encontrado genes que codifiquen para celulasas, pectinasas u otras enzimas degradadoras de pared, indicando que esta bacteria puede poseer proteínas no descritas previamente que cumplan con estas actividades [146].

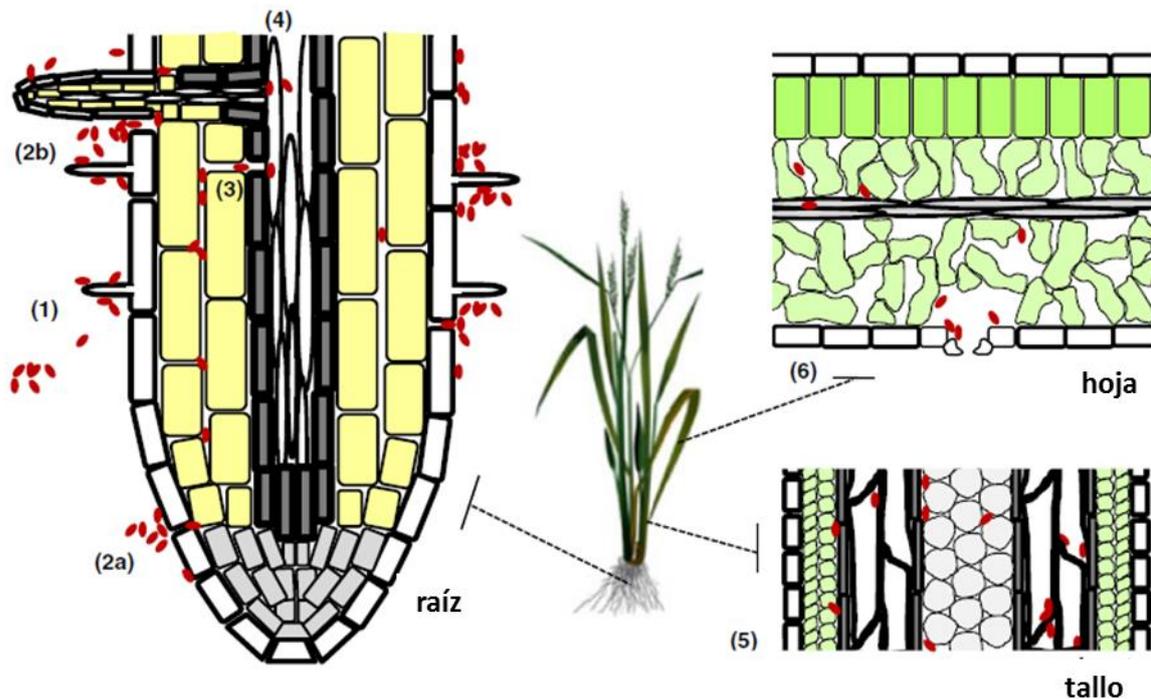


Figura 5: Colonización de plantas hospedadoras por *Herbaspirillum seropedicae*. La asociación de *H. seropedicae* (manchas rojas) con plantas hospedadoras bajo condiciones de laboratorio comienza con la quimiotaxis de las bacterias a la raíz de la planta y la adhesión a las superficies de la raíz, preferentemente a los pelos radiculares (1). La mayoría de las bacterias permanecen en las superficies de la raíz, pero algunas células penetran a través de las discontinuidades de la epidermis, como por ejemplo la zona de elongación (2a) y la zonas de emergencia de las raíces laterales (2b), y a continuación, se produce una rápida ocupación de los espacios intercelulares de la raíz, junto con la colonización de aerénquima (en el arroz) y el xilema (3). Algunas bacterias se desplazan desde las raíces hasta las partes aéreas en el xilema (4), y eventualmente colonizan los brotes (5) y hojas (6), donde pueden encontrarse en los espacios intercelulares y en las cavidades subestomales. Adaptado de Monteiro y col. [130].

Después de la penetración se produce la colonización de los tejidos internos de la planta (Fig. 6). Esta colonización interna por *H. seropedicae* ha sido estudiada principalmente en arroz, maíz y caña de azúcar, pero hay que señalar que la mayoría de estos estudios basados en la microscopía, se realizaron con plantas crecidas en condiciones gnotobióticas y estos ensayos podrían no ser representativos de lo que realmente sucede en el campo [128]. Sin embargo, tomados en conjunto, la consistencia de los datos obtenidos en gran número de laboratorios en ensayos *in vitro* o invernadero, brindan una buena idea sobre cómo estas bacterias pueden entrar y colonizar sus diferentes hospederos. En caña de azúcar, *H. seropedicae*, luego de su entrada a través de la raíz, coloniza espacios intercelulares y llega a invadir el xilema [94]. De manera similar en arroz, las bacterias ingresan por la emergencia de raíces laterales, colonizan espacios intercelulares de raíz, aerénquima y xilema, para posteriormente trasladarse a tallos y hojas [96]. La ocupación de los tejidos internos se produce muy rápidamente, alrededor de dos días después de la inoculación, y puede ser más o menos extensa en función de la variedad de arroz. Más recientemente, la cepa *H. seropedicae* RAM4, modificada genéticamente para expresar constitutivamente una proteína rojo fluorescente, fue utilizada para estudiar la colonización de maíz [130]. Veinticuatro horas después de la inoculación se observó claramente la colonización de la endodermis y el cilindro central y después de 72 horas, las bacterias ya estaban presentes en los vasos del xilema.

En contraste con la extensa información histológica sobre la colonización, los mecanismos moleculares de las interacciones de *H. seropedicae* con sus plantas hospederas son poco conocidos. Se ha demostrado funcionalmente la importancia de los lipopolisacáridos (LPS) [128]. Los LPS forman una interface entre la pared celular y el medio ambiente, sugiriendo que cumplen un importante papel en la comunicación de las bacterias con las plantas. En trabajos realizados con plantas de maíz se encontró que mutantes de *H. seropedicae* defectuosos en la producción de LPS presentaban una reducción de 90% en la adhesión de las bacterias a la superficie radicular en comparación con la cepa salvaje. Dichos mutantes, mostraron también una menor colonización interna y una mayor sensibilidad frente a los mecanismos de defensa de las plantas [11]. Por otro lado, mutantes en el gen *ampG* que codifica para una permeasa de péptidos de mureína, mostraron alteraciones en su perfil de LPS y redujeron 10 veces la colonización interna de plantas de maíz [189]. Los genes de biosíntesis de los LPS estaban regulados por señales químicas derivadas de las plantas, incluyendo flavonoides, metabolitos de defensa e iones de calcio [11, 189], lo que refuerza la evidencia de la importancia de los LPS en la interacción de *H. seropedicae* con sus plantas hospederas.

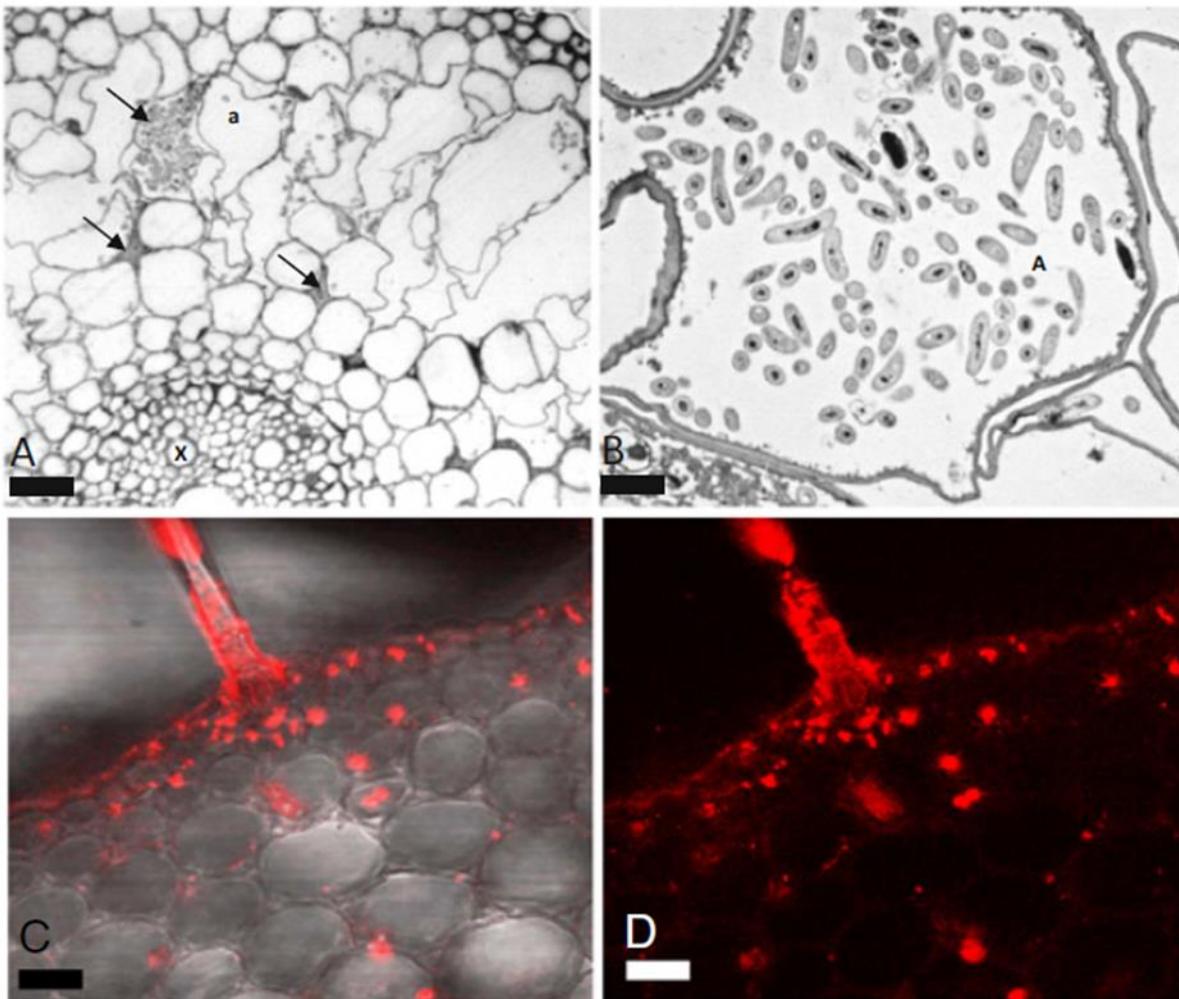


Figura 6: Evidencia microscópica de la colonización de plantas por *H. seropedicae*. Microscopía de luz (A, Bar= 20 μm) y microscopía electrónica de transmisión (TEM) (B, Bar= 2 μm) de sección transversal a través de una raíz principal de plántulas de arroz 2 días después de inoculadas con *H. seropedicae* Z67. La raíz está fuertemente colonizada por bacterias (flechas), que se encuentran principalmente dentro del aerénquima (a). Microscopía de luz transmitida (C) y microscopía de fluorescencia confocal (D) de una sección transversal de las raíces de *Phaseolus vulgaris* luego de un día de inoculación con la cepa *H. seropedicae* RAM4, que muestra la adhesión al pelo radicular y la colonización del espacio intercelular. Bar= 15 μm . Tomado de Monteiro y col. [130].

La respuesta de la planta frente a la invasión de *H. seropedicae* se estudió en arroz y caña de azúcar, demostrándose que dicha respuesta varía según el genotipo de la planta estudiada y que existe un reconocimiento del endófito como un invasor no patógeno [27, 128, 199].

En plantas de caña de azúcar, la invasión por *H. seropedicae* provocó una disminución en los niveles de ARNm del gen SHR5, que codifica para una proteína que pertenece a la familia de las LRR-RLK, proteínas de membrana que responden a señales extracelulares (como la presencia de un patógeno) generando una respuesta intracelular. Los niveles de dicho ARNm no disminuyeron ni en los controles no inoculados, ni en las plantas inoculadas con cepas patógenas [199]. La modulación de los niveles hormonales en la planta es una estrategia utilizada por patógenos y endófitos con el fin de optimizar la colonización [197]. Se demostró también que la invasión por *H. seropedicae* de plantas de caña de azúcar produce una variación en los niveles de expresión de receptores de la hormona etileno y de factores de transcripción de respuesta a la misma [38].

En el arroz, el primer grupo de proteínas identificado como expresado diferencialmente debido a la presencia del endófito fue el de la familia de proteínas P450 [27], involucradas en muchos procesos vegetales, y cuya expresión es regulada por varios factores externos. Se ha propuesto que la función de alguna de estas proteínas es limitar la proliferación de patógenos. Aunque estos estudios se realizaron en un modelo de interacción benéfico entre *H. seropedicae* y arroz, estas proteínas pueden cumplir el papel de mantener un número armonioso de bacterias, pudiendo ser actores principales del balance de antagonismos descrito anteriormente [174]. En cuanto a genes involucrados en la modulación hormonal, diferentes genes del arroz anotados como probables receptores de etileno presentaron alterada su expresión frente a la inoculación de *H. seropedicae*, pero dicho resultado varió según el genotipo de arroz estudiado. Otros genes que presentaron diferencias frente a la inoculación, y diferencias según el genotipo de la planta, fueron los relacionados con el metabolismo de auxinas, como el ácido indol acético (IAA, “Indol Acetic Acid”). Por otra parte, genes involucrados en mecanismos de defensa (altamente expresados en plantas no inoculadas) presentaron una disminución significativa de su expresión cuando las plantas fueron inoculadas con *H. seropedicae*. Entre ellos el gen que codifica para la proteína PBZ1, considerado un marcador molecular de la respuesta de defensa en arroz así como varios genes que codifican para tioninas, también descritas como involucradas en la defensa de arroz, cebada y caña de azúcar [27].

*El genoma de *H. seropedicae**

El genoma de la cepa *H. seropedicae* SmR1 se secuenció y anotó por el Programa Genómico del Estado de Paraná, Brasil (Genopar, www.genopar.org). La secuenciación se obtuvo mediante una combinación de secuenciado Sanger y el uso del pirosecuenciador 454 FLX Titanium® (Roche) obteniéndose una cobertura de 100 veces el tamaño estimado del genoma [146].

Este genoma consiste en un único cromosoma circular de 5.513.887 pares de bases con un 63,4% de contenido G+C, 4.735 probables marcos abiertos de lectura (Open Reading Frames, ORFs), que codifican para 3.108 proteínas con función asignada, 497 con función predicha y 1.130 con función desconocida. En la figura 7 está representado el genoma de esta bacteria.

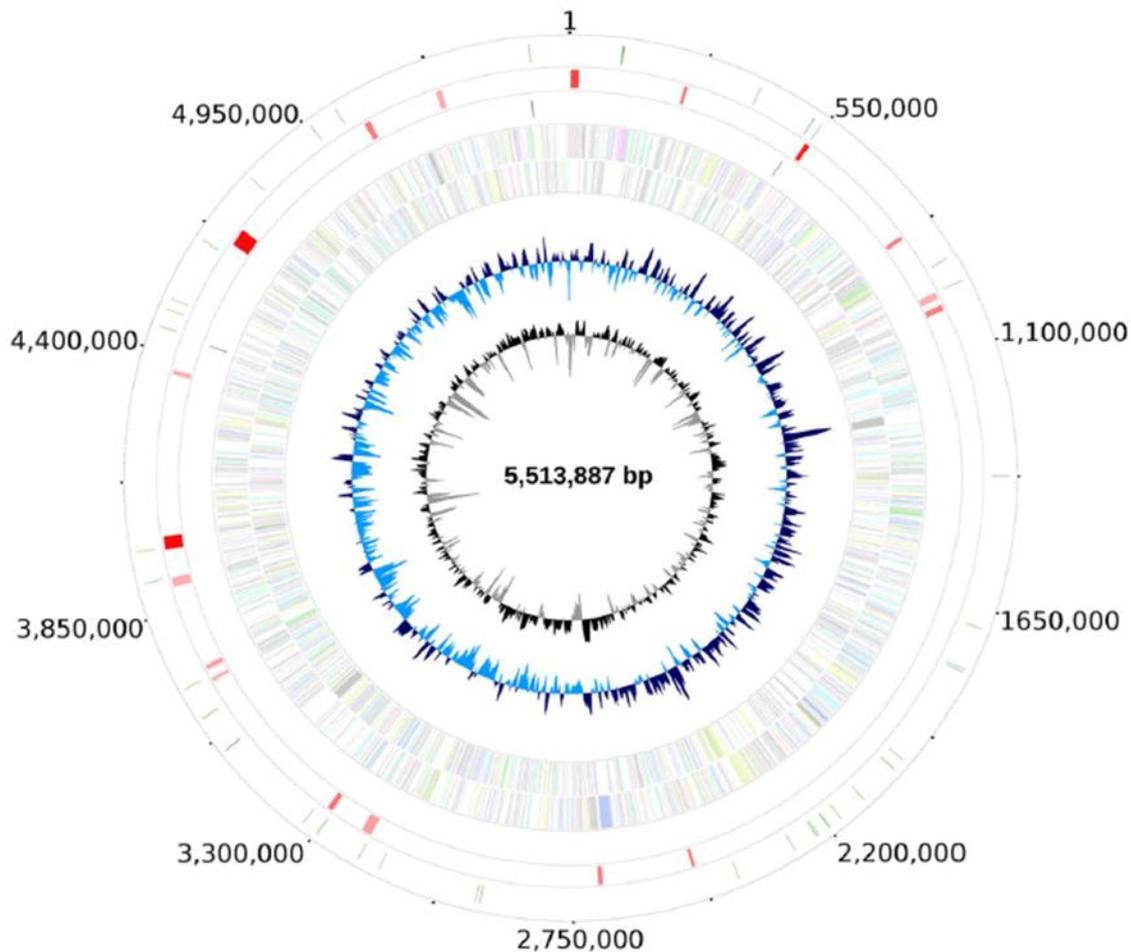


Figura 7: El genoma de *H. seropedicae* SmR1. Desde el interior hacia el exterior: 1) contenido G+ C; 2) sesgo GC; 3) los genes codificados por color de acuerdo a las categorías funcionales del COG, los genes de la cadena + y la cadena - están representados en el interior y exterior de los círculos, respectivamente, 4) operones de ARNr ; 5) regiones probablemente adquiridas por transferencia horizontal; 6) regiones del genoma de *H. seropedicae* idénticas a secuencias del ricino (*Ricinus communis*) (mínimo de 200 pb de longitud y superior al 90% de identidad). Tomado de Pedrosa y col. [148].

Se identificaron un total de 18 regiones probablemente adquiridas por transferencia horizontal. La más extensa de estas regiones posee un mayor contenido G+C (66,4%) que el genoma y contiene 33 ORFs relacionados con el empaquetado de cápside, la regulación y la transcripción de genes de fagos. La segunda región más grande tiene un menor contenido de G+C (58,1%) y posee 52 ORFs, muchos relacionados con el fago P2. También se encontraron dos genes parciales y dos completos de posibles transposasas, 5 de recombinasas/integrasas relacionadas con fagos y 2 de recombinasas/integrasas genómicas. El número relativamente bajo de genes relacionados con elementos móviles parece ser algo compartido en los genomas de las bacterias endófitas, con excepción de *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 [19].

H. seropedicae es capaz de crecer con monosacáridos, etanol y ácidos orgánicos como fuentes de carbono, pero no puede hacerlo con oligo- o polisacáridos [146, 172]. Toda la batería necesaria para el catabolismo de estos compuestos está presente en su genoma, así como los genes implicados en las vías necesarias para la gluconeogénesis. También sintetiza poli-3-hidroxi-butirato (PHB) en condiciones de fijación de nitrógeno, y el peso acumulado de PHB puede alcanzar el 60% del peso seco total [37]. Un total de 13 genes relacionados con la biosíntesis y degradación de PHB están presentes en el genoma. Todos los genes necesarios para la biosíntesis de los 20 aminoácidos proteínogénicos están presentes, sin embargo, *H. seropedicae*, crece pobremente con aminoácidos como fuente de carbono. A partir del análisis de la secuencia genómica se puede especular que este hecho podría deberse a que las vías de degradación de aminoácidos están incompletas y a que carece de algunos de los transportadores específicos.

Considerando los mecanismos descritos como necesarios para el desarrollo de vida endófito (Fig. 4), sorprendentemente *H. seropedicae* carece de genes que codifiquen para enzimas degradadoras de pared celular, por lo que es probable que colonice el interior de sus hospederos sólo a través de discontinuidades de la epidermis. Sin embargo, una baja actividad celulolítica fue detectada en *H. seropedicae* en ensayos *in vitro* [93]. Esta actividad podría deberse a la presencia de enzimas de función desconocida o de enzimas que presenten más de una función.

Las hemaglutininas y hemolisinas son proteínas citotóxicas presentes en patógenos animales, sin embargo también se han encontrado genes homólogos en bacterias que interactúan con plantas. El genoma de *H. seropedicae* posee 20 genes relacionados con estas enzimas tres de los cuales poseen un dominio de tipo adhesina y 9 genes adicionales que codifican para proteínas accesorias de los mismos. Se especula que los productos de estos genes podrían ser utilizados en la adhesión a la raíz [146].

Se identificaron en el genoma genes probablemente implicados en sistemas de exportación de proteínas dependientes del translocon SecYEG, independientes del mismo y del tipo TAT (“Twin-arginine Translocation”) [71]. Es llamativa la presencia del sistema de secreción de tipo 3 (T3SS, “Type 3 Secretion System”) ya que este sistema ha sido descrito como utilizado por fitopatógenos para inyectar proteínas efectoras en el citoplasma de las células vegetales y así modificar su metabolismo a beneficio del patógeno [32]. Sin embargo también fue encontrado en bacterias promotoras del crecimiento como es el caso de *Rhizobium* NGR234, donde es esencial para el establecimiento de la simbiosis con su planta hospedera [146]. Estudios preliminares no han demostrado que el sistema T3SS de *H. seropedicae* cumpla algún papel esencial en la interacción con la planta [128].

Basándose en los datos del genoma, la fijación de nitrógeno y la modulación de los niveles hormonales de la planta son probables mecanismos utilizados por *H. seropedicae* para promover el crecimiento de sus hospederos. Utilizando una cepa que contenía la fusión *nifH::gusA* se comprobó mediante microscopía que dicho gen era expresado en el interior de plantas de arroz, maíz, sorgo y trigo (Fig. 8) [158]. Sin embargo, la inoculación con una mutante *nifH* en plantas de arroz incrementó el peso seco de la raíz al mismo nivel que la salvaje, sugiriendo que dicha promoción no se da únicamente por fijación de nitrógeno [128, 158]. En el genoma, se encontraron 4 posibles vías de síntesis de IAA a partir de triptófano, así como un gen que codifica para una ACC deaminasa, que competiría con la ACC oxidasa, modulando así los niveles de etileno en el interior celular. La figura 9 muestra esquemáticamente los sistemas posiblemente involucrados en la interacción de *H. seropedicae* con la planta predichos a partir del análisis del genoma bacteriano.

Fijación de nitrógeno en *H. seropedicae*

La reducción de nitrógeno atmosférico N_2 es una reacción catalizada por el complejo enzimático nitrogenasa. Existen tres variedades homólogas de nitrogenasa: la Mo-Fe, la V-Fe y la Fe-Fe. Entre ellas, la más estudiada es la Mo-Fe nitrogenasa, y en especial la producida por *Azotobacter vinelandii*. En esta bacteria, este complejo está compuesto por dos metaloproteínas: la Fe-proteína (NifH) y la Mo-Fe-proteína (NifDK). La Fe-proteína es un γ_2 dímero que contiene un clúster Fe_4S_4 y dos sitios de unión a ATP. La Mo-Fe-proteína es un tetrámero $\alpha_2\beta_2$ que posee cuatro centros metálicos por cada tetrámero: dos P-clústeres (Fe_8S_7) y dos M-clústeres (MoFe₇S₉C-homocitrato) (Fig. 10), totalizando 34 átomos de hierro por molécula [89].

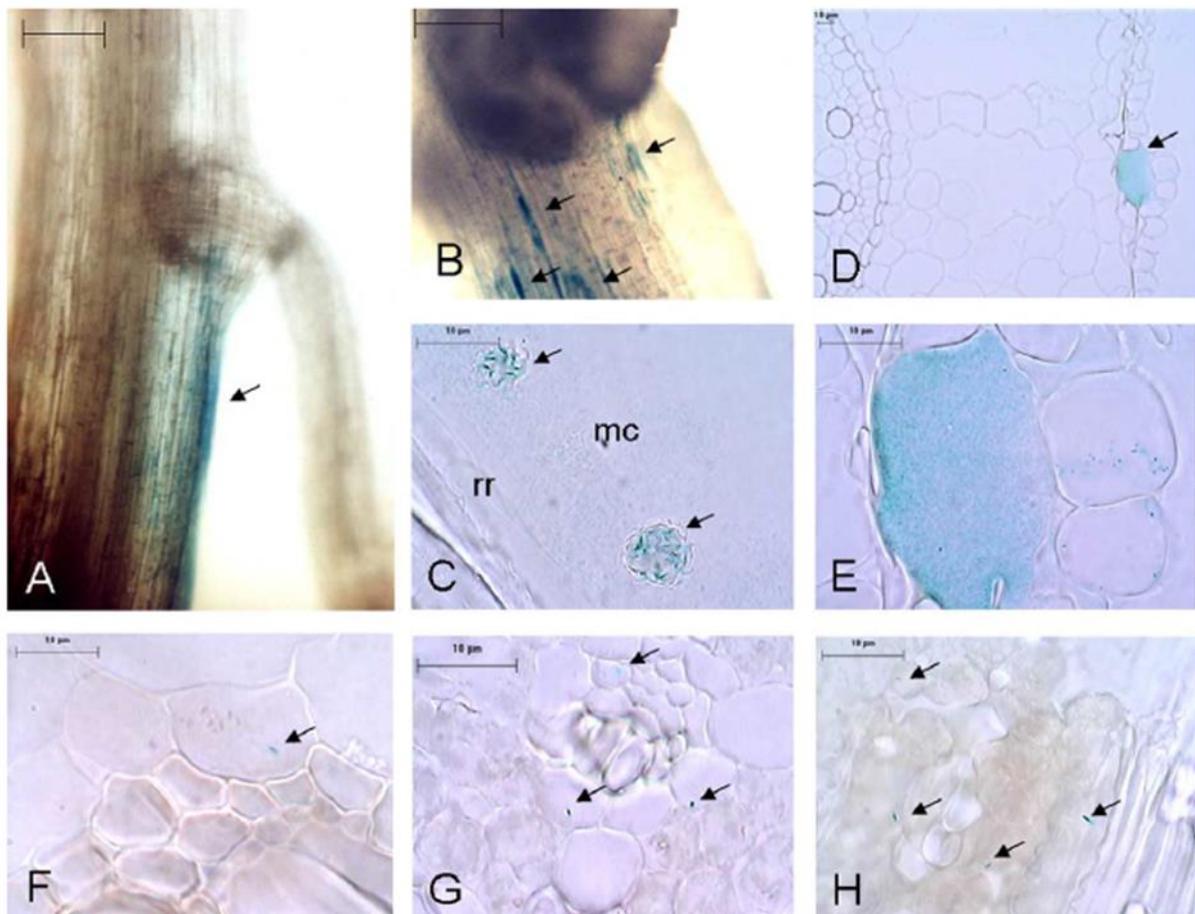


Figura 8: Expresión de *pnif::gusA* en *H. seropedicae* LR15 en gramíneas colonizadas. Las plántulas fueron inoculadas con *H. seropedicae*, teñidas con 5-bromo-4-cloro-3-indolil-L-D-glucurónido y analizados por microscopía de luz. A, B: raíz de trigo, 12 días después de la inoculación (A) y raíz de maíz, 10 días después de la inoculación (B), mostrando la actividad GUS cerca de los sitios de emergencia de las raíces laterales (flechas). C: Expresión de *pnif::gusA* (flechas) en el material mucilaginoso externo de raíz de arroz, 8 días después de la inoculación. D: Las células bacterianas que expresan los genes nitrogenasa en un espacio intercelular de corteza de la raíz del maíz. E: Magnificación superior de D. F, G: células bacterianas individuales que expresan *pnif::gusA* (flechas) en el tejido vascular de los tallos de maíz y arroz, 8 y 15 días después de la inoculación, respectivamente. H: Expresión de *pnif::gusA* por *H. seropedicae* (flechas) dentro de hojas de trigo, 10 días después de la inoculación. Las barras representan 50 μm (A, B) o 10 μm (C-H). Tomado de Roncato-Maccari y col. [160].

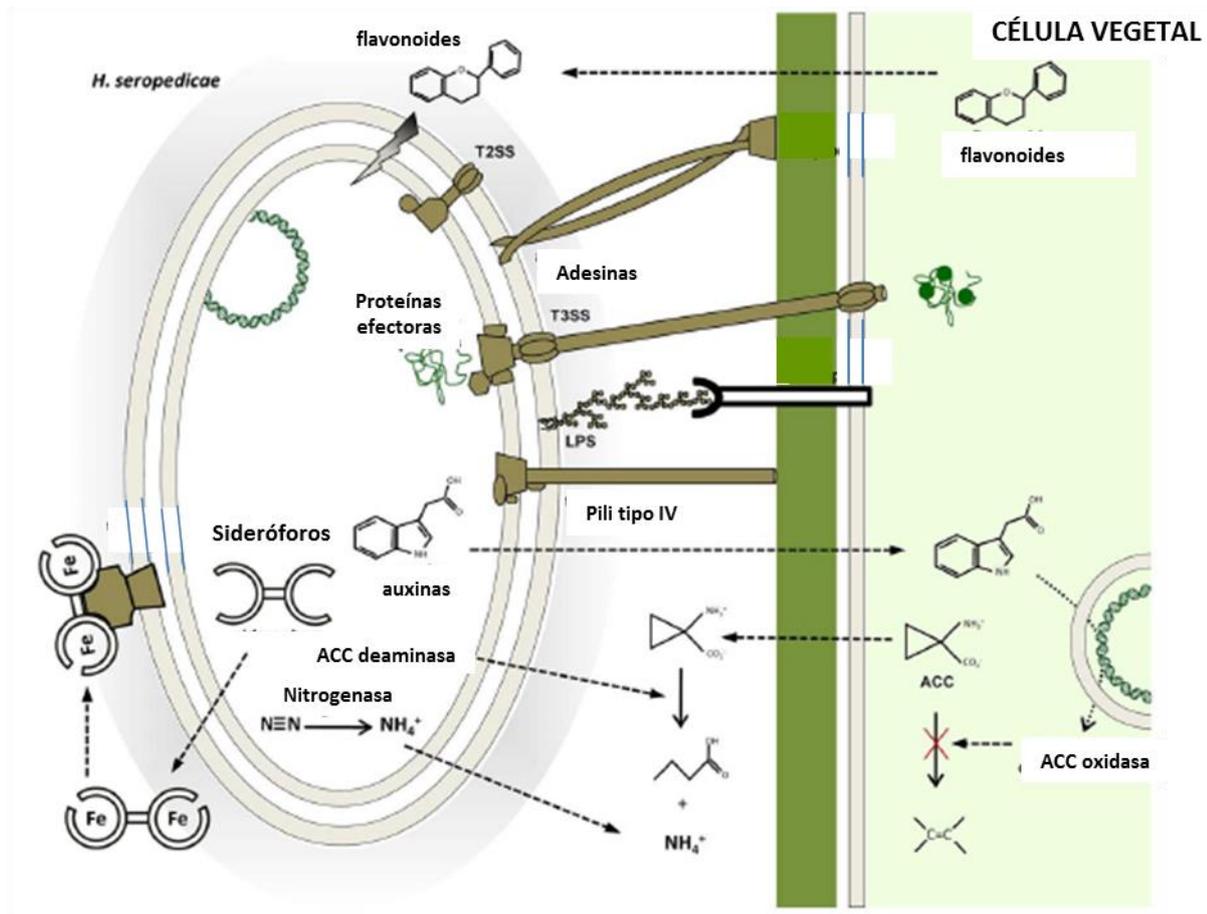


Figura 9: Funciones, proteínas y genes probablemente utilizados por *H. seropedicae* en su interacción con la planta, según datos del genoma. Tomado de Pedrosa y col. [148].

La producción de un complejo nitrogenasa activo requiere la expresión de al menos 20 genes, incluyendo los genes estructurales, los genes regulatorios y los necesarios para la formación de los cofactores, lo que conlleva un gasto metabólico considerable. En *H. seropedicae*, los genes estructurales de la nitrogenasa están incluidos en el operón *nifHDKENXHsero_2847Hsero_2846fdxA*, siendo *nifH* quien codifica para la Fe-proteína, y *nifDK* para la MoFe-proteína [104, 146, 181]. Este operón, junto a genes adicionales de maduración y ensamblado del complejo nitrogenasa suman 46 ORFs agrupados en al menos siete operones, conformando una región de aproximadamente 40 kb (Fig. 11) [55, 146]. Dos características sugieren que la región responsable de la fijación de nitrógeno (región *nif*) fue adquirida por *H. seropedicae* mediante transferencia horizontal: primero en ambos extremos de esta región existe un gen parcialmente duplicado (*gloA*) con 93% de identidad; segundo, corriente arriba de la región

nif, existe una secuencia reminiscente de un gen de una transposasa. Igualmente el porcentaje GC de esta región (63%) no es diferente al resto del genoma.

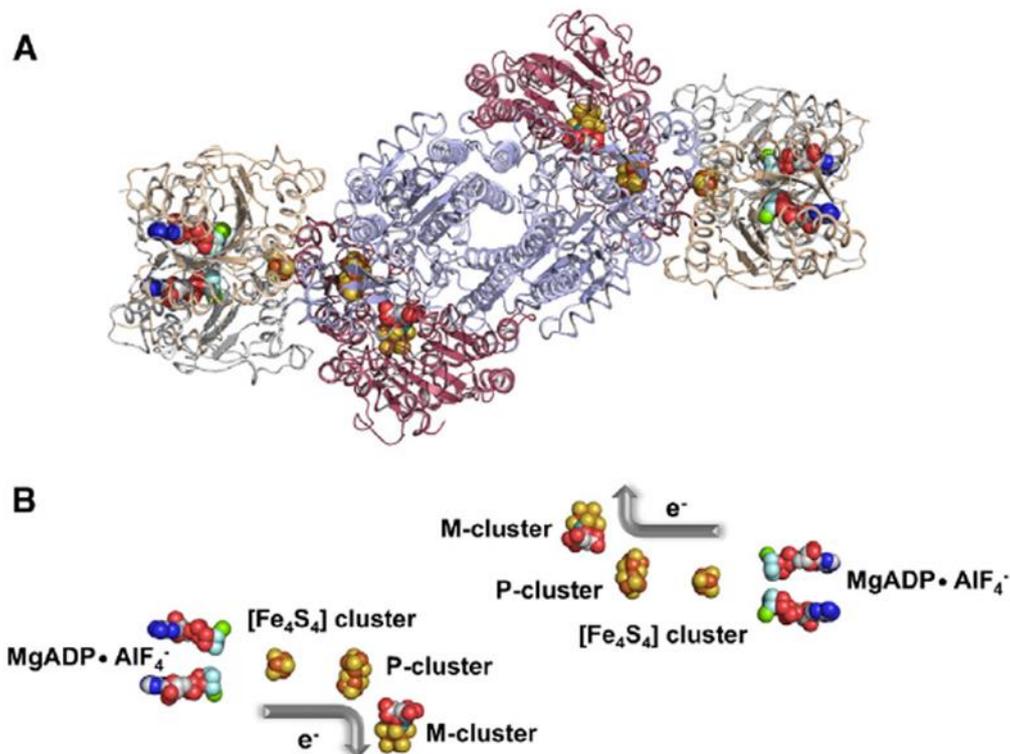


Figura 10: Estructura cristalográfica del complejo nitrogenasa. A) Estructura del complejo NifHDK con ADP·AlF₄⁻ y B) posiciones relativas de los componentes que participan en el flujo de electrones. Las dos subunidades de NifH son de color gris y de color marrón claro y las subunidades α-y β- de NifDK son de color rojo y azul claro, respectivamente. Los átomos son de color : Fe, naranja, S, amarillo, Mo, cyan, O, rojo, C, gris, N, de color azul oscuro, Mg, verde, Al, beige, F, de color azul claro. Tomado de Hu y Ribbe [91].

La reacción llevada a cabo por el complejo nitrogenasa es altamente costosa del punto de vista energético, ya que se utilizan 8 moléculas de ATP por cada molécula de amonio formada (16 por cada molécula de N₂ reducida). A su vez, la fijación de nitrógeno es sensible a la presencia de O₂. Debido a estas razones, los microorganismos diazótrofos desarrollaron intrincados mecanismos de regulación de la expresión y actividad de la FBN, con el fin de no fijar N₂ si existe otra fuente de N utilizable en el medio o el balance C/N es desfavorable, si la tensión de O₂ no es la adecuada para

Factor”), el regulador NifA hace contacto con la ARN-polimerasa y causa la formación del complejo abierto de transcripción, mediante hidrólisis de ATP.

Como la mayoría de los activadores transcripcionales dependiente del factor σ^{54} , NifA de *H. seropedicae* posee tres dominios (Fig. 12) [55]. El dominio N-terminal posee un dominio GAF (nombre proveniente de algunas de las proteínas donde se encuentra este dominio: fosfodiesterasa específica de cGMP, Adenilil ciclasas y FhIA), y su similitud con otras proteínas NifA es muy baja [182]. El dominio central es el responsable de la interacción con la holoenzima ARN polimerasa conteniendo el factor σ^{54} y el de la hidrólisis de ATP [67]. El dominio C-terminal posee un motivo de hélice-vuelta-hélice responsable de la unión al ADN [132]. El dominio central y N-terminal están separados por un separador interdominio. Al igual que en otras proteínas NifA presentes en α - y β -Proteobacterias, la proteína NifA de *H. seropedicae* posee cuatro cisteínas conservadas esenciales para su actividad, dos en el dominio central y dos en el separador interdominio, supuestamente involucradas en la coordinación de un sitio de unión a metal [55, 68, 141]. Existe evidencia preliminar de que este sitio corresponde a un clúster Fe-S [55].



Figura 12: Estructura de la proteína NifA de *H. seropedicae*. Se muestra el dominio GAF involucrado en la regulación por NH_4^+ , el dominio AAA-ATPasa, involucrado en la interacción con la ARN polimerasa y en la hidrólisis de ATP, el dominio de reconocimiento de ADN de estructura hélice-vuelta-hélice, y las cuatro cisteínas conservadas probablemente involucradas en la coordinación de un clúster 4Fe-4S.

La regulación de los genes *nif* en respuesta a la disponibilidad de amonio comienza con la acción de la proteína NtrC, que al igual que NifA, es un activador transcripcional dependiente del factor σ^{54} [55, 123]. Cuando la disponibilidad de N en forma de amonio es limitada, la proteína NtrC fosforilada activa la transcripción de genes involucrados en mecanismos alternativos de adquisición de N, entre ellos el gen *nifA*. La presencia de amonio también regula post-traduccionamente la actividad de NifA, por medio de un mecanismo en el que intervienen la proteína GlnK del tipo PII y el dominio GAF N-terminal de NifA. En este mecanismo el complejo

GlnK-UMP-NifA es la forma activa de la proteína. Un rápido aumento de la disponibilidad de amonio provoca la desuridilación de GlnK generando el complejo inactivo GlnK-NifA. Un tercer nivel de regulación de la fijación de nitrógeno por presencia de amonio es a nivel del complejo nitrogenasa, un proceso reversible conocido como “switch off”. En *H. seropedicae* las proteínas GlnK y AmtB estarían involucradas en este proceso mediante un mecanismo poco conocido [137, 138]. La figura 13 muestra un modelo de la regulación por presencia de amonio de los genes *nif* en *H. seropedicae*.

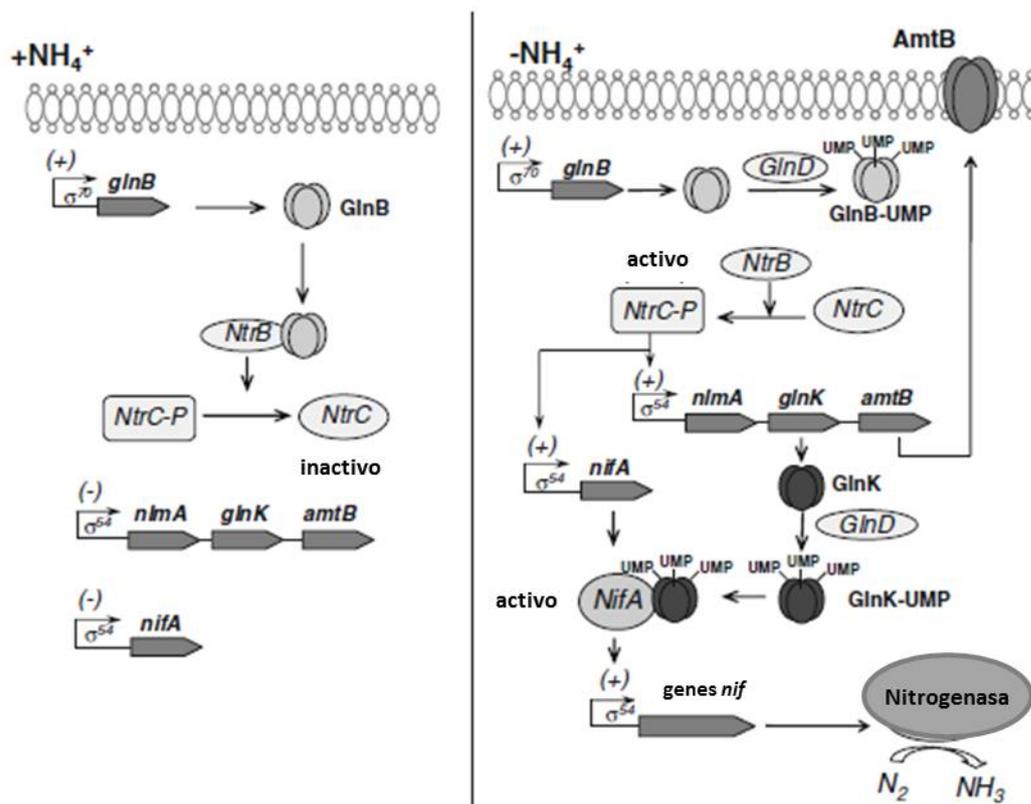


Figura 13: Modelo de la regulación transcripcional de la fijación de nitrógeno en *H. seropedicae*. GlnB se expresa constitutivamente a partir de un promotor dependiente de σ^{70} . En altos niveles de nitrógeno fijado, el aumento en la concentración de glutamina induce la desuridilación de GlnB por GlnD. En tales condiciones, NtrB inactiva a NtrC por desfosforilación (izquierda). Cuando el nivel de nitrógeno fijado es bajo, NtrB cataliza la fosforilación de NtrC, que activa la transcripción de los genes blanco, tales como *nifA* y el operón *nifAglnKamtB*. En estas condiciones, las proteínas GlnB y GlnK están completamente uridiladas por GlnD. GlnK uridilada activa a NifA, que a su vez activa la transcripción de los otros genes *nif* y por lo tanto permite la biosíntesis de la nitrogenasa (derecha). Adaptado de Chubatsu y col. [56].

Además del sitio de unión a NtrC, el promotor del gen *nifA* posee dos sitios de unión para el propio producto del gen de forma que la acción concertada de NtrC, NifA e IHF modulan la expresión del mismo [204, 205]. La regulación de los genes *nif* en respuesta a los niveles de O₂ ocurre directamente sobre la proteína NifA [183]. Aunque no del todo demostrado, se postula que un aumento en la concentración de O₂ inactivaría la proteína actuando sobre el probable clúster Fe-S coordinado por las cuatro cisteínas conservadas, [68, 213]. Las cisteínas conservadas no son esenciales para la unión de NifA al ADN, por lo que la inactivación por O₂ no afectaría esta actividad [141]. Debido a que NifA activa en parte su propia expresión, la inactivación provocada por la presencia de O₂ se traduce en una disminución de un 50% de la expresión del gen *nifA* [205]. Otro factor presumiblemente involucrado en la respuesta a O₂ es Fnr, el principal regulador responsable de activar el cambio de un metabolismo aerobio a uno anaerobio en *Escherichia coli* [129].

Como se mencionó anteriormente, la nitrogenasa posee en total 34 átomos de hierro. No es sorprendente que la disponibilidad de hierro imponga restricciones en la expresión, ensamblado y/o actividad del complejo nitrogenasa en microorganismos diazótrofos. En concordancia con esto, Klassen y col. [103] demostraron que la actividad nitrogenasa de *H. seropedicae* se vuelve dependiente de los productos de los genes *nifXHsero_2847* cuando la bacteria es crecida en medios limitados en hierro. A su vez, se observó que la actividad de la proteína NifA de *H. seropedicae* truncada en su dominio N-terminal expresada heterológicamente en *E. coli* estaba modulada por los niveles de hierro [183].

Sistemas de adquisición de hierro mediados por sideróforos en bacterias

Importancia biológica del hierro

El hierro es un elemento utilizado por diferentes proteínas como cofactor o grupo prostético, siendo numerosos los procesos metabólicos claves que dependen de este metal para su funcionamiento. Además de la ya descrita FBN, la respiración, fotosíntesis, ciclo de Krebs, tolerancia al estrés oxidativo, biosíntesis de aminoácidos, ácidos nucleicos y transporte de oxígeno, utilizan hierro como cofactor en una o varias de las enzimas implicadas en estos procesos [42]. Una de las razones de su participación en una gran diversidad de reacciones enzimáticas es la amplia gama de estados de oxidación que posee que van desde el -2 al +6 siendo los estados +2

(ion ferroso) y +3 (ion férrico) los más comunes. Este par redox tiene un potencial de reducción estándar de 0,77 V en el agua, muy cerca del par redox O_2/H_2O . Es así que el hierro era muy importante durante las primeras etapas de la evolución como aceptor final de electrones, y sigue cumpliendo esta función durante la reducción microbiana de Fe^{3+} , un proceso clave de muchos ciclos biogeoquímicos [124]. Además, varios reguladores transcripcionales (por ejemplo Fur y Per en bacterias) y pos-transcripcionales (IRP en mamíferos) interactúan con el hierro para detectar su nivel intracelular o el estado de estrés oxidativo, con el fin de controlar de manera eficiente la expresión de una amplia variedad de genes implicados principalmente en la adquisición de hierro o en la protección frente a especies reactivas de oxígeno (ROS, “Reactive Oxygen Species”) [125]. Es el cuarto elemento más abundante en la Tierra, constituyendo el 5% de la corteza terrestre, por lo que se considera que estaba altamente biodisponible durante el desarrollo de la vida en el primitivo planeta anaerobio. Con la aparición de la fotosíntesis oxigénica, el O_2 comenzó a acumularse en la atmósfera alrededor de 2.4 miles de millones atrás, un evento que se conoce como la “Gran Oxidación”. Las formaciones de hierro bandeado (BIFs), presentes en rocas sedimentarias precámbricas alrededor del mundo, son el registro geológico que señala la transición de un mundo anaeróbico a la moderna Tierra aeróbica. Este registro, también marca el cambio donde la biodisponibilidad de hierro pasó de la abundancia a la escasez, condición que se mantiene hasta nuestros días [42]. Esto se debe a que en presencia de O_2 y a pH neutro a básico, el ion Fe^{2+} soluble es oxidado a ion Fe^{3+} el cual reacciona con el agua formando complejos poliméricos de hidróxido férrico ($Fe_2O_3 \cdot nH_2O$) muy poco solubles y muy estables, llevando a una concentración de Fe^{3+} libre de 10^{-9} a 10^{-18} M dependiendo del pH del medio [125]. Típicamente, las bacterias precisan de concentraciones micromolares de hierro para crecer por lo tanto han desarrollado diversas estrategias para obtener y competir por el poco hierro disponible en el ambiente [5, 165].

Sideróforos

Los sistemas de captación de hierro utilizados por bacterias para enfrentar la baja disponibilidad del metal pueden implicar estrategias de contacto directo o indirecto con la fuente de hierro [125]. Los sistemas de contacto directo son aquellos donde un ligando específico presente en el ambiente es utilizado directamente como fuente de hierro. Este es el caso de algunos patógenos animales que pueden emplear como fuente de hierro compuestos comúnmente presentes en el hospedero, tales como citrato, hemina o diferentes proteínas (transferrina, lactoferrina y hemoglobina) [5, 42, 44, 54, 165]. Las desventajas de la captación directa son la necesidad de

poseer receptores específicos para cada fuente de hierro, y la restricción de colonizar sólo aquellos compartimentos donde dichas fuentes están disponibles.

En contraste, las estrategias indirectas son capaces de aprovechar todas las fuentes de hierro disponibles independientemente de su naturaleza. Una de las estrategias indirectas empleadas por muchos organismos es la reducción del ion Fe^{3+} a una forma más soluble como es el ion Fe^{2+} , esta reacción de reducción está en general asociada a una disminución de pH. Las bacterias han desarrollado mecanismos no enzimáticos para esta reducción, mediante la utilización de portadores móviles de electrones como compuestos redox, especialmente fenazinas y flavinas [124].

Otra estrategia ampliamente empleada está basada en la síntesis y liberación al medio extracelular de compuestos de bajo peso molecular altamente afines por el ion Fe^{3+} denominados sideróforos. La palabra sideróforo proviene del griego y significa transportador de hierro, *sidēros*: hierro, *φορος*: transportador. Esta estrategia involucra también la expresión de sistemas de transporte específicos para el complejo Fe^{3+} -sideróforo siendo este el sistema de captación de hierro de alta afinidad más extendido y exitoso en el mundo microbiano [5, 28, 44, 124, 125, 165]. Los sideróforos son moléculas orgánicas de bajo peso molecular (<2000 Da), diseñados para formar complejos fuertes y estables con el ion Fe^{3+} , con constantes de afinidad de alrededor 10^{30} M^{-1} [28, 125, 171]. Por su alta densidad de carga y pequeño radio iónico, el ion Fe^{3+} es un ácido fuerte de Lewis, y por lo tanto puede unir fuertemente bases fuertes de Lewis. En solución acuosa se encuentra solvatado, formando un complejo octaédrico $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$. Debido a la ganancia en la entropía, los átomos donadores de los sideróforos reemplazan favorablemente el agua y rodean el ion Fe^{3+} en un estado hexacoordinado que generalmente tiene una geometría octaédrica. Si el sideróforo contiene seis átomos donadores (hexadentado), se forma generalmente un complejo 1:1 Fe^{3+} -sideróforo. Si hay menos de seis átomos proporcionados por el ligando, las vacantes pueden estar ocupadas por donantes de oxígeno alternativos, tales como moléculas de agua, o pueden formarse complejos de mayor estequiometría Fe^{3+} -sideróforo, tipo 2:3, 2:1, 3:1. Los complejos Fe^{3+} -sideróforo muestran a menudo espectros UV-visible y de dicroísmo circular característicos, causados por la transferencia de carga del ligando al metal o de ligando a ligando [125]. Estas propiedades han sido utilizadas de manera predictiva para determinar la naturaleza de los ligandos en sideróforos de estructura desconocida.

Para coordinarse con el átomo de hierro, el ligando deberá poseer un par solitario de electrones con buenas propiedades de donadores [203]. Los sideróforos pueden clasificarse según la naturaleza química del grupo funcional bidentado que provee los átomos donadores para la

coordinación con el Fe^{3+} como sideróforos del tipo catecol, del tipo hidroxamato o del tipo α -hidroxicarboxilato. Si bien estos son los ligandos más comunes también se han encontrado otros ligandos como ser oxazolina, tiazolina, hidroxipiridina, β -hidroxicarboxilatos. Los sideróforos de tipo catecol unen hierro mediante los dos grupos hidroxilos adyacentes, presentes en el anillo catecol. Un ejemplo de sideróforo con tres grupos catecoles es la enterobactina sintetizada por *E. coli*. Las ferrioxaminas (producidas por hongos) son un ejemplo de sideróforo con tres grupos hidroxamato y la acromobactina (producida por *Dickeya dadantii* 3937 antes *Erwinia chrysanthemi* 3937), uno con tres grupos α -hidroxicarboxilato [165]. Sin embargo, la gran mayoría de los sideróforos contienen más de un tipo de grupo funcional. La estructura de los sideróforos se completa con cadenas carbonadas espaciadoras que conectan los grupos funcionales de manera de lograr una distancia y ángulo óptimos para la coordinación del metal [28, 125, 165, 203]. Varios cientos de estructuras de sideróforos han sido descritas hasta la fecha [85]. Para muchos sideróforos, se han reportado una gran variedad de estructuras estrechamente relacionadas. Por ejemplo, se han descrito más de 21 análogos de enterobactina y 20 análogos de ferrioxamina [170]. En la figura 14 se muestran estructuras de sideróforos representativos de diferentes tipos. Los sideróforos se clasifican también según su vía biosintética en aquellos que son sintetizados mediante la acción de las megaenzimas sintetetas de péptidos no ribosomales (Non-Ribosomal Peptide Synthetases, NRP-Sintetasas) y aquellos independientes de las mismas (NRP-Synthetases Independent Siderophore, NIS) [15, 45, 125]. Los sideróforos cuya biosíntesis es dependiente de NRP-Sintetasas poseen un esqueleto peptídico generalmente encapsulado en el extremo N-terminal por un ácido carboxílico del tipo arilo como el catecol, fenol o salicilato. El producto final de biosíntesis puede ser circular o lineal [203]. La enterobactina y las pioverdinas producidas por *Pseudomonas* spp. son ejemplos de sideróforos cuya biosíntesis es dependiente de NRP-Sintetasas (Fig. 14). Los mecanismos de acción y características de las NRP-Sintetasas serán descritos más adelante.

La aerobactina es un sideróforo del tipo NIS y es factor de virulencia en bacterias enteropatógenicas [203]. Su biosíntesis (Fig. 15), ha sido empleada como referencia para definir los sideróforos de este tipo [15, 45, 125]. La biosíntesis de la aerobactina a partir de lisina, citrato, acetil-CoA y O_2 comienza mediante la acción sucesiva de las proteínas lucD, lucB, lucA y lucC [203]. lucB y lucD son respectivamente una monooxigenasa y una acetilasa que actúan sobre la lisina para formar N^6 -acetil N^6 -hidroxilisina, creando así el grupo funcional hidroxamato de la aerobactina. Homólogos a estas dos enzimas son utilizados también en la biosíntesis de

sideróforos NRP-Sintetasas dependientes. La adición final de dos moléculas de N⁶-acetil N⁶-

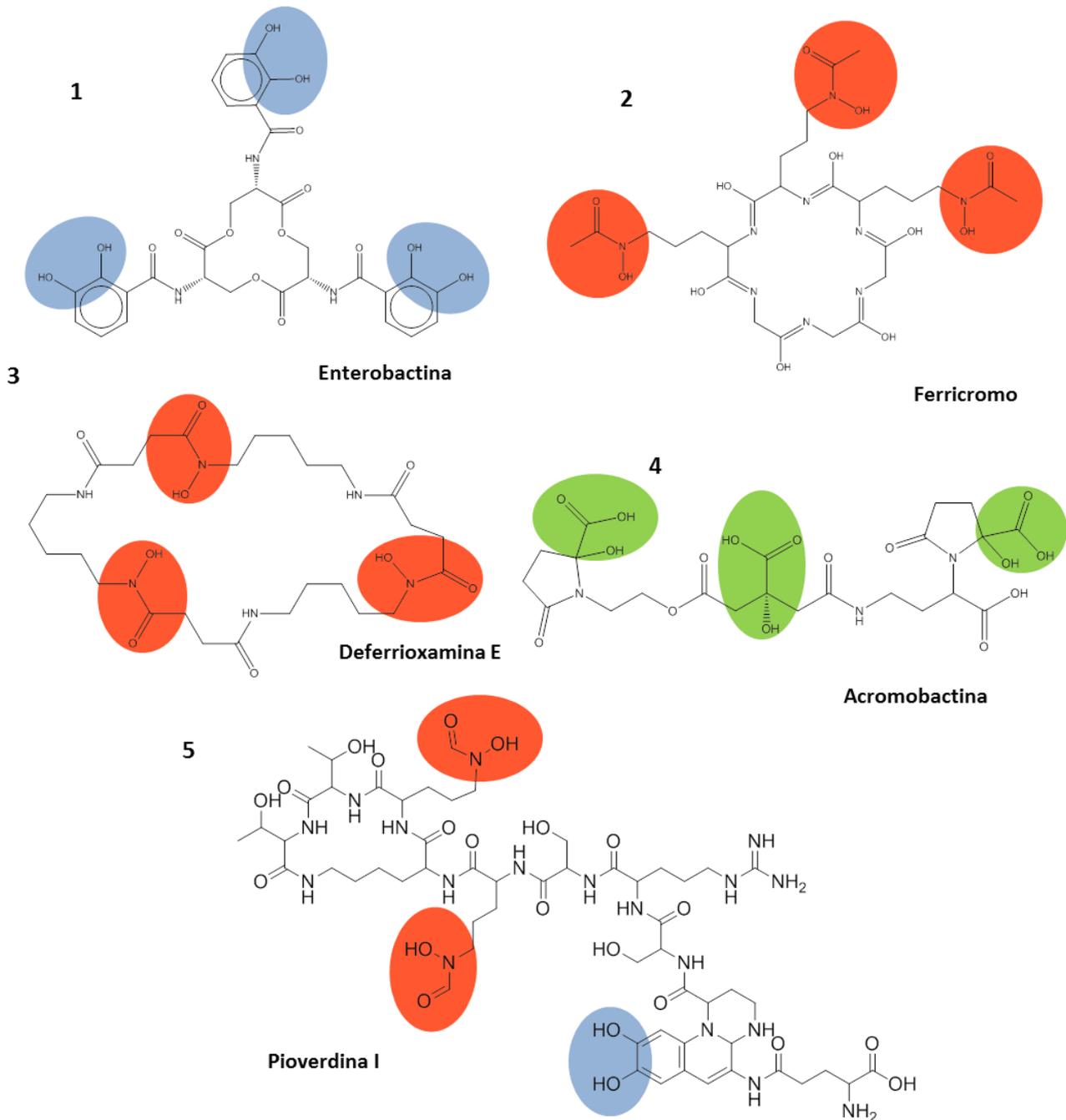


Figura 14: Sideróforos representativos de las diferentes clases. 1) La enterobactina, es un sideróforo con tres grupos catecol (azules), sintetizado por una NRP-Sintetasa; 2) El ferricromo también es sintetizado por NRP-Sintetasas pero posee tres grupos hidroxamatos (anaranjados); 3) La deferrioxamina E es un sideróforo NRP-Sintetasa independiente con tres grupos hidroxamato; 4) La acromobactina es también NRP-Sintetasa independiente pero posee tres grupos α -hidroxicarboxilatos (verdes); 5) la pioverdina I es un sideróforo peptídico mixto, con un grupo catecol y dos grupos hidroxamatos.

hidroxilisina a una molécula de citrato, es llevada a cabo en dos pasos discretos por un heterodímero dependiente de NTP formado por *lucA-lucC*. Estas dos proteínas, que catalizan el penúltimo y último paso de síntesis de la aerobactina, son los prototipos de enzimas involucradas en la biosíntesis de sideróforos NIS. Todos los sideróforos de este tipo conocidos hasta la fecha requieren para su síntesis al menos una enzima homóloga a *lucA* o *lucC* [125].

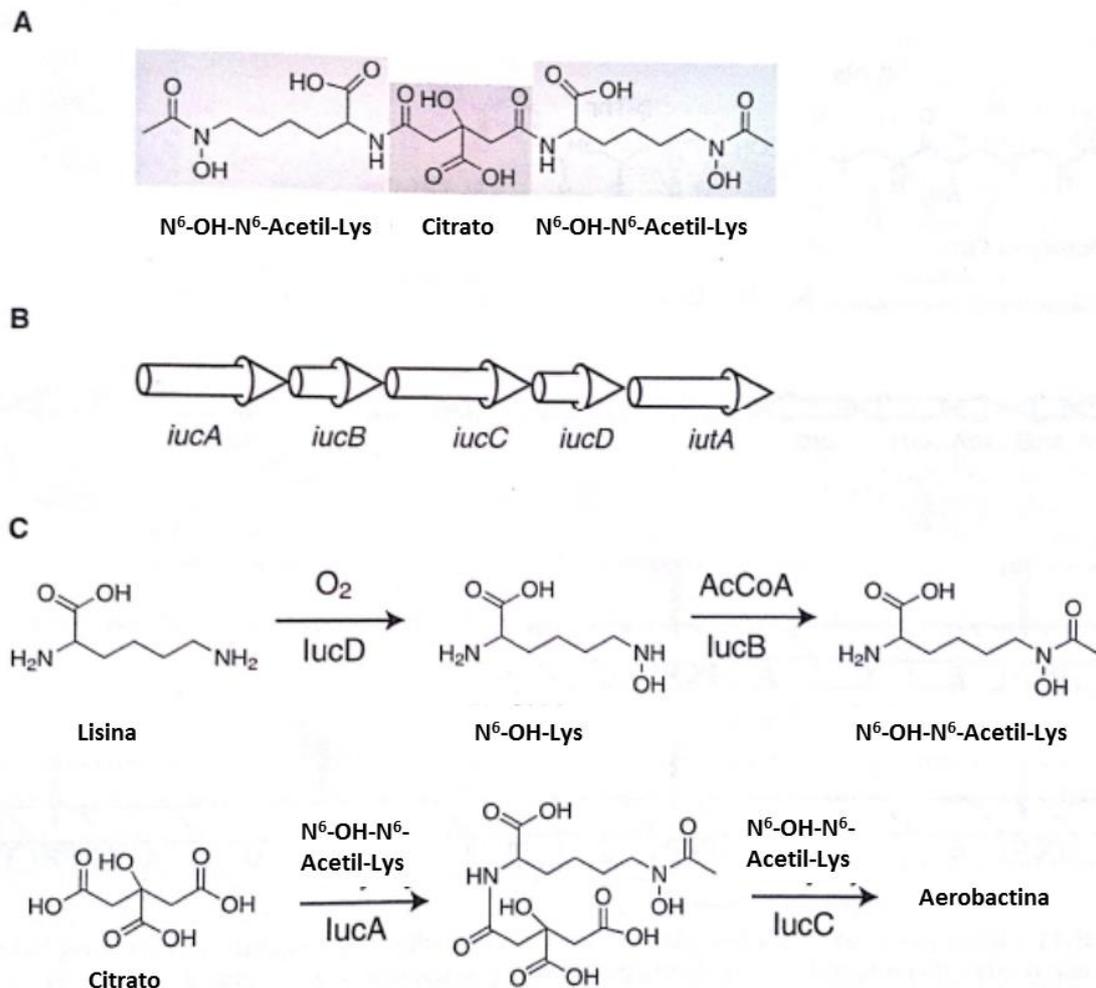


Figura 15: Biosíntesis de la aerobactina, un sideróforo NRPS independiente. A) Estructura de la aerobactina. B) Estructura de los genes de biosíntesis de la aerobactina. C) Esquema de la biosíntesis de este sideróforo. Adaptado de Walsh y Marshall [205].

Otro tipo especial de sideróforos son los sideróforos anfifílicos. Dichos sideróforos son producidos como familias de compuestos que comparte un núcleo común responsable de la unión al ion Fe^{3+} , al cual se le anexan ácidos grasos de longitud variable [165]. Estos sideróforos se ha encontrado

generalmente asociado a bacterias marinas, existiendo ejemplos tanto del tipo dependiente de NRP-Sintetasas como del tipo NIS. Otra característica de la mayoría de los sideróforos marinos, es que poseen como grupo de unión a hierro hidroxycarboxilatos (β -hidroxiaspartato o citrato), lo cual provoca que el complejo Fe^{3+} -sideróforo sea fotorreactivo. La fotólisis sobre el complejo provoca la oxidación del ligando, liberación de CO_2 y la reducción del ion Fe^{3+} a ion Fe^{2+} [14, 31, 88, 120, 201, 202]. Se ha propuesto que ambas características podrían ser adaptaciones al medio marino [31, 201]. Sin embargo, también existen bacterias terrestres que producen sideróforos con estas dos características (Fig. 16), como es el caso de la corrugatina y ornicorrugatina de *Pseudomonas* spp. [122], las ornibactinas de *Burkholderia* spp. [2, 185], la rhizobactina 1021 de *Sinorhizobium meliloti* 1021 [135, 179], la cupriaquelina de *Cupriavidus necator* H16 [109] y la taiwaquelina de *Cupriavidus taiwanensis* LMG19424 [110].

Transporte y regulación de la biosíntesis de sideróforos

Debido a su tamaño y a su polaridad, los complejos Fe^{3+} -sideróforo no pueden atravesar pasivamente la membrana externa de las bacterias Gram-, ni a través de los poros formados por las porinas ni difundiendo a través de la bicapa lipídica. Es entonces que para la internalización del complejo al periplasma, es necesaria la producción de receptores específicos que reconozcan y transporten el complejo [54]. Todos los transportadores de membrana involucrados en la captación de Fe^{3+} ya sean los específicos para sideróforos así como para hemina, lactoferrina, citrato, etc., pertenecen a una familia de transportadores conocidos como transportadores TonB-dependientes. La vitamina B12, complejos quelantes de níquel y algunos carbohidratos son transportados también por esta familia de proteínas. Existen doce transportadores TonB-dependientes cuya estructura cristalográfica ha sido elucidada. Algunos transportadores han sido cristalizados con o sin ligando, o en complejo con la proteína TonB, totalizando un total de 45 estructuras disponibles [136]. El análisis de su estructura indica que los transportadores de este tipo consisten en un barril conformado por 22 hojas beta, ocluido en el centro por un dominio globular denominado "corcho" de 160 aminoácidos el cual separa un bolsillo superior en contacto con el medio externo celular y un bolsillo inferior en contacto con el periplasma [125, 136, 165]. Para internalizar el compuesto al periplasma, el corcho debe ser movilizado a fin de permitir la translocación del compuesto desde el bolsillo superior al bolsillo inferior. La energía necesaria para dicho cambio conformacional es proporcionada por la proteína TonB. Esta proteína está anclada a la membrana interna y su región extracitoplásmica puede atravesar el periplasma entero. Junto con las proteínas de membrana citoplasmática ExbB y ExbD, TonB acopla la energía del gradiente

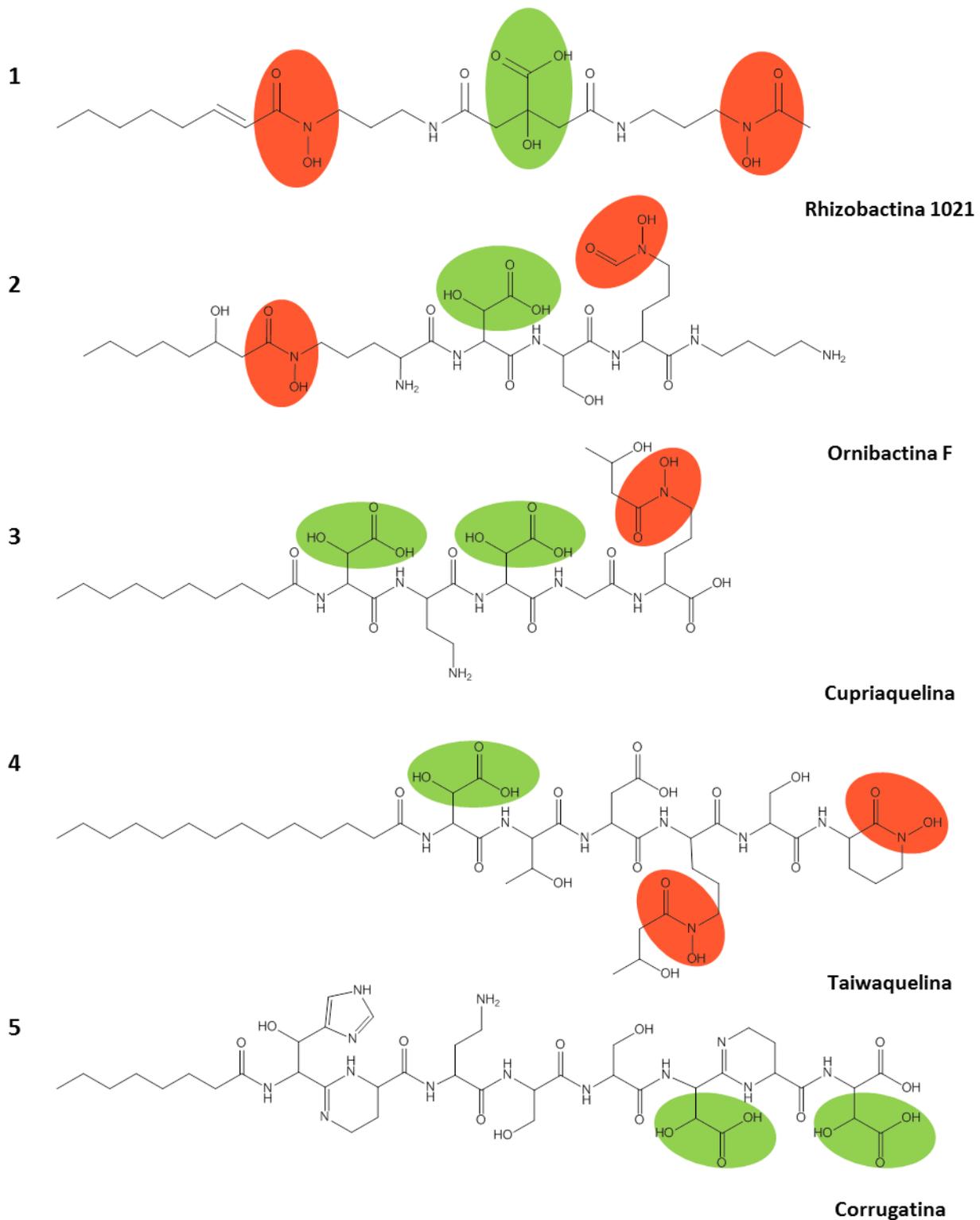


Figura 16: Sideróforos anfílicos producidos por bacterias terrestres. 1) La rhizobactina 1021, sideróforo NRP-Sintetasa independiente producido por *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti* 1021; 2) la ornibactina F, producida por varias cepas del género *Burkholderia*; 3) Cupriaquelina, producido por *Cupriavidus necator* H16; 4) Taiwaquelina, producido por *C. taiwanensis* LMG19424; y 5) corrugatina, producido por *Pseudomonas corrugata*. La ornicorrugatina, descrita en *P. fluorescens* AF76, posee en el cuarto residuo una ornitina en lugar de un ácido diaminobutanoico.

de protones generada en la membrana interna al transportador ubicado en la membrana externa permitiendo la entrada del compuesto al periplasma [111]. Se estima que cada receptor interactúa con una proteína TonB acoplada a dos unidades de ExbD y siete unidades de ExbB [86]. El reconocimiento y la unión específica del ligando, se da a través de los residuos presentes en la parte extracelular del dominio corcho y en los residuos de las paredes del barril presentes en el bolsillo superior y que sobresalen hacia fuera de la membrana externa. El dominio conservado de interacción con la proteína TonB, denominado caja TonB o “TonB box”, se encuentra en el extremo N-terminal del corcho, dirigido hacia el periplasma. Una vez que el dominio TonB box interactúa con la proteína TonB energizada, se produce un corrimiento del dominio corcho permitiendo la movilización del compuesto de un bolsillo al otro. A pesar de años de investigación, los detalles moleculares de la acción del complejo TonB-ExbB-ExbD sobre los transportadores TonB dependientes no son aún del todo claros [111, 136].

El mecanismo más generalmente encontrado para la importación del complejo Fe^{3+} -sideróforo al citoplasma utiliza sistemas de transportadores del tipo ABC [170]. Estos sistemas de importación comúnmente consisten en cinco dominios estructurales: una proteína de unión periplásmica (PBP, “Periplasmic Binding Protein”), dos polipéptidos transmembrana que forman un canal a través del cual atraviesa el complejo la membrana interna, y dos subunidades de unión a nucleótidos que hidrolizan ATP. Las permeasas y ATPasas son generalmente ensambladas a partir de cuatro polipéptidos separados. Una vez en el bolsillo inferior, el complejo Fe^{3+} -sideróforo es reconocido específicamente y transportado por la PBP correspondiente y transportado hasta la permeasa para su internalización acoplándose la hidrólisis de ATP a este transporte. En bacterias Gram+, proteínas homólogas a las periplásmicas, pero ancladas a la membrana, reconocen al complejo Fe^{3+} -sideróforo, y lo presentan al transportador ABC correspondiente [124, 171].

En algunas vías de internalización de sideróforos, este paso también se puede llevar a cabo por permeasas dependientes de la fuerza protón-motriz de la membrana, sin la utilización de ATPasas ni PBPs evidentes. Un ejemplo es la permeasa RhtX, implicada en el transporte de rhizobactina 1021 de *Ensifer meliloti*. Otros ejemplos son las permeasas FiuB y FptX, utilizadas en las vías de internalización de ferricromo y pioquelina respectivamente en *Pseudomonas aeruginosa* [170]. Por su parte, el complejo férrico del sideróforo legiobactina, producido por *Legionella pneumophila* es introducido al citoplasma a través de la proteína LbtC, perteneciente a la superfamilia de proteínas de membrana MFS (“Major Facilitator Superfamily”) [49].

La liberación del hierro presente en el complejo Fe^{3+} -sideróforo puede darse a través de dos mecanismos: el primero involucra la acción de enzimas específicas que hidrolizan la molécula de

sideróforo liberando al ion Fe^{3+} ; el otro mecanismo consiste en la reducción del ion Fe^{3+} a Fe^{2+} , liberándose el ion por pérdida de afinidad por el sideróforo [170]. Esta última estrategia, al ser no destructiva, permite el reciclaje del sideróforo [54, 124]. También, esta estrategia de reducción puede darse a nivel del periplasma, siendo el ion Fe^{2+} generado, transportado al citoplasma mediante un mecanismo del tipo ABC análogo al descrito para los sideróforos pero específico para el transporte del ion ferroso [125].

Los sistemas de secreción de sideróforos han sido menos estudiados y es mucho menos lo que se sabe respecto a aquellos implicados en la internalización de los complejos Fe^{3+} -sideróforo. Se han descrito como involucradas en la secreción proteínas del tipo MFS, RND (“Resistance, Nodulation, and cell Division superfamily”) y de la superfamilia ABC [125, 142, 211].

La reacción de oxígeno con el ion ferroso, además de generar el ion férrico produce, mediante la reacción de Fenton, radicales hidroxilos altamente dañinos para la célula. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) como es el caso de los radicales hidroxilo, pueden reaccionar e inactivar moléculas claves para la vida celular como los lípidos, ADN y proteínas en general [54, 121]. Por esta razón, muchas bacterias han desarrollado sistemas rigurosamente regulados que mantienen la homeostasis del metal de forma que se satisfagan las funciones esenciales y se eviten los daños a la célula. Se debe entonces lograr un fino balance entre los mecanismos de importación, exportación y almacenado de hierro, así como un control en la producción de enzimas que utilizan el metal como cofactor y expresión de enzimas detoxificadoras de ROS [121, 125, 136, 165].

En las bacterias, la regulación de genes implicados en la homeostasis del hierro es llevada a cabo generalmente mediante la acción transcripcional de un regulador global. Para el caso de la mayoría de las bacterias Gram- y Gram+ de bajo contenido GC dicho regulador global es la proteína Fur (“Ferric Uptake Regulator”). En bacterias Gram+ de alto contenido GC dicha función la realiza DtxR (Diphtheria Toxin Regulator) [5, 125, 165]. En los α -rizobios y otros géneros bacterianos pertenecientes a las α -Proteobacterias, las proteínas homólogas a Fur se han rebautizado Mur (“Manganese Uptake Regulator”), debido a que su función consiste en la regulación de genes implicados en la adquisición de manganeso y no de hierro [148]. En este grupo de bacterias, las proteínas Irr y RirA son quienes cumplen el papel de reguladores globales de la homeostasis de hierro [140].

El mecanismo de regulación mediado por Fur es quizás el más estudiado. En presencia de hierro e ion Fe^{2+} como cofactor, Fur se une a secuencias de ADN específicas llamadas cajas Fur presentes en los promotores de genes que regula, ubicadas concretamente en las regiones adyacentes a los sitios de unión de la ADN polimerasa, reprimiendo de esta forma la expresión de docenas de

genes. Cuando la disponibilidad de hierro es limitada, la proteína apo-Fur no puede unirse a estas cajas Fur permitiendo la expresión de genes que codifican para transportadores de hierro y de proteínas implicadas en la biosíntesis de sideróforos, así como de genes involucrados en otras funciones celulares, como respuesta al estrés oxidativo, variadas vías metabólicas y genes de virulencia [121, 125, 136, 165]. Se demostró que varios genes también son regulados positivamente por el complejo Fe^{2+} -Fur. La regulación positiva puede ser debida a un mecanismo de acción directo [56-58], donde el complejo Fe^{2+} -Fur se une al ADN o mediante un mecanismo que implica la acción de moléculas de pequeños ARNs. Por ejemplo en *E. coli* y *P. aeruginosa* se han identificado pequeños ARNs (RhyB en *E. coli* y PrrF1 y PrrF2 en *P. aeruginosa*) cuya expresión está reprimida por el complejo Fe^{2+} -Fur y que a su vez regulan negativamente, y de forma post-transcripcional, la expresión de numerosos genes que codifican para enzimas que poseen hierro como cofactor [121, 136].

Además de los sistemas de represión global, diversos reguladores transcripcionales están involucrados en la regulación de la expresión de sideróforos bacterianos. Generalmente actúan como activadores, su expresión puede estar bajo control del regulador global, y suelen responder a señales intra- o extracelulares que activan su función. Los reguladores descritos hasta el momento son: (i) factores σ alternativos, (ii) sistemas de dos componentes, (iii) reguladores del tipo AraC, o (iv) otros tipos de reguladores transcripcionales [125]. En la figura 17 se muestra en forma esquemática los sistemas de transporte, biosíntesis y regulación de la producción de sideróforos en bacterias Gram-.

Otros aspectos de la biología de sideróforos

Estudios sobre la química, biología y ecología de sideróforos han mostrado que estas moléculas poseen otros aspectos de importancia biológica además de los estrictamente vinculados a la adquisición de hierro como fuente nutricional. Por ejemplo, varios sideróforos son capaces de formar complejos con otros metales con una alta afinidad, colaborando a la captación de estos metales [79, 170, 171]. Interesantemente, se ha visto que algunos sideróforos puede inclusive complejear y colaborar en la internalización de molibdeno y de vanadio, ambos metales necesarios para la FBN [171]. La observación de que los metales tóxicos inducen la producción de algunos sideróforos sugiere que estos quelantes pueden desempeñar un papel en la tolerancia bacteriana a metales pesados [108, 171].

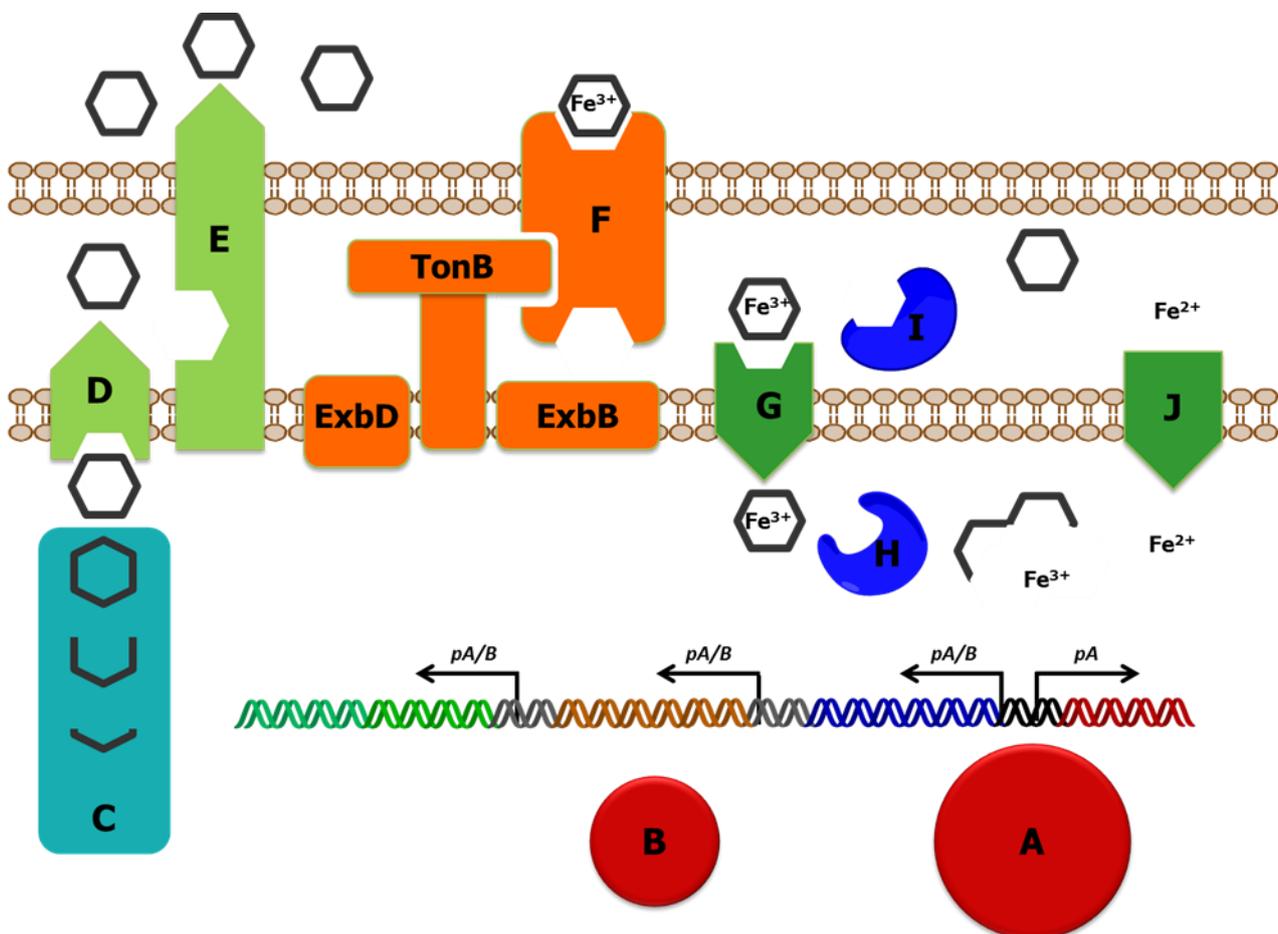


Figura 17: Sistemas de adquisición de hierro mediados por sideróforos en bacterias Gram-. Para mantener la homeostasis de hierro en el interior celular las bacterias utilizan un regulador global (A) de los sistemas de adquisición de hierro. La mayoría de estos reguladores globales son represores que en condiciones limitantes de hierro permiten la expresión de promotores reconocidos por el regulador (pA). Este represor puede alternativamente desreprimir la expresión de un regulador secundario (B) que activa los genes implicados en la biosíntesis y transporte de sideróforos (pB). Las enzimas de biosíntesis de sideróforos (C) pueden incluir o no NRP-Sintetasas. El sideróforo es secretado al periplasma a través de proteínas de membrana interna (D), pudiendo ser transportadores de las superfamilias ABC, MFS o RND. La secreción del periplasma al medio extracelular puede darse a través de bombas de eflujo (E). Una vez formado, el complejo Fe^{3+} -sideróforo es reconocido por receptores específicos en la membrana externa (F) y el complejo es internalizado al periplasma con la ayuda del complejo TonB-ExbB-ExbD. El complejo Fe^{3+} -sideróforo puede ser internalizado al citoplasma a través de proteínas de membrana interna (G) de las superfamilias ABC, MFS o de permeasas dependientes de la fuerza protón-motriz de la membrana. Una vez en el interior celular, el complejo puede ser degradado por esterasas (H) liberándose el Fe^{3+} . El hierro puede ser obtenido también a través de Fe-reductasas (I), presentes en el periplasma o en el citoplasma. En el caso de las primeras el ion Fe^{2+} es internalizado al citoplasma mediante sistemas de transporte del tipo ABC (J).

Las propiedades de los sideróforos han sido aprovechadas también en el área médica. Por ejemplo, pacientes con la enfermedad β -talasemia que poseen elevados niveles de hierro libre en la sangre son rutinariamente tratados con el sideróforo deferroxamina B (conocido bajo el nombre comercial de Desferal). Este compuesto se une con alta afinidad al ion Fe^{3+} presente en el suero y promueve su secreción en la orina [54]. Otro uso médico prometedor son los antibióticos “Caballos de Troya”. Dichos antibióticos son moléculas conjugadas entre un sideróforo y un antibiótico. La ventaja de usar el sideróforo es que se aprovecha el ingreso activo del mismo a través de transportadores TonB-dependientes activamente expresados por el patógeno a tratar. La albomicina es un ejemplo de este tipo de antibiótico [125].

La producción de sistemas efectivos de adquisición de hierro mediados por sideróforos es clave en la competencia por este nutriente limitante en comunidades microbianas. Sin embargo, existe una estrategia alternativa más favorable: la piratería de sideróforos. Se llama así a la habilidad que poseen las bacterias de producir una gran variedad de diferentes receptores TonB-dependientes, cada uno con su propia especificidad, con el fin de “robar” sideróforos heterólogos cargados con hierro, ahorrándose el costo energético de sintetizar el quelante [115, 194]. Las diferencias en las afinidades de los sideróforos que son producidos por diferentes especies también pueden incidir en la competencia entre microorganismos [84]. Este mecanismo es uno de los empleados por las bacterias biocontroladoras para inhibir el crecimiento de microorganismos deletéreos [39, 73, 80]. Además, se han descrito casos en actinomicetos del suelo dónde los sideróforos, además de ser usados para la competencia por el hierro, sirven como señales que alteran la expresión génica y el desarrollo morfológico de especies competidoras [194].

Como se mencionó anteriormente, la rhizobactina 1021 es un sideróforo anfifílico del tipo NIS producido por el rizobio simbiote de alfalfa *E. meliloti* 1021 [179]. Al igual que en otros lipopéptidos no sideróforos producidos por *P. aeruginosa*, la naturaleza lipídica de la rhizobactina 1021 ha sido propuesta como importante para el movimiento de “swarming” en esta bacteria [21, 135].

Participación de sideróforos en las interacciones bacteria-hospedero

Al hierro se le ha adjudicado una participación clave en las interacciones bacteria-hospedero. El poseer sistemas altamente eficientes para su adquisición es un pre-requisito para que la bacteria logre sobrevivir en el organismo al cual infecta [206]. Con el fin de defenderse de las bacterias invasoras, los mamíferos tratan de crear un ambiente hostil, que incluye una concentración muy baja de hierro, lograda mediante la secreción de proteínas que unen fuertemente el metal. Esta

“batalla por el hierro” se considera como una parte integral de la respuesta inmune innata [54]. Por ejemplo, las hemoproteínas, como la hemoglobina contienen casi dos tercios del total de hierro en forma de hemo. La ferritina, cuya función es almacenar hierro intracelularmente, puede llegar a poseer 4.500 átomos de Fe^{3+} por oligómero. Para acceder a fuentes intracelulares de hierro como la hemoglobina, algunas bacterias secretan proteasas, hemolisinas o citolisinas.

En el plasma, el hierro circulante está fuertemente unido a proteínas de transporte como la transferrina, o a proteínas de defensa como la lactoferrina. La presencia de estas proteínas lleva a que la concentración de hierro libre en el suero sea de 10^{-24} M [125]. Se ha encontrado que algunas bacterias patógenas son capaces de emplear a la transferrina o a la lactoferrina como fuentes de hierro nutricional [5, 44, 54, 165].

La expresión de sideróforos ha demostrado ser necesaria para lograr un proceso de infección exitoso por varios patógenos animales, como es el caso de algunas especies bacterianas pertenecientes a los géneros *Shigella*, *Bordetella*, *Escherichia* o, *Staphylococcus* [42]. Sin embargo, dicha importancia depende en gran medida del nicho que se colonice, de la especie de hospedero y del estadio de infección [42, 206]. Por ejemplo, la enterobactina en *E. coli* uropatógenas sería necesaria para la colonización intestinal. Sin embargo, durante la colonización del tracto urinario, la producción de salmoquelina (una variante de enterobactina) o de yersiniabactina es más importante para la colonización de dicho nicho. A su vez, la producción de aerobactina sería necesaria para colonizar el tracto urinario de ratones pero no así el de humanos [145]. Debido a la variedad y a los cambios ambientales que sufren los microbios al invadir un hospedero, la necesidad de tener una batería amplia de mecanismos de adquisición de hierro se vuelve indispensable [206].

En fitopatógenos la importancia de los sideróforos en la interacción es menos clara, y en general depende del sistema huésped-patógeno estudiado [144]. La bacteria *Dickeya dadantii* 3937 produce dos sideróforos, achromobactina y chrysobactina, ambos necesarios para la virulencia de violetas africanas. Mutantes no productoras de sideróforos en *Erwinia amylovora* son deficientes en la virulencia de manzanos. Sin embargo, *Petrobacterium carotovorum* (antes *Erwinia carotovorum*) no requiere de la producción de sideróforos para una colonización exitosa [70]. La cepa *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B301D, un patógeno de durazneros, no requiere del sideróforo pioverdina para la virulencia. La cepa *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, patógeno de tomate, produce yersiniabactina, pioverdina y puede utilizar citrato férrico como fuente de hierro. Una triple mutante en los transportadores de membrana externa de las tres moléculas mantiene

su virulencia [98]. Mutantes deficientes en la producción de sideróforos de los fitopatógenos *Ralstonia solanacearum* y *Agrobacterium tumefaciens* mantienen su virulencia [144].

En cuanto a la disponibilidad de Fe^{3+} dentro de plantas no es mucho lo que se sabe. En plantas de poroto la disponibilidad fue evaluada utilizando una cepa de *Pseudomonas syringae* conteniendo el gen reportero GFP bajo control de un promotor inducible a bajas concentraciones de hierro. Los resultados obtenidos indicaron que existe una considerable heterogeneidad de la biodisponibilidad de hierro en el interior de las plantas [99].

La importancia de los sistemas de adquisición de hierro en endófitos es en gran parte desconocida. En las bases de datos existen 12 genomas completamente secuenciados de endófitos, los cuales muestran una gran cantidad de copias de receptores TonB dependientes [157].

En el caso de plantas de arroz, cuando éstas son cultivadas en régimen de inundación, las raíces se encuentran en un ambiente anóxico, por lo cual la solubilidad del hierro no debería ser una limitante. Sin embargo, la raíz del arroz obtiene oxígeno a través de su aerénquima y, por lo tanto, la biodisponibilidad del hierro podría verse reducida. Los datos obtenidos a partir del análisis del metagenoma de endófitos de arroz mostraron un alto número de genes que codifican proteínas implicadas en la biosíntesis de sideróforos, receptores TonB-dependientes así como proteínas de almacenamiento de hierro [177]. Los autores sugieren a partir de estas evidencias que el interior de la raíz parece ser un microambiente extremadamente agotado de hierro biodisponible, sin embargo, dichos genes podrían ser necesarios en otras etapas del ciclo de vida de los endófitos.

Un estudio de la dinámica de la diversidad de endófitos cultivables durante todo el ciclo de cultivo de plantas de arroz, demostró que las raíces presentaban mayor número de bacterias productoras de sideróforos en comparación con el suelo circundante, y que este grupo aumentaba a medida que la planta crecía [114]. Los autores proponen que la capacidad de producir sideróforos es útil para la colonización y la permanencia de los endófitos en los tejidos de la planta. Todos estos datos sugieren que los sistemas de adquisición de hierro tienen un papel relevante en parte o la totalidad del ciclo de vida de los endófitos.

Péptidos de síntesis no ribosomal

Péptidos de biosíntesis no ribosomal

Además de sideróforos, los microorganismos producen péptidos de biosíntesis no ribosomal (“Non Ribosomal Peptides”, NRPs) con variadas funciones biológicas tales como participación en la motilidad “swarming” y la formación de biofilms [152]. Junto con derivados de los poliquétidos, los NRPs cubren actualmente más del 50% de los medicamentos en uso clínico, entre los cuales hay antibacterianos, antifúngicos, antivirales, citostáticos, inmunosupresores, antihipertensivos, antidiabéticos, antipalúdicos y reductores de colesterol. También derivados de estas dos familias de productos naturales se utilizan en la industria agraria y de alimentos como antiparasitarios, coccidiostáticos, promotores de crecimiento animal e insecticidas naturales [29, 134, 215]. Por estas razones durante la última década, el estudio de NRPs ha recibido un fuerte impulso [13, 46, 134].

Esta diversidad en la bioactividad de los NRPs es debida a que los residuos utilizados por las NRP-Sintetasas no se limitan a los 20 aminoácidos proteínogénicos, sino que abarca 500 monómeros diferentes, incluyendo aminoácidos no proteínogénicos, ácidos grasos y α -hidroxiácidos [187]. La síntesis de un NRP se da en el sentido N-terminal hacia C-terminal siguiendo una línea de ensamblado que puede incluir uno o varios polipéptidos de NRP-Sintetasas diferentes. Cada NRP-Sintetasa se compone de uno o varios módulos de entre 1000 y 1500 aminoácidos cada uno, siendo cada módulo responsable de la incorporación de un monómero. De acuerdo con la regla de co-linearidad, el número y el orden de los módulos representa el número y el orden de los residuos en el producto final [76, 134]. A su vez, la secuencia aminoacídica de cada módulo da información sobre la identidad de cada monómero y las modificaciones químicas que se producen en cada paso [187].

Cada módulo está dividido en dominios catalíticos. Hay tres tipos de dominios esenciales presentes en todos los módulos: 1) el dominio de adenilación (dominio A), 2) el dominio portador de péptido (Peptidyl-Carrier Protein, PCP) y 3) el dominio de condensación (dominio C). Un cuarto dominio presente en casi todas las NRP-Sintetasas es el dominio tioesterasa (TE), situado siempre en el extremo C-terminal del último módulo de la línea de ensamblado [76, 134, 187].

El dominio A (~550 aminoácidos) posee dos funciones: primero reconoce específicamente el aminoácido o hidroxiácido a ser insertado en la cadena y segundo, activa dicho residuo mediante

adenilación del mismo. Posteriormente, el residuo activado se transfiere al grupo tiol del cofactor 4-fosfopanteteinil (“4-Phosphopantetheinil”, PPT) presente en todos los dominios PCP. Este dominio (~80 aminoácidos) facilita el transporte ordenado de sustratos y evita la difusión de los mismos, por lo tanto, maximiza la eficiencia catalítica de la biosíntesis mediada por NRP-Sintetasas. La formación del enlace peptídico está mediada por el dominio C (~450 aminoácidos). Este dominio cataliza el ataque nucleofílico del grupo α -amino del aminoácido unido al dominio PCP del módulo siguiente, al grupo electrofílico del tioéster del aminoácido (o péptido) unido al dominio PCP de su propio módulo. Finalmente, el dominio TE (~280 aminoácidos) en el módulo terminal, cataliza la liberación del péptido por hidrólisis o macrociclización [76]. La figura 18 muestra el mecanismo básico de elongación en una NRP-Sintetasa.

Otro aspecto que contribuye a la enorme diversidad estructural y actividades biológicas de los NRPs es la presencia en los módulos de otros dominios enzimáticos además de los tres dominios clásicos. Estos dominios extra son responsables de la modificación de los residuos o de la cadena peptídica naciente mediante epimerización, heterociclación, oxidación, metilación, halogenación o del agregado de un ácido graso al extremo N-terminal [76, 203]. El dominio de epimerización estaría implicado en la conversión de L-aminoácidos a su forma D. El poseer D-aminoácidos en la estructura permitiría que el péptido no sea degradado por proteasas específicas para L-aminoácidos. Por otra parte, la conformación D- puede ser esencial para la conformación bioactiva de un NRP. La racemización de los aminoácidos es llevada a cabo por dominios E (Epipimerasa) o por dominios duales E/C. Con el fin de asegurar la incorporación selectiva del D-aminoácido en la cadena principal del péptido, las NRP-Sintetasas poseen dominios C funcionalmente adaptados para condensar un residuo en configuración D con el siguiente residuo en configuración L. Los dominios de heterociclación (Cyc) sustituyen al dominio C formando primero el enlace peptídico y posteriormente catalizan la ciclación de residuos de cisteína, serina o treonina. Los dominios C, E, E/C y Cyc están filogenéticamente emparentados y su funcionalidad puede ser predicha mediante herramientas filogenéticas [153]. Los dominios OX (Oxidación) están exclusivamente asociados a un dominio Cyc, y son responsables de la oxidación del producto ciclado generando tiazoles u oxazoles aromáticos. Los dominios M (Metilación) pueden metilar átomos de C o N en los aminoácidos cambiando así las propiedades iónicas y la hidrofobicidad. Mediante la acción de halogenasas pueden generarse NRPs que contienen cloro, bromo o yodo, alterando significativamente su actividad [76, 203]. Además de los ya nombrados sideróforos, existen otros NRPs lipopéptidicos con actividades antibacterianas, surfactantes, entre otras [13,

componentes involucrados en la síntesis de los precursores, modificaciones pos-traduccionales, regulación, exportación y /o resistencia [13, 159, 186, 187]. Existen tres tipos de genes flanqueantes esenciales para un correcto funcionamiento de la mayoría de las NRP-Sintetasas. Uno de ellos se corresponde a los genes que codifican para la enzima PPT-transferasa, encargada de agregar pos-traduccionamente el cofactor PPT a los dominios PCP. Una segunda familia comprende a los genes que codifican para las tioesterasas del tipo II (TEII), las cuales hidrolizan el enlace tioéster de los aminoácidos incorrectamente cargados en los dominios PCP [76]. El tercer tipo se corresponde a los genes que codifican para una familia de proteínas conocidas como del tipo MbtH. Se ha postulado que la función de estas pequeñas proteínas sería estimular las reacciones de adenilación de los dominios A [12].

Mediante técnicas de ingeniería genética y tomando como referencia la “lógica” del mecanismo de acción de las NRP-Sintetasas, se ha intentado obtener variantes artificiales de NRPs, por ejemplo mediante biosíntesis combinatoria, donde se intercambian módulos diferentes para obtener nuevos compuestos [3] o mediante mutaciones deletéreas de genes intermediarios, o de modificación o mutaciones puntuales de dominios A [150]. Otra técnica que se ha desarrollado para la síntesis quimioenzimática de NRPs, se ha basado en la utilización de la síntesis de péptidos en fase sólida y posterior macrociclización de los mismos con dominios tioesterasa expresados heterológamente [76, 106].

Bioinformática aplicada al estudio de NRPs

La primera estructura cristalográfica de una NRP-Sintetasa fue la correspondiente al dominio A del extremo N-terminal de la gramicidina sintetasa (GrsA). Dicha estructura se logró con el sustrato específico, fenilalanina, unido al sitio catalítico y junto con AMP. El análisis de esta estructura reveló que existen 10 residuos implicados en la interacción con el sustrato [47, 97]. Mediante alineamientos con dominios A de otras NRPs de sustratos conocidos, se desarrolló un método bioinformático altamente predictivo que busca estos 10 aminoácidos (conocido como el código “Stachelhaus”) en la secuencia aminoacídica de un dominio A de sustrato desconocido, pudiendo predecirse el aminoácido que reconoce dicho dominio [97, 184]. Esta técnica bioinformática ha sido utilizada con gran éxito para predecir la estructura de antibióticos y sideróforos sintetizados a partir de NRP-Sintetasas [27, 28]. Más recientemente, y también basados en la estructura de la GrsA-Phe-AMP, otros autores desarrollaron un método matemático conocido como TSVM (“Transductive Support Vector Machine”) el cual toma también en cuenta las propiedades fisicoquímicas de los 34 aminoácidos que rodean el sitio de unión al sustrato [154]. La secuencia

de una NRP-Sintetasa de interés puede ser analizada ya sea por el método de Stachelhaus o por TSVM mediante servidores públicos gratuitos disponibles en internet [6, 7, 161]. Lamentablemente, estos métodos predictivos aún poseen algunas limitaciones. Por ejemplo, una de ellas, es que la exactitud de la predicción es muy baja para NRP-Sintetasas producidos por hongos, probablemente debido a que la estructura de los dominios A de eucariotas no sea similar a la de la GrsA [97].

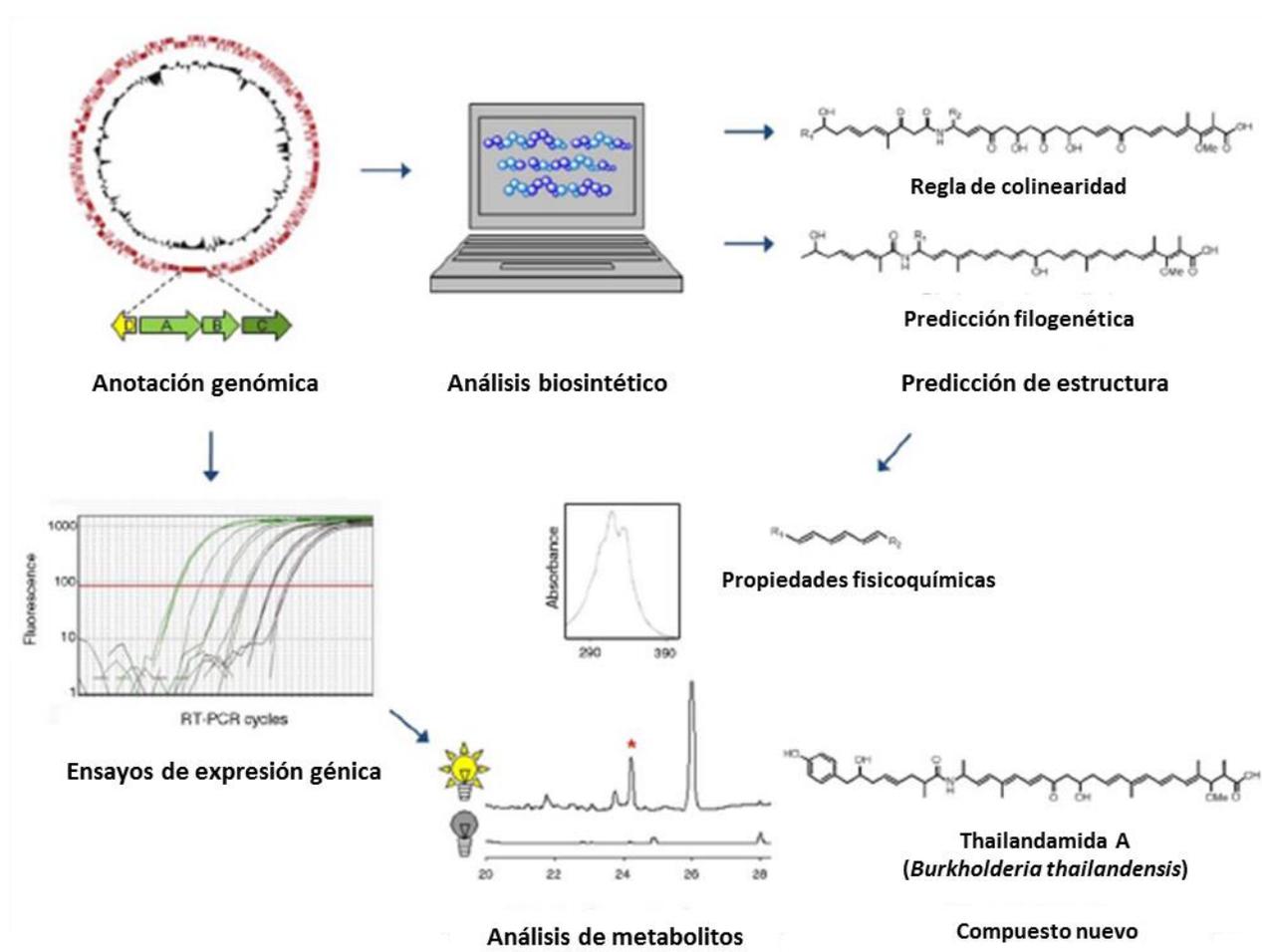


Figura 19: Ejemplo del uso de la minería de genomas ("Genome mining") en el descubrimiento de un nuevo compuesto (tailandamida) producido por una NRP-Sintetasa. Adaptado de Winter y col. [212].

Como se mencionó anteriormente, el análisis de la filogenia y secuencia predice los subtipos funcionales de dominios C ($^L C_L$, $^D C_L$, Cstarter, Cyc, E, y E/C), dando información relevante a la hora de predecir la estructura química del compuesto, por ejemplo para el conocimiento de la conformación del aminoácido (D o L) en el péptido naciente, la presencia de un ácido β -

hidroxicarboxílico en el primer aminoácido, la ciclación de los residuos de cisteína, serina o treonina [153].

Actualmente se dispone de una base de datos exclusivamente desarrollada para NRPs denominada NORINE [34, 35, 97]. Esta plataforma contiene a la fecha, casi mil entradas, aunque este número incluye las múltiples isoformas de algunos de los péptidos [97]. Usando los datos disponibles en NORINE, y basándose en los tipos de monómeros presentes y en la actividad biológica de NRPs descritos, se desarrolló un método que permite predecir la función de un NRP denominado MCPF (“Monomere Composition Peptide Fingerprinting”) [1, 33]. Los autores aseguran una precisión en la predicción de más del 93%.

El interés en la búsqueda de nuevos NRPs con actividades biológicas novedosas y/o aplicadas de utilidad, es compartido por la academia y por la industria. Debido a las nuevas tecnologías de secuenciación, las bases de datos de genomas y metagenomas bacterianos crecen sostenidamente. Mediante una técnica conocida como minería de genomas (“Genome mining”) esquematizada en la figura 19, se ha descubierto la existencia de rutas biosintéticas dependientes de NRP-Sintetasas que producirían productos naturales completamente desconocidos. Los avances en las técnicas para el estudio de NRP-Sintetasas, estrategias de ingeniería genética y de química analítica unidos a los datos obtenidos por minería de genomas, están abriendo una nueva era de descubrimientos de productos naturales [110, 134, 209, 215].

Objetivos

Estableciendo como hipótesis que los sistemas de adquisición de hierro son importantes en el estilo de vida endófito se plantean como:

Objetivo general

Elucidar la importancia de los sistemas de adquisición de hierro mediados por sideróforos en la interacción planta-bacteria.

Objetivos específicos

1. Identificar genes implicados en la adquisición de hierro en *H. seropedicae* Z67 (Capítulo 2).
2. Determinar el efecto de la disponibilidad de hierro en la fijación biológica de nitrógeno en *H. seropedicae* Z67 (Capítulo 3).
3. Caracterizar estructural y funcionalmente el sideróforo producido por *H. seropedicae* Z67 (Capítulo 4).
4. Identificar los sistemas de transporte y la regulación de la producción del sideróforo (Capítulo 5).

CAPÍTULO 2: BÚSQUEDA DE GENES IMPLICADOS EN LA ADQUISICIÓN DE HIERRO EN *H. seropedicae*

Resumen

Se identificaron genéticamente las mutaciones responsables de fenotipos afectados en la producción o internalización de sideróforos en mutantes derivadas de la cepa *H. seropedicae* Z67. Dichas mutantes fueron obtenidas mediante mutagénesis generalizada y seleccionadas según su fenotipo en el medio sólido CAS, el cual permite evaluar la producción de sideróforos. Las secuencias interrumpidas por el minitransposón utilizado en la mutagénesis presentaron homología con genes codificantes para proteínas relacionadas con el transporte y biosíntesis de sideróforos; para enzimas de las rutas biosintéticas de aminoácidos; para enzimas relacionadas al metabolismo del carbono; y para proteínas reguladoras y transportadoras. La capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico fue ensayada en varias de las mutantes. La mutante 44.46 (*exbD::mTn5*), afectada en la internalización de sideróforos, resultó incapaz de fijar nitrógeno en medios con baja disponibilidad de hierro. La mutante 25.40 (*gltB::mTn5*), auxótrofa para glutamato, fue incapaz de fijar nitrógeno en todas las condiciones estudiadas.

Antecedentes

El Departamento de Bioquímica del IIBCE tiene una larga trayectoria en el estudio de bacterias que se asocian a plantas y promueven su crecimiento. En particular una de las líneas de trabajo que se llevan a cabo en el Departamento está enfocada a conocer los mecanismos por los cuales los endófitos diazótrofos como *H. seropedicae* se asocian a la planta hospedera y le proveen a ésta del nitrógeno fijado. En este marco, el proyecto “Molecular genetic analysis of *Herbaspirillum* sp., for the development of effective diazotrophic endophytes of rice” (2002-2004) coordinado por P. R. Gill y codirigido por S. Batista y E. Fabiano y financiado por RITE (“Research Institute of Innovative Technology for the Earth”, Japón) tenía como objetivos particulares el desarrollo de estrategias moleculares y genéticas que permitieran comprender el papel de los sistemas de captación de hierro así como los de transporte de fuentes carbonadas y de almacenamiento de carbono en la cepa *H. seropedicae* Z67 en vida libre y en asociación con plantas de arroz. Como parte de este proyecto, se había obtenido una colección de mutantes derivadas de la cepa *H. seropedicae* Z67 mediante mutagénesis generalizada, utilizando el minitransposón *mTn5gusA-o-pgfp* (C. Xi, datos

no publicados) contenido en el plásmido pmTn5gusA-o-pgfp, derivado del pmTn5gusA-pgfp21 (pFAJ1819) [210]. Este minitransposón contiene el gen *uidA*, codificante para la enzima β -glucuronidasa carente de promotor; un casete de resistencia a kanamicina; la región oriV (Incl) de *E. coli*; y dos copias del gen *gfp*, que codifican para la proteína verde fluorescente, bajo control de un promotor constitutivo. Para realizar la mutagénesis generalizada, el plásmido pmTn5gusA-o-pgfp fue transferido a *H. seropedicae* Z67 por conjugación biparental usando como cepa donadora *E. coli* S17.1 λ -pir, que codifica en su cromosoma los genes necesarios para la conjugación de tipo RP4 y la proteína Π , necesaria para la replicación de plásmidos con origen de replicación oriR6K [83]. Las transconjugantes obtenidas se habían discriminado por la producción de sideróforos en medio sólido CAS [175], un medio definido que contiene el colorante Cromo Azurol Sulfonato (CAS) el cual posee afinidad moderada por el Fe^{3+} . En condiciones de pH neutro o ácido el complejo Fe^{3+} -CAS es de color verde azulado. La producción de sideróforos de una bacteria crecida en medio CAS se evidencia como la formación de un halo amarillo o naranja alrededor de la colonia, debido a la pérdida del ion Fe^{3+} por parte del colorante CAS. Este es un método de detección universal para sideróforos. Mediante análisis de Southern Blot de los ADN genómicos digeridos con PvuI usando el mTn5gusA-O-pgfp biotinilado como sonda se había comprobado que las mutantes seleccionadas poseían una única inserción del minitransposón.

Objetivos

1. Identificar genéticamente las mutaciones responsables de fenotipos afectados en la producción o internalización de sideróforos, presentes en la colección de transconjugantes disponible en el laboratorio.
2. Evaluar la actividad y la expresión de la nitrogenasa “in vivo” en algunas de las mutantes seleccionadas en medios con diferente disponibilidad de hierro.

Materiales y métodos

Bacterias y condiciones de crecimiento

H. seropedicae Z67 y las mutantes isogénicas conteniendo el minitransposón se crecieron a 30°C en el medio rico TY (tryptona 5 g/l; extracto de levadura 3 g/l; CaCl_2 0,05 g/l) [18] o en medio mínimo NfbHP-malato (Klassen et al., 1997) [102] con NH_4Cl 20 mM (NfbHPN-malato) o glutamato

5 mM (NfbHPG-malato) como fuentes de nitrógeno. Para los ensayos de auxotrofia se agregaron al medio NfbHPN-malato diferentes aminoácidos con concentración final de 0,5 mM. Las cepas de *E. coli* DH10B conteniendo las diferentes construcciones plasmídicas se crecieron en medio LB a 37°C [20]. Los medios sólidos se obtuvieron agregando 16 g/l de agar y en el caso de los semi-sólidos 4 g/l. Los antibióticos utilizados fueron: kanamicina 35 µg/ml y ácido nalidixico 5 µg/ml. Todas las cepas utilizadas se conservaron en glicerol 25% (v/v) a -80°C.

La producción de sideróforos se evaluó por observación de la formación de un halo naranja sobre fondo azul mediante el ensayo de CAS modificado (ver anexo 1) en medio sólido con el colorante CAS [175]. Para ello, 10 µl de un cultivo primario en medio TY en fase exponencial tardía conteniendo aprox. 1×10^6 unidades formadoras de colonia (ufc) de la cepa en estudio se colocaron como gota en sobre el medio sólido CAS, se dejaron secar y se crecieron durante 48 hs a 30°C.

Identificación de loci interrumpidos

Para identificar las secuencias interrumpidas por el mTn5gusA-o-gfp se aisló el ADN genómico de las respectivas mutantes y 200 ng de cada ADN obtenido se digirieron con la enzima PvuI ya que el transposón no posee sitio de corte para esta enzima. Las técnicas de biología molecular se realizaron según los protocolos clásicos para biología molecular a no ser que se aclare lo contrario [164]. Los 200 ng de ADN genómicos digeridos con PvuI se ligaron con 4U de la enzima T4 DNA ligasa (Fermentas) en un volumen total de 200 µl. Debido a la presencia de la secuencia *oriV* en el minitransposón, la ligación del fragmento que contenga el minitransposón formará un plásmido replicable en *E. coli*. Los 200 µl de la reacción de ligación se precipitaron con 3 volúmenes de etanol absoluto frío y acetato de amonio 3 M durante toda la noche a -20°C. Luego se recuperó el ADN por centrifugación, se lavó con etanol 70% (v/v) y una vez secado por vacío en Speed Vac se resuspendió en 20 µl de agua bidestilada. Se emplearon 10 µl de esta muestra para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* DH10B. Para identificar los clones que contenían la construcción plasmídica consistente en el minitransposon y las regiones de ADN adyacentes al sitio de inserción, se seleccionaron las transformantes resistentes a kanamicina 35 µg/ml en medio sólido LB. Se purificaron los plásmidos por el método de lisis alcalina [164] y posterior precipitación con PEG 8000 13% (p/v) en NaCl 1M. La región flanqueante al minitransposón corriente arriba del gen *uidA* de los plásmidos obtenidos se secuenció en CTAG (Facultad de Ciencias) utilizando el cebador 5'-GGGTTGGGGTTTCTACAGGACG-3'.

Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas se identificaron y compararon mediante el programa BLASTX disponible en www.ncbi.nlm.nih/BLAST con el genoma de la cepa *H. seropedicae* SmR1 [146]. El contexto genético de los sitios donde ocurrió la inserción del minitransposón, se analizó en la plataforma IMG (Integrated Microbial Genomics, <http://img.jgi.doe.gov/>) [119]. Se empleó la definición de casete genómico de Markowitz y col. [119], considerándose un casete genómico como el conjunto de genes contiguos que poseen menos de 300 pb de región intergénica entre genes adyacentes.

Ensayo de actividad nitrogenasa

La actividad del complejo enzimático nitrogenasa de la cepa *H. seropedicae* Z67 y de algunas de las mutantes derivadas de la mutagénesis se determinó por el ensayo de reducción de acetileno [59, 173]. Para ello los clones conservados en glicerol 25% (p/v) a -80°C se emplearon para inocular medio sólido TY o NfbHPG-malato. Luego de 48 h de incubación a 30°C , varias colonias se re-inocularon en NfbHPG-malato líquido y los cultivos se crecieron 24 h a 30°C con agitación constante (150 rpm). Entre 30 y 35 μl de los cultivos se inocularon en 4 ml de NfbHP-malato semi-sólido con glutamato 0,5 mM, LB 1% (v/v), con o sin el agregado de FeSO_4 72 μM en frascos de 10 ml. Luego de 24 h de crecimiento a 30°C , se inyectó los frascos con 1 mL de acetileno y la producción de etileno se determinó empleando un cromatógrafo de gases Star Varian 3400. La actividad nitrogenasa se expresó como nmoles de etileno producido por mg de proteína por min. Cada ensayo se realizó por duplicado en un total de al menos tres experimentos independientes. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford [23], utilizando la proteína seroalbúmina bovina (BSA) como referencia.

Resultados y discusión

Sobre un total de 10.000 transconjugantes analizadas obtenidas a partir de 3 conjugaciones independientes (15.000 colonias aisladas) se lograron discriminar mediante fenotipo en placas CAS 20 mutantes con producción de sideróforos no detectable o menor que la cepa salvaje, y 5 mutantes con sobreacumulación de sideróforos. De estas 25 transconjugantes se secuenció la región 5' al gen *uidA* del minitransposón de 12 de ellas. En la tabla 1 se describe el fenotipo de las mutantes y la homología que presentaron dichas secuencias mediante análisis de BLAST.

Mutantes en genes relacionados con la adquisición de hierro

Dos de las mutantes identificadas (mutantes 4.3 y 44.46) presentaron el minitransposón inserto en genes homólogos a los relacionados con la biosíntesis (Hsero_2343) o la internalización (Hsero_0689, *exbD::mTn5*) de sideróforos respectivamente. Como se describe en la tabla 1, la mutante 4.3 no producía sideróforos en cantidades detectables en medio CAS sólido, mientras que la mutante 44.46 (*exbD::mTn5*) presentaba una sobre acumulación de sideróforos en el mismo medio comparativamente a la cepa salvaje (Figuras 1A y 1B).

Tabla 1. Caracterización e identificación de los loci interrumpidos en los mutantes derivados de *H. seropedicae* Z67 afectados en la internalización o producción de sideróforos.

Cepa	CAS*	Auxotrofia	Locus Tag	Gen	Nombre del producto
Z67	+				
20.13	+/-		Hsero_2283	<i>acnA</i>	aconitato hidratasa
19.24	-	Trp	Hsero_3893	<i>trpE</i>	antranilato sintasa componente I
25.40	-	Glu	Hsero_3924	<i>gltB</i>	glutamato sintasa subunidad mayor
261.9	-	Pro	Hsero_3802	<i>proC</i>	pirrolina-5-carboxilato reductasa
38.48	-		Hsero_4548		regulador de respuesta
39.15	-	Cys	Hsero_3099	<i>cysI</i>	sulfito reductasa subunidad beta
9.32	-	Cys	Hsero_3097	<i>cysB</i>	Regulador transcripcional del regulón <i>cys</i>
4.3	-		Hsero_2343		NRP-Sintetasa
14.43	++		Hsero_0524		Regulador transcripcional de la familia LysR
25.46	++		Hsero_4782		Transportador ABC ATPasa/permeasa
44.46	+++		Hsero_0689	<i>exbD</i>	Transportador de biopolímeros ExbD
5.39	++		Hsero_2594	<i>lldD</i>	L-lactato dehidrogenasa

* Fenotipo en medio CAS: +: producción de halo; +/-: halo reducido; -: ausencia de halo; +++: sobreproducción de halo

En el caso de la mutante *H. seropedicae* 4.3 el gen interrumpido resultó homólogo a genes de NRP-Sintetasas. Tomando en cuenta el casete genómico que contiene al mismo (Fig. 2), el sideróforo producido por *H. seropedicae* sería del tipo NRP-Sintetasa dependiente. El estudio detallado de la proteína que codifica este gen y su producto de biosíntesis será descrito en el capítulo 4 de esta tesis.

El fenotipo de la mutante *H. seropedicae* 44.46 (*exbD::mTn5*) en medio CAS fue opuesto al de la mutante 4.3 (Fig. 1B): el halo naranja formado por esta cepa resultó mayor que el de la cepa

salvaje. Mediante el análisis de la secuencia interrumpida se demostró que el gen afectado presentó homología con genes *exbD* de otras bacterias. El gen *exbD* codifica para una proteína de membrana citoplasmática, que junto con los productos de los genes *exbB* y *tonB* forma el complejo TonB en *E. coli* y otras bacterias y es responsable de otorgar la energía para la internalización al periplasma de variadas fuentes de hierro como sideróforos, hemina, lactoferrina, citrato, etc [111]. En la figura 2 se muestra el casete genómico que contiene al gen *exbD* en *H. seropedicae* SmR1.

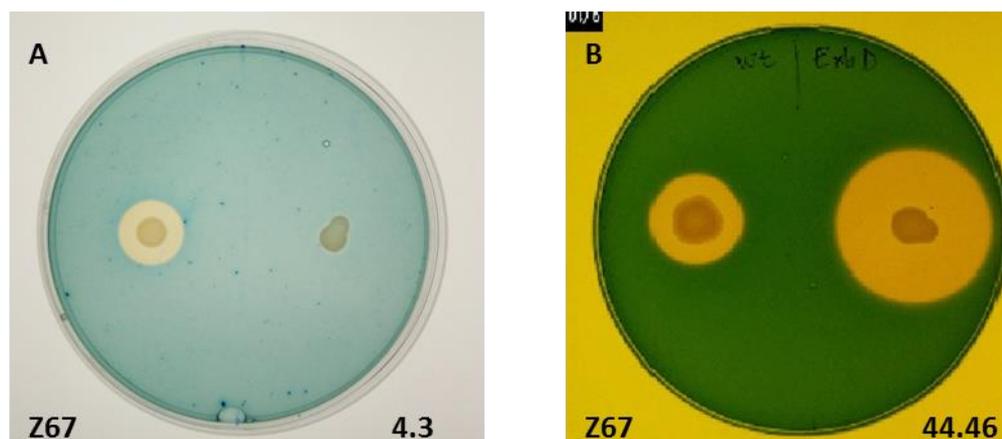


Figura 1: Fenotipo en medio CAS de las mutantes 4.3 y 44.46. A) la cepa salvaje *H. seropedicae* Z67 (izquierda) y de la mutante 4.3 (derecha), con el transposón inserto en el gen de una NRP-Sintetasa y B) de la cepa salvaje (izquierda) y de la mutante 44.46 (*exbD::mTn5*) (derecha). Diez microlitros de cultivos primarios en fase exponencial tardía conteniendo aprox. 1×10^6 u.f.c. de cada cepa se colocaron como gota en las placas, dejaron secar y se crecieron durante 48 h a 30°C.

La identificación del gen interrumpido en la mutante 44.46 (*exbD::mTn5*) permite explicar el fenotipo de la misma en placas CAS ya que al poseer el sistema de internalización de sideróforos comprometido, los mismos se acumulan en el medio sin ingresar a la célula, la cual, estando aún más comprometida en su crecimiento debido a la carencia de hierro intracelular, continúa produciendo más sideróforos. Interesantemente *H. seropedicae* SmR1 presenta en su genoma cuatro copias más de *exbD*, tres de ellas asociadas espacialmente a *tonBexbB* y a un receptor TonB-dependiente (Hsero_0293, Hsero_2609, Hsero_2817, respectivamente) y la cuarta

únicamente asociada a *exbB* (Hsero_0604). Dado el fenotipo en CAS y la inserción única del minitransposón, estos genes no tendrían una función relacionada al transporte del sideróforo endógeno en las condiciones estudiadas. El fenotipo de la mutante 44.46 (*exbD::mTn5*) se describe con mayor detalle en el capítulo 3 de esta tesis.



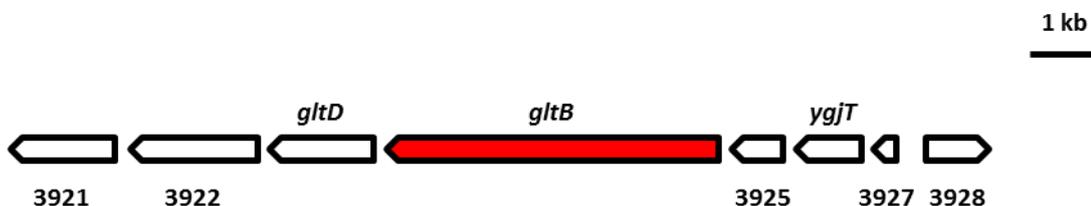
Figura 2: Localización de los genes mutados relacionados con la adquisición de hierro. Casetes genómicos del genoma de *H. seropedicae* SmR1 donde se encuentran presentes los genes interrumpidos (rojos) en la mutante 4.3 y la mutante 44.46. De acuerdo con Markowitz y col. [121], se define un casete genómico como el conjunto de genes contiguos que poseen menos de 300 pb de región intergénica entre genes adyacentes.

Mutantes en rutas biosintéticas de aminoácidos

El análisis genómico de cinco mutantes 19.24 (Hsero_3893, *trpE::mTn5*), 25.40 (Hsero_3924, *gltB::mTn5*), 261.9 (Hsero_3802, *proC::mTn5*), 39.15 (Hsero_3099, *cysI::mTn5*) y 9.32 (Hsero_3097, *cysB::mTn5*) (Tabla 1) seleccionadas por no producir sideróforos en cantidades detectables en placas CAS indicó que el minitransposón estaba insertado en genes que codificarían enzimas o proteínas reguladoras relacionadas con rutas biosintéticas de aminoácidos (Fig. 3). Cuando se analizó el crecimiento de las cepas obtenidas en medio mínimo NfbHP-malato con nitrógeno o glutamato como fuente de nitrógeno se observó que efectivamente estas cuatro mutantes eran auxótrofas, no observándose crecimiento en este medio mínimo. A su vez, la mutante 25.40, era

capaz de crecer con glutamato como fuente de nitrógeno pero no con NH₄Cl (datos no mostrados). La auxotrofia de las mutantes 19.24 (*trpE::mTn5*), 261.9 (*proC::mTn5*), 39.15 (*cysI::mTn5*), 9.32 (*cysB::mTn5*) y 25.40 (*gltB::mTn5*), se comprobó mediante recuperación del fenotipo salvaje al agregar los aminoácidos triptófano, prolina, cisteína, cisteína o glutamato respectivamente, al medio mínimo (dato no mostrado).

25.40



261.9



9.32 y 39.15



Figura 3: Localización de los genes mutados en rutas biosintéticas de aminoácidos. Casetes genómicos del genoma de *H. seropedicae* SmR1 conteniendo los genes interrumpidos (rojos) en las mutantes 19.24, 25.40, 261.9, 9.32 y 39.15.

El fenotipo CAS de estas mutantes auxótrofas podría deberse a que 1g/L de extracto de levadura no sea suficiente para proveer estos aminoácidos en las cantidades necesarias para el crecimiento bacteriano. Por ende la imposibilidad de producir sideróforos en cantidades detectables podría ser la causa de un metabolismo general deficitario debido a la falta de aminoácidos. Como se muestra en la figura 4, con el agregado de cisteína 0,5 mM, la mutante 39.15 (*cysI::mTn5*) crece mejor y forma halo naranja en medio CAS, aunque éste fue menor que el de la cepa salvaje en iguales condiciones. En cambio, con el agregado de glutamato 5 mM y sin glucosa, la mutante 25.40

(*gltB::mTn5*) a pesar de presentar un crecimiento notorio no mostró producción detectable de sideróforo. Este último resultado sugiere entonces que la mutación en el gen *gltB* esté afectando de otra manera la ruta biosintética del sideróforo producido por *H. seropedicae* Z67.

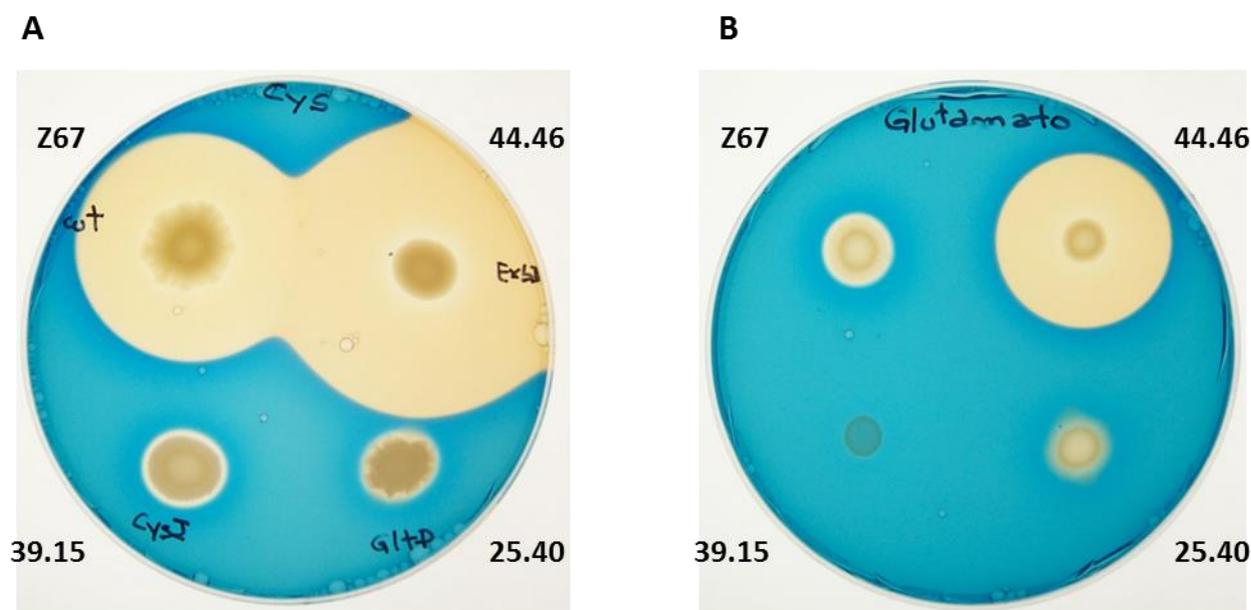


Figura 4: Fenotipo en medio CAS de la cepa salvaje *H. seropedicae* Z67 y las mutantes 44.46 (*exbD::mTn5*), 39.15 (*cysI::mTn5*) y 25.40 (*gltB::mTn5*). A) Medio CAS con cisteína 0,5 mM y B) medio CAS sin glucosa y glutamato 5 mM. Diez microlitros de cultivos primarios en fase exponencial tardía conteniendo aprox. 1×10^6 u.f.c. de cada cepa se colocaron como gota en las placas, dejaron secar y se crecieron durante 48 h a 30 °C.

Mutantes en genes relacionados al metabolismo del carbono

La mutante 20.13 (*Hsero_2283, acnA::mTn5*) presentó un halo reducido en CAS (Tabla 1) y en esta mutante la inserción del minitransposón se ubicó en un ORF con homología al gen *acnA*, que codifica para la aconitasa A, enzima del ciclo de Krebs la cual cataliza la conversión de aconitato a cis-aconitato (Fig. 5) [107]. Al evaluar la actividad aconitasa se observó una reducción de ésta de aproximadamente 5 veces con respecto a la actividad de la cepa salvaje (dato no mostrado). La actividad remanente puede deberse a que en el genoma de *H. seropedicae* se encuentra otra copia de *acnA* (*Hsero_2979*) aunque según los resultados obtenidos, la copia interrumpida en la mutante 20.13 (*acnA::mTn5*) sería la que tiene un papel preponderante en las condiciones de crecimiento ensayadas. El fenotipo en medio CAS de la mutante puede explicarse basándonos en los estudios realizados con aconitasas de *E. coli* [190]. Cuando *E. coli* es crecida en medios limitados en hierro, el clúster 4Fe-4S de la aconitasa B pierde un átomo de hierro. De esta manera

la enzima pierde su actividad catalítica, ya que el clúster es responsable de la misma. Sin embargo, la proteína adquiere la capacidad de unirse a ARNm específicos relacionados con el metabolismo del hierro. Aquellos mensajeros implicados en los sistemas de alta afinidad para adquisición del metal son estabilizados por la proteína, mientras aquellos que codifican para proteínas de almacenaje de hierro o de alto contenido en el metal son desestabilizados por la unión ARN-aconitasa B. Algo similar podría estar ocurriendo en *H. seropedicae*: la falta de esta copia de aconitasa podría provocar una disminución en la síntesis de proteínas que participan en la síntesis del sideróforo y por lo tanto una menor producción del mismo. Se necesitarían de nuevos ensayos para comprobar esta hipótesis.

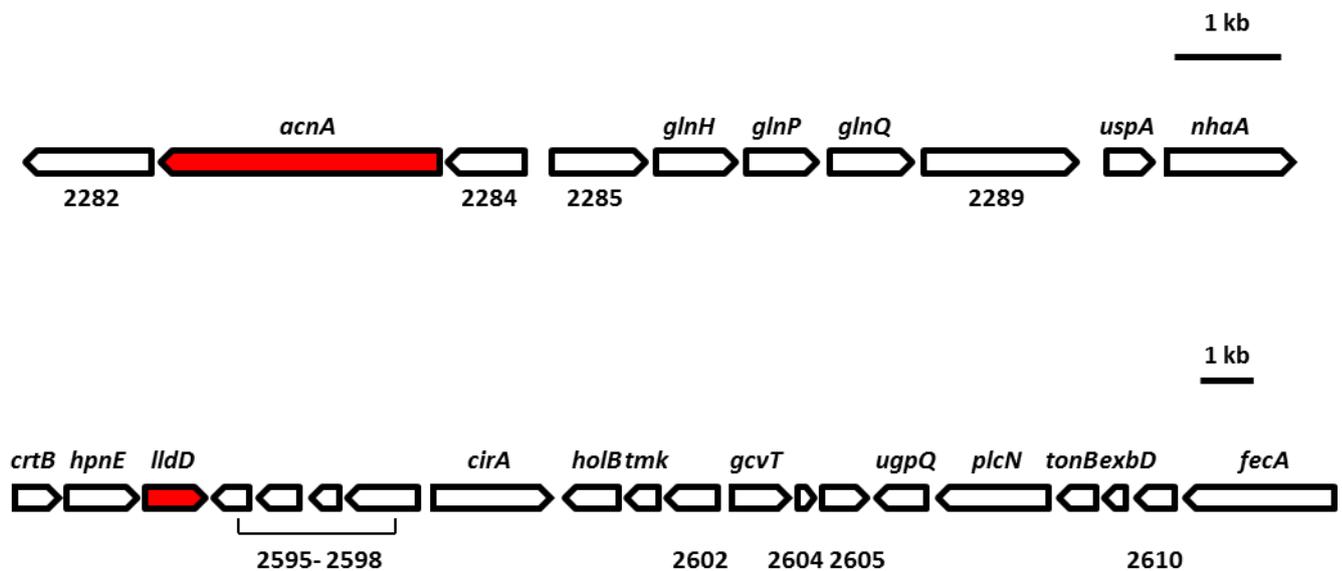


Figura 5: Localización de los genes mutados relacionados al metabolismo del carbono. Casetes genómicos del genoma de *H. seropedicae* SmR1 conteniendo los genes interrumpidos (rojos) en la mutante 20.13 y la mutante 5.39.

La mutante 5.39 (*Hsero_2594*, *lldD::mTn5*), que produce un halo de mayor tamaño que el de la cepa salvaje en medio CAS (Tabla 1), presentó la inserción del minitransposón en una copia del gen *lldD*. El gen *lldD* codifica para la enzima L-lactato dehidrogenasa. Esta mutante mostró menor crecimiento en medio NfbHPG con L-lactato como fuente carbonada, con respecto a la cepa salvaje mientras que el crecimiento fue similar en ambas cepas en medio NfbHPG con malato corroborando el fenotipo esperado (dato no mostrado). No se ha descrito hasta ahora relación alguna entre esta enzima y la producción de sideróforos. Quizás el fenotipo observado sea una

consecuencia de variaciones en el pH del medio y no algo directamente relacionado a la producción de sideróforos. El contexto genético de este ORF muestra corriente abajo y en la misma hebra un receptor del tipo TonB dependiente (Hsero_2599), pero es poco probable que el transposón esté afectando la expresión de este gen debido a que se encuentra a 3716 pb de distancia (Fig. 5).

Otras mutantes identificadas

Los sitios de inserción del minitransposón en las mutantes 14.43 (Hsero_0524) y 25.46 (Hsero_4782) que sobreacumulaban sideróforos y la mutante no productora de sideróforos 38.48 (Hsero_4548) fueron también identificados por homología de secuencias (Fig. 6). La mutante 14.43 presentó el transposón inserto en un ORF con homología a reguladores transcripcionales del tipo LysR. El contexto genético de este ORF no presenta ningún gen que se relacione claramente con el metabolismo de hierro. La mutante 25.46 presentó el transposón inserto en un exportador del tipo ABC sin otros genes aparentemente asociados. En la mutante 38.48 el gen interrumpido era homólogo a genes que codifican para reguladores de sistemas de dos componentes. Esta mutante presentó un menor crecimiento en NfbHP-malato suplementado o no con hierro, por lo que el fenotipo en CAS puede deberse a problemas generales de metabolismo (dato no mostrado). De acuerdo a la bibliografía disponible no podemos establecer un vínculo directo entre estos genes y el fenotipo observado en medio CAS sin un mayor estudio de las mutantes.

Fijación de nitrógeno

Con el fin de evaluar si el proceso de fijación de nitrógeno en *H. seropedicae* Z67 es afectado por la disponibilidad de hierro, se determinó la actividad nitrogenasa de la cepa salvaje y de seis de las mutantes derivadas, mediante el ensayo de reducción de acetileno [59, 173] en cultivos crecidos en medios con o sin el agregado de FeSO_4 72 μM (Tabla 2). La actividad nitrogenasa de la mutante 25.40 (*gltB::mTn5*) no pudo ser detectada independientemente del agregado o no de hierro. Por el contrario, la actividad nitrogenasa de la mutante 44.46 (*exbD::mTn5*) se redujo severamente (fue aproximadamente 10 veces menor) cuando no se agregó hierro al medio. En las mutantes 20.13 (*acnA::mTn5*) y 5.39 (*lldD::mTn5*) se detectó solamente una pequeña reducción en la actividad en medios limitados en el metal.

14.43



25.46

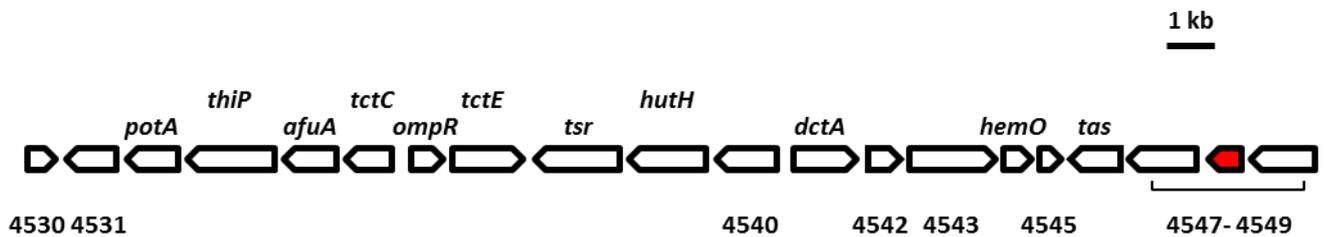
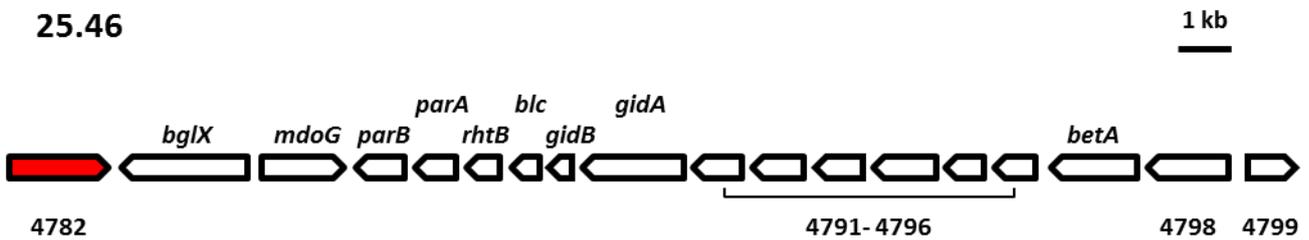


Figura 5: Localización de los genes mutados en otras mutantes identificadas. Casetes genómicos del genoma de *H. seropedicae* SmR1 conteniendo los genes interrumpidos (rojos) de las mutantes 14.43, 25.46 y 38.48.

Los resultados obtenidos en esta tesis apoyan la hipótesis que *H. seropedicae* asimila amonio principalmente a través de la vía de la de glutamina sintasa-glutamato sintetasa (GS-GOGAT), mientras que la actividad de la enzima glutamato deshidrogenasa codificada por *gdhA* (Hsero_3858) posee un papel de menor importancia en la síntesis de glutamato, ya que la mutante *gltB::mTn5* muestra un crecimiento lento incluso con concentraciones de NH_4Cl 20 mM (datos no mostrados). Lo mismo fue descrito para *Azospirillum brasilense* [209]. En *Rhizobium etli* el NH_4Cl se asimila exclusivamente por la vía GS-GOGAT [37].

Existe una larga historia de estudios que han establecido que la función del sistema de control de nitrógeno de bacterias Gram- depende fundamentalmente de la actividad de la glutamato sintasa. Sin embargo, las razones para esta relación son todavía un tema de debate [180]. Mutantes de *E. coli* y *Klebsiella aerogenes* defectuosas en el gen *gltB* presentan menor crecimiento cuando son

Tabla 2. Actividad nitrogenasa de la cepa salvaje y diferentes mutantes cultivados en medio NfbHP-malato semi-sólido suplementado con 0,5 mM de glutamato con el agregado (+Fe) o no (-Fe) de FeSO_4 72 μM . Los valores son la media de al menos tres experimentos independientes. \pm significa D.S.

Cepa (gen/locus interrumpido; fenotipo en CAS)	Actividad nitrogenasa (nmol etileno. mg^{-1} proteína. min^{-1})	
	+ Fe	- Fe
Z 67 (+)	10.19 \pm 1.53	10.90 \pm 2.11
20.13 (<i>acnA::mTn5</i> ; -)	9.03 \pm 1.75	5.30 \pm 0.92
25.40 (<i>gltB::mTn5</i> ; -)	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
25.46 (Hsero_4782; ++)	8.82 \pm 1.70	8.55 \pm 1.33
38.48 (Hsero_3848; -)	10.84 \pm 2.75	9.46 \pm 2.37
44.46 (<i>exbD::mTn5</i> ; +++)	10.26 \pm 0.81	1.58 \pm 0.30
5.39 (<i>lldD::mTn5</i> ; ++)	11.68 \pm 1.93	7.57 \pm 1.37

crecidas en fuentes de nitrógeno diferentes al glutamato [74]. Estos autores sugieren que este fenotipo es consecuencia del bajo contenido en glutamato de la célula. Resultados similares se obtuvieron para mutantes *gltB* en *Pseudomonas putida* [180]. En este caso, los autores demuestran que con la vía de síntesis de glutamato truncada, la glutamina se acumula provocando una inhibición de la acción de NtrC. Trabajos más recientes demostraron que una mutante *gltB* de *R. etli* detiene el desarrollo del nódulo en plantas de poroto y la fijación de nitrógeno es nula [133]. Los autores proponen que dicha inhibición se debe a que los genes de los sistemas de transporte de aminoácidos en el nódulo se ven reprimidos en dicha mutante. Con el fin de esclarecer la desaparición de la actividad nitrogenasa observada en la mutante 25.40 (*gltB::mTn5*) se midió la actividad nitrogenasa de la mutante y de la cepa salvaje en medios con concentraciones crecientes de glutamato (Fig. 7). Los datos obtenidos indican que existe una reducción en la actividad nitrogenasa de la cepa salvaje debida seguramente a una represión por las altas concentraciones de nitrógeno en forma de glutamato. Por el contrario, la mutante 25.40 (*gltB::mTn5*) no presentó actividad detectable en ninguna de las concentraciones utilizadas. Los resultados mostrados en la figura 7B podrían rechazar la hipótesis que la falta de glutamato afecta el crecimiento y por ende la actividad nitrogenasa ya que si bien los valores de proteínas totales son adecuados igualmente no se obtienen valores detectables de reducción de acetileno y apoyaría la hipótesis de un efecto

asociado a la acumulación de glutamina Aunque no se puede descartar otro tipo de efecto complementario/alternativo a la represión de la nitrogenasa mediada por glutamato.

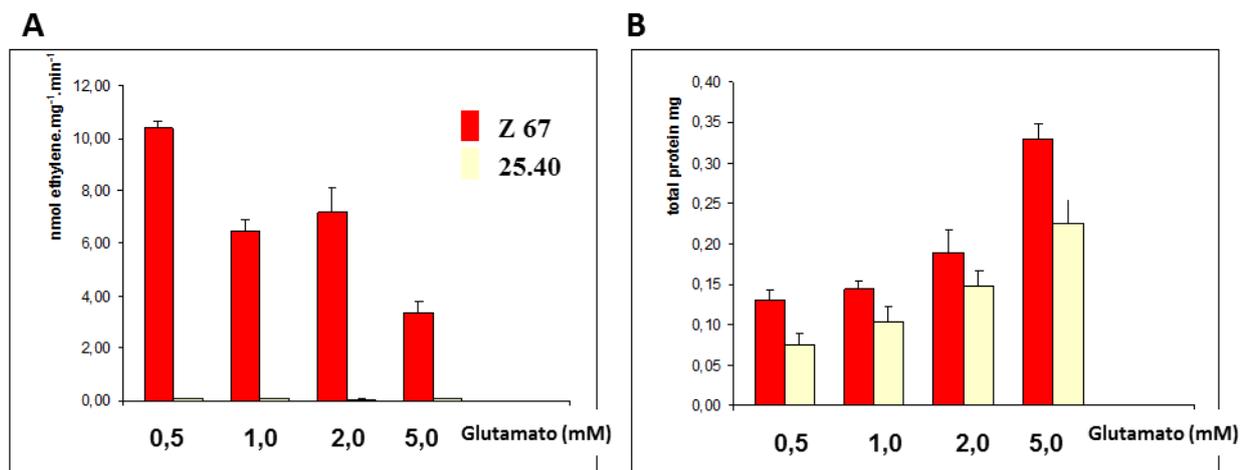


Figura 7: A) Actividad nitrogenasa de *H. seropedicae* Z67 y de la mutante 25.40 (*gltB::mTn5*) crecidos en medio semi-sólido NfbHP-malato con concentraciones crecientes de glutamato. B) Proteínas totales correspondiente a las muestras empleadas en el ensayo de actividad nitrogenasa. Los valores son el promedio de tres ensayos independientes \pm D.S.

Conclusiones

El avance en las técnicas de secuenciación masiva de los últimos años ha dado paso a una nueva era en las ciencias biológicas. Es necesario desarrollar junto con este avance estrategias experimentales de aplicación general útiles para desentrañar cómo estos diversos genomas dirigen la organización de las células en diferentes ambientes. Los transposones han resurgido en los últimos años como herramientas sencillas pero sofisticadas para estos estudios de genómica funcional [81]. Mediante esta técnica y utilizando selección de transconjugantes en medio CAS, logramos obtener una variedad de mutantes en diferentes genes. Los resultados obtenidos para las mutantes en la biosíntesis de aminoácidos, así como los reguladores y transportadores sin función previa descrita en la homeostasis de hierro así como la implicancia de la glutamato sintasa en los mecanismos de fijación de nitrógeno resultan de gran interés. Debido a los objetivos iniciales de esta tesis, se continuó trabajando con las mutantes 4.3 y 44.46 (*exbD::mTn5*) (ver capítulos siguientes) sin embargo consideramos que sería de sumo interés profundizar en la caracterización del resto de las mutantes obtenidas.

CAPÍTULO 3: LA RESTRICCIÓN DE HIERRO AFECTA LA ACTIVIDAD NITROGENASA Y LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *nifA* Y *nifH* EN *Herbaspirillum seropedicae*

Rosconi, F., Souza, E.M., Pedrosa, F.O., Platero, R.A., Gonzalez, C., Gonzalez, M., Batista, S., Gill, P.R. y Fabiano E. (2006) *Iron depletion affects nitrogenase activity and expression of nifH and nifA genes in Herbaspirillum seropedicae*. FEMS Microbiol Lett 258: 214-219.

Resumen

Se analizó la respuesta de *H. seropedicae* Z67 a la deficiencia de hierro en condiciones de fijación de nitrógeno. Se constató que el gen *exbD* es inducido en respuesta a la limitación de hierro y está implicado en la homeostasis de hierro. El análisis fenotípico de una cepa mutante donde el gen *exbD* se encuentra interrumpido con un minitransposón, indica que este gen es esencial para la fijación de nitrógeno cuando la cepa se encuentra en condiciones de falta de hierro. Además, se demostró que la expresión de los genes *nifH* y *nifA* es dependiente de hierro en el contexto genético de *H. seropedicae*.

Objetivos

1. Caracterizar el fenotipo de crecimiento *exbD* de la mutante 44.46 (*exbD::mTn5*) y la expresión del gen interrumpido en medios con diferente disponibilidad de hierro.
2. Evaluar el efecto de la disponibilidad de hierro sobre la actividad nitrogenasa de *H. seropedicae*.
3. Evaluar el efecto de la disponibilidad de hierro sobre la expresión de los genes estructurales de la nitrogenasa y del gen que codifica para el activador transcripcional NifA.

Principales resultados y conclusiones

Los resultados mostrados en este capítulo demostraron que la actividad y expresión de la nitrogenasa responde a la disponibilidad de hierro. Una estrategia utilizada por las bacterias para controlar la homeostasis de hierro es reprimir la expresión de algunas proteínas que contienen hierro bajo condiciones de baja disponibilidad del metal y la expresión de la nitrogenasa podría ser entonces un ejemplo más de esta estrategia.

En base a nuestros resultados así como a los datos obtenidos por Klassen y col. [103] proponemos que *H. seropedicae* utiliza diferentes mecanismos para adaptar el proceso de fijación de nitrógeno a los niveles de disponibilidad de hierro: cuando las condiciones de disponibilidad de hierro son adecuadas, la expresión y la actividad del complejo nitrogenasa son óptimas. Cuando los niveles de hierro se ven reducidos, se expresan los sistemas de alta afinidad para el hierro y bajo esta situación, los genes *nifH* y *nifA* son reprimidos, pero la enzima nitrogenasa puede aún ser correctamente ensamblada requiriendo de la acción de los productos de los genes *nifXHsero_2847* [103]. Esto puede ser lo que suceda en ambientes naturales dónde la concentración de hierro libre es usualmente escasa. Cuando la concentración de hierro intracelular llega a un nivel límite, como sucede en el caso de la mutante *exbD* crecida en ambientes con escaso hierro, la actividad nitrogenasa se pierde por completo.

Contribución personal al trabajo y aporte a los objetivos planteados

En este trabajo realicé todos los análisis genéticos de las mutantes, la evaluación de la expresión de los genes en los diferentes medios, y las caracterizaciones fenotípicas de las cepas incluidas las determinaciones de actividad nitrogenasa. El trabajo presentado en este capítulo fue parcialmente financiado por RITE, UNU-BIOLAC, PEDECIBA Química-Biología y por un proyecto CSIC-iniciación 2004 del que fui responsable.

Iron depletion affects nitrogenase activity and expression of *nifH* and *nifA* genes in *Herbaspirillum seropedicae*

Federico Rosconi¹, Emanuel M. Souza², Fabio O. Pedrosa², Raúl A. Platero¹, Cecilia González³, Marcela González³, Silvia Batista³, Paul R. Gill^{3,4} & Elena R. Fabiano¹

¹Laboratorio de Ecología Microbiana, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable-MEC, Unidad Asociada a Facultad de Ciencias-UdelaR, Montevideo, Uruguay; ²Departamento de Bioquímica e Biología Molecular, UFPR, Curitiba, PR, Brazil; ³Departamento de Bioquímica, IIBCE-MEC, Montevideo, Uruguay; and ⁴Laboratorio de Tecnología Molecular, Facultad de Ciencias-UdelaR, Montevideo, Uruguay

Correspondence: Elena R. Fabiano, Laboratorio de Ecología Microbiana, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Avda Italia 3318, Montevideo 11600, Uruguay. Tel.: +598 2 4871616 ext. 146; fax: 598 2 4875548; e-mail: efabiano@iibce.edu.uy

Received 28 November 2005; revised 3 February 2006; accepted 27 February 2006. First published online 29 March 2006.

doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00218.x

Editor: Yaacov Okon

Keywords

Herbaspirillum seropedicae; *nifA*; *nifH*; *exbD*; iron regulation.

Introduction

Herbaspirillum seropedicae is a diazotrophic endophyte that belongs to the β -subclass of Proteobacteria. It was previously demonstrated that *H. seropedicae* strain Z67 (Baldani *et al.*, 1986) is able to systemically colonize the interior of rice plants (James *et al.*, 2002) and to fix nitrogen in planta (Baldani *et al.*, 2000). Reduction of N₂ to ammonia is catalysed by the nitrogenase enzymatic complex. Nitrogenase is a high iron-containing enzyme with about 38 atoms of iron per enzymatic complex (Georgiadis *et al.*, 1992; Mayer *et al.*, 1999; Rees & Howard, 2000). Thus, the availability of nutritional iron might impose restrictions on the expression, assembly and function of an effective nitrogenase complex. In that context, Klassen *et al.* (2003) showed that nitrogenase activity in *H. seropedicae* requires the products of the *nifXorf1* genes under iron-limiting conditions. Structural genes for nitrogenase form part of the *nifHDKENXorf1orf2* operon, *nifH* being the gene that encodes the Fe protein of nitrogenase (Pedrosa *et al.*, 2001). The σ^{54} -dependent transcriptional activator NifA modulates expression of nitrogenase in *H. seropedicae* in response to available

Abstract

Herbaspirillum seropedicae Z67 is a nitrogen-fixing bacterium able to colonize the rhizosphere and the interior of several plants. As iron is a key element for nitrogen fixation, we examined the response of this microorganism to iron deficiency under nitrogen fixing conditions. We identified a *H. seropedicae* *exbD* gene that was induced in response to iron limitation and is involved in iron homeostasis. We found that an *exbD* mutant grown in iron-chelated medium is unable to fix nitrogen. Moreover, we provide evidence that expression of the *nifH* and *nifA* genes is iron dependent in a *H. seropedicae* genetic background.

nitrogen and oxygen levels (Souza *et al.*, 1991). The *nifA* promoter region has binding sites for NtrC, IHF and NifA itself, and the concerted actions of these three proteins are essential for fine-tuning the expression of *nifA* (Wassem *et al.*, 2002). In addition, activity of NifA protein is modulated by iron levels in an *Escherichia coli* background (Souza *et al.*, 1999).

Iron is an essential cofactor for many enzymes involved in cellular processes (Andrews *et al.*, 2003). A common strategy used by gram-negative bacteria when iron is scarce, involves the production of ferric-specific ligands, siderophores, which are secreted into the environment and, the internalization of the ferric-siderophore complexes through specific outer membrane receptors (Andrews *et al.*, 2003). The energy for the transport of ferric-siderophores across the outer membrane is provided by the proton motive force and is transduced to outer membrane receptors by the TonB–ExbB–ExbD complex (Postle & Kadner, 2003).

In the present work, we determined the effect of low iron-availability on nitrogenase activity and expression in *H. seropedicae* Z67 strain. Moreover, we identified an *exbD* mutant and evaluated the requirement of this gene for both

high-affinity siderophore-mediated iron acquisition and nitrogenase activity. To our knowledge, this is the first report showing that nitrogenase activity and, *nifH* and *nifA* expression respond to iron in a *H. seropedicae* background. As *H. seropedicae* is able to fix nitrogen in a free-living state, we consider this bacterium as a reliable biological system to study iron effect on nitrogen fixation in its original background.

Materials and methods

Media and growth conditions

Herbaspirillum seropedicae strains were grown at 30 °C in TY-Ca (tryptone 5 g L⁻¹, yeast extract 3 g L⁻¹, CaCl₂ 0.1 g L⁻¹) (Beringer, 1974) or in NFbHP-malate medium (Klassen *et al.*, 1997) supplemented with 5 mM sodium L-glutamate as a sole nitrogen source (NFbHPG). Different iron availability conditions were obtained with the addition of FeCl₃, FeSO₄ or the metal-chelator 2,2'-dipyridyl (DP) as indicated for each assay. *Escherichia coli* strains were grown at 37 °C in Luria-Bertani (LB) medium. When required, 35 µg mL⁻¹ kanamycin, 5 µg mL⁻¹ nalidixic acid or 10 µg mL⁻¹ tetracycline were added to the medium.

Siderophore production was evaluated as the formation of an orange halo using the chromo azurol sulfonate (CAS) agar plate method (Schwyn & Neilands, 1987).

Construction of *exbD* and *lldD* mutants

The mini-transposon *mTn5gusA-O-pgfp* (C. Xi, unpublished data) is a derivative of *pmTn5gusA-pgfp21* (pFAJ1819) (Xi *et al.*, 1999). This mini-transposon carries a promoterless *uidA* gene, a kanamycin resistance gene, an *E. coli oriV* (IncI) region and two copies of a constitutively expressed *gfp* gene. Plasmid was transferred to *H. seropedicae* Z67 by conjugation using *E. coli* S17-1λpir (Herrero *et al.*, 1990) as donor strain. Random *mTn5gusA-O-pgfp* insertion derivatives of *H. seropedicae* strain Z67 were screened for siderophore overaccumulation in the medium, evaluated as the appearance of a big orange halo in CAS solid medium. To identify the *mTn5gusA-O-pgfp* interrupted genes, tagged locus were cloned in *E. coli* DH10B cells. For this purpose, genomic DNAs from selected mutants were digested with *Pvu* I, an enzyme that does not cut the mini-transposon. Digestion mixtures were ligated using T4 DNA ligase, and mixtures were used to transform *E. coli* competent cells. This was possible because the mini-transposon construction contains an *E. coli oriV* region. Plasmids were recovered from kanamycin-resistant cells and the DNA flanking the mini-transposon insertion was sequenced using an outreading *uidA* sequencing primer (5'-GGGTTGGGGTTTCTACAGGACG-3'), which anneals near the 5'-end of the mini-transposon. Deduced aminoa-

cidic sequences encoded by DNA sequences adjacent to the sites of transposon insertion were analyzed using BLAST searches in nonredundant databases. Southern analysis of *Pvu* I-digested genomic DNAs using biotinylated *mTn5gusA-O-pgfp* as a probe was performed in order to confirm a single insertion of the minitransposon in the genome of each mutant.

Enzymatic activities

Nitrogenase activity of *H. seropedicae* Z67 and XBD mutant strains was determined by the acetylene reduction assay (Dilworth, 1966; Schollhorn & Burris, 1967) With this aim, 1.5 × 10⁸ cells were inoculated in 4 mL of NFbHP semi-solid (1.75 g L⁻¹ agar) medium supplemented with 0.5 mM glutamate, 1% LB medium, with or without 50 µM DP and different concentrations of FeSO₄. Cultures were grown for about 24 h at 30 °C. NADPH-dependent sulfite reductase activity was evaluated according to the method described by Siegel *et al.* (1973). Protein concentration was measured by the Bradford method (Bradford, 1976) using bovine serum albumin as a standard.

Gene expression

As the *exbD* gene seemed to be transcribed in the same orientation as the *uidA* reporter gene in the XBD mutant, *exbD* expression was studied by measuring β-glucuronidase activity. The assay was carried out according to the method described by Jefferson *et al.* (1986) with few modifications. Briefly, 5 mL of NFbHPG medium supplemented with 72 µM FeCl₃ or 50 µM DP, were inoculated with 100 µL of early stationary phase culture. Cultures were then incubated for 16 h, the OD_{620 nm} was determined and aliquots of 300 µL were centrifuged 5 min at 5000 g. Cells were resuspended in 1 mL of extraction buffer (50 mM NaH₂PO₄, 10 mM β-mercaptoethanol, 10 mM EDTA, 0.1% lauryl sarkosine, 0.1% Triton X-100) and incubated 15 min at 37 °C. Reactions were initiated with the addition of 100 µL of 10 mM *p*-nitrophenyl β-D-glucuronide and after incubation at 37 °C, reactions were stopped with the addition of 400 µL of 2.5 M 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol. After centrifugation for 15 min at 15 000 g, the absorbance was determined at 420 nm β-glucuronidase activity was expressed as nmol of *p*-nitrophenol produced per min per OD_{620 nm} of the culture.

Nitrogenase structural genes and *nifA* expression of *H. seropedicae* Z67 wild-type and XBD mutant strains, were evaluated using plasmids pIMA217 and pRW1. Plasmid pIMA217 contains a *H. seropedicae nifH::lacZ* fusion in the Tc^r, IncP plasmid, pMP220 (Machado *et al.*, 1996). Plasmid pRW1 carries a *H. seropedicae nifA::lacZ* fusion in the IncP, low-copy number vector pPW452 (Wassem *et al.*, 2002). Plasmids were transferred to *H. seropedicae* strains by

conjugation using *E. coli* S17-1 as donor strain. *Herbaspirillum* cultures were grown in the same conditions as described for nitrogenase assay and β -galactosidase activity was measured according to the method described by Miller (1972) with the following modifications. Cells grown in semi-solid medium were homogenized and 200 μ L of the homogenate were mixed with 800 μ L of Z buffer (60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 10 mM MgSO_4 , 50 mM β -mercaptoethanol, pH 7.0) supplemented with 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ SDS and 25 $\mu\text{L CHCl}_3$. After 10 min of incubation at 30 °C, the reaction was initiated with the addition of 100 μ L of *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (4 mg mL^{-1} in Z buffer). β -galactosidase activity was expressed as nmols of *o*-nitrophenol produced per min per mg of protein.

The expression of the L-lactate dehydrogenase gene (*lldD*) in the *lldD* mutant (LLD) was determined by measuring the β -glucuronidase activity corresponding to the *uidA* reporter gene present in the minitrasposon. Cells were grown and treated as described for nitrogenase activity assays. β -glucuronidase activity was expressed as nmols of *p*-nitrophenol produced per min per mg of protein.

Results and discussion

Characterization of the *exbD* mutant

A collection of random *mTn5gusA-O-pgfp* insertion derivatives of *Herbaspirillum seropedicae* strain Z67 was screened for siderophore production in CAS solid medium (Schwyn & Neilands, 1987). One mutant (XBD) that overaccumulates siderophores on CAS solid medium and with the minitrasposon inserted in a nucleotidic region that exhibited high similarity to *exbD* genes was selected for further studies. The sequenced region (666 bp) was used to search for similarities in the partial sequence of *H. seropedicae* SmR1 genome (The *Herbaspirillum seropedicae* Genome Sequencing Project, GENOPAR, <http://nfn.genopar.org>). An identical sequence (100 % identity over 666 bp) was found which corresponded to an internal region of a putative *exbD* gene, suggesting that this gene had been inactivated in the mutant strain. Furthermore, the sequence analysis also showed that *exbB*- and *tonB*-like genes were located upstream from *exbD*, probably comprising a single operon *tonBexbBexbD* (Fig. 1), an organization well conserved in bacteria. An ORF similar to a bacterioferritin coding gene (*bfr*) was found downstream the *exbD* gene. The intergenic region between these two presumptive genes included a putative end of transcription sequence (data not shown) suggesting that the *bfr* gene is not part of the same operon. This is consistent with the fact that bacterioferritins are iron-storage proteins and are thus usually expressed under iron sufficient conditions whereas the *tonB*, *exbB* and

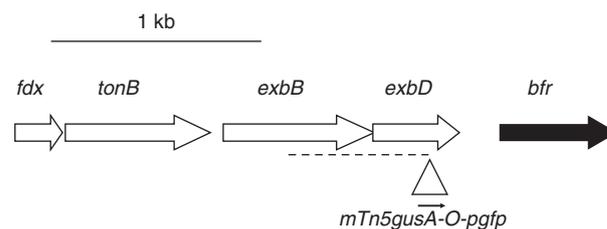


Fig. 1. Physical map of the *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 DNA region containing the *exbD* gene. The dotted line shows the DNA region sequenced in this work. The insertion of the *mTn5gusA-O-pgfp* in the XBD mutant is indicated with a triangle.

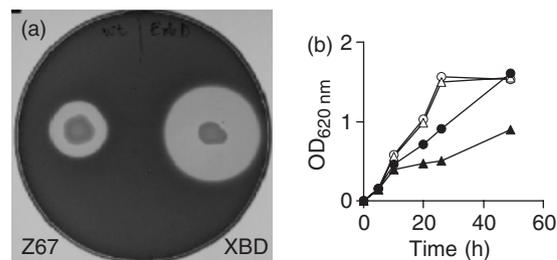


Fig. 2. Phenotype of *Herbaspirillum seropedicae* Z67 wild-type strain and of the *exbD* mutant (XBD). (a) Siderophore production by the wild-type strain (left) and XBD (right) mutant in CAS solid medium. (b) Growth of *H. seropedicae* Z67 wild type (circles) and XBD (triangles) strains in NFBHPG medium supplemented with 72 $\mu\text{M FeCl}_3$ (open symbols) or 50 $\mu\text{M DP}$ (closed symbols).

exbD genes are expressed under iron limitation (Bosch *et al.*, 2002; Andrews *et al.*, 2003; Stork *et al.*, 2004).

The XBD mutant overaccumulates siderophore in the medium (Fig. 2a), but was compromised in its ability to grow in an iron-limited medium compared with the wild-type strain (Fig. 2b). These results indicate that the XBD mutant was apparently unable to uptake its own secreted siderophore. The phenotype of the XBD mutant together with the sequence data obtained indicates that the identified *exbD* gene is involved in siderophore-mediated iron internalization under iron-limited conditions.

Expression of the interrupted *exbD* gene in *Herbaspirillum seropedicae*

Many iron acquisition genes are repressed under iron sufficiency, therefore the effect of iron concentration on the regulation of *exbD* in *H. seropedicae* was tested. For this purpose, the expression of *exbD* gene in the XBD mutant was studied by measuring β -glucuronidase activity. As shown in Table 1, β -glucuronidase activity was sevenfold reduced in iron-supplemented medium compared with a DP-supplemented medium indicating that *exbD* expression is iron regulated. On the other hand, the observation that similar growth of wild-type and mutant strains was obtained

Table 1. Iron response of the *in vivo* expression of *exbD*, *nifH*, *nifA* and of a putative *lldD* gene in *Herbaspirillum seropedicae*

	β-glucuronidase activity*		β-galactosidase activity†			
NFbHP medium	XBD (<i>exbD::uidA</i>)	LLD (putative <i>lldD::uidA</i>)	Z67-pIMA217 (<i>nifH::lacZ</i>)	XBD-pIMA217 (<i>nifH::lacZ</i>)	Z67-pRW1 (<i>nifA</i> <i>::lacZ</i>)	XBD-pRW1 (<i>nifA</i> <i>::lacZ</i>)
+FeCl ₃ 72 μM	68 ± 4‡	449 ± 30	978 ± 187	970 ± 198	2827 ± 214	2414 ± 107
+DP 50 μM	468 ± 2	396 ± 76	225 ± 48	149 ± 24	972 ± 404	1006 ± 518
+FeCl ₃ 75 μM+DP 50 μM	NA§	NA	1109 ± 109	1075 ± 17	2709 ± 264	2644 ± 362

*β-glucuronidase activity is expressed as nmols of *p*-nitrophenol per min per OD_{620nm} for the *exbD::uidA* and as nmols of *p*-nitrophenol per min per mg of protein for the *lldD::uidA*.

†β-galactosidase activity is expressed as nmols of *o*-nitrophenol per min per mg of protein.

‡The data shown are the mean values ± SD of three independent assays. Data from each assay are the average of two measurements.

§Not assayed.

NA, not applicable.

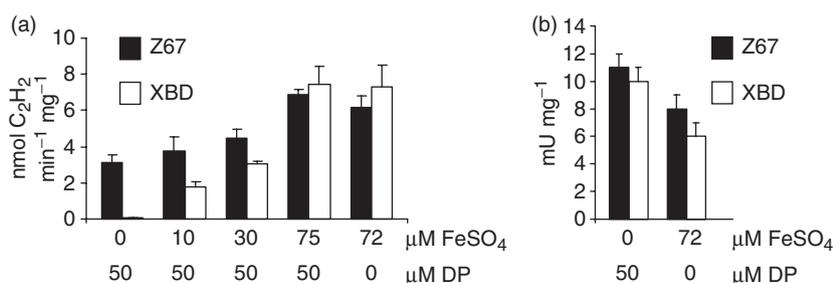


Fig. 3. Effect of iron limitation on nitrogenase (a) and sulfite reductase (b) activities of *Herbaspirillum seropedicae* Z67 and XBD strains. Nitrogenase activity was determined as nmol of ethylene produced per min per mg of protein. Sulfite reductase activity was expressed as milliunits per mg of protein, a unit of activity is defined as that amount of enzyme which catalyzes the oxidation of 1 μmol of NADPH per min. The data shown are the average ± SD (error bars) from at least three independent assays.

in iron-sufficient medium (Fig. 2b), indicates that this gene is not essential under iron sufficiency.

Effect of iron availability on nitrogen fixation

In order to evaluate whether N₂ fixation was affected by iron availability, we measured nitrogenase activity by the acetylene reduction assay. As shown in Fig. 3, wild-type nitrogenase activity was reduced 40–50% when cells were grown in medium supplemented with 50 μM DP compared with a 72 μM FeSO₄ supplemented medium. Klassen *et al.* (2003) previously reported that the nitrogenase activity of *H. seropedicae* was unaffected when no iron was added to the medium. A plausible explanation for these apparently contradictory results could be that in the present work a severe iron-limitation condition was achieved by the presence of DP.

Interestingly, the XBD mutant had no detectable nitrogenase activity in media containing 50 μM DP and without added iron (Fig. 3). Similar nitrogenase activities were obtained for both the wild-type and mutant strains grown under iron-sufficient conditions. Nitrogenase activity could be restored by addition of iron to DP supplemented

medium, indicating that iron is responsible for the observed effect.

To test whether the reduction in nitrogenase activity in iron-limited medium was a nonspecific effect common to all iron-containing proteins, we measured the activity of sulfite reductase, an iron containing protein. As shown in Fig. 3b the wild-type and the XBD mutant strains showed similar enzymatic activity values. Moreover, NADPH-sulfite reductase activity was not reduced in DP-containing medium indicating that iron-limiting conditions do not similarly affect all iron-containing proteins.

The loss or reduction of nitrogenase activity in cells grown in DP-containing medium could be the result of an enzymatic inactivation (e.g. because there is not enough iron to be assembled in this high iron-containing protein). An alternative or complementary explanation is that nitrogenase gene expression is down regulated under iron-restricted conditions. In order to determine the effect of iron on *H. seropedicae* *nifH* and *nifA* gene expression, we evaluated β-galactosidase activity of *H. seropedicae* strains carrying plasmids pIMA217 and pRW1 with the *nifH::lacZ* and *nifA::lacZ* fusions, respectively. The data show that both wild type and mutant strains containing the pIMA217

plasmid had a fivefold decrease in β -galactosidase activity in a DP-containing medium compared with an iron-sufficient medium (Table 1) indicating that *nifH* gene expression is up-regulated by iron. Similar results were obtained for *nifA* expression where a 2.5-fold decrease in activity was observed. As NifA is an activator of the *nifH* operon, we can assume that the reduction in *nifH* expression is due, at least in part, to the reduced levels of NifA protein under iron-depleted conditions.

To analyze whether DP produces a general and nonspecific effect on gene expression, we measured β -glucuronidase activity in another mini-transposon derivative mutant (LLD mutant). In this mutant strain, the mini-transposon was inserted in a region with high similarity with the coding region of Γ -lactate dehydrogenase genes (*lldD*) and the *uidA* reporter gene was in the same orientation as the putative *lldD* gene. Siderophore production by LLD mutant strain grown in CAS solid medium, as well as nitrogenase activity in medium with 72 μ M FeSO₄ or with 50 μ M DP, were similar to that of the wild-type strain (data not shown). As shown in Table 1, β -glucuronidase activity of LLD mutant, was similar in iron-sufficient and in DP-containing medium indicating that the putative *lldD* gene expression is not affected by the presence of 50 μ M DP. Moreover, *exbD* gene expression was increased almost seven times in DP-containing medium. Taken together, results presented in Table 1 clearly shown that *nifA* and *nifH* expression is regulated by iron at the transcriptional level in *H. seropedicae* Z67.

Mutation in the *exbD* gene did not significantly influence *nifH* or *nifA* expression (Table 1), nonetheless nitrogenase activity was abolished when the XBD mutant was grown in iron depleted condition (Fig. 3). This fact may point that, when iron scarcity is extremely severe, nitrogenase assembly and/or activity is also affected.

In conclusion, our findings demonstrate that the activity and expression of nitrogenase respond to iron availability. One strategy used by bacteria to control iron homeostasis is to down-regulate the expression of some iron-containing proteins under iron-restricted conditions (Andrews *et al.*, 2003) and nitrogenase expression can be one more example of such a strategy. We propose that different mechanisms are used by *Herbaspirillum* to modulate nitrogen fixation in response to iron availability. When the bacterium is iron sufficient, nitrogenase expression and activity are optimal. When iron levels are reduced, high-affinity iron acquisition systems are up-regulated, *nifH* and *nifA* gene expression is depressed, nitrogenase could be still correctly assembled and active but requires the products of *nifXorf1* genes (Klassen *et al.*, 2003). This could be the situation expected in natural environments, where free iron is usually scarce. When conditions of iron depletion are extremely severe (as for the *exbD* mutant), nitrogenase activity is lost.

Acknowledgements

We wish to especially thank Mark O'Brian (State University of New York at Buffalo) for critical reading of the manuscript and Chuanwu Xi, and Jos Vanderleyden from the F.A. Janssen Laboratory of Genetics, K. U., Leuven, Belgium, for providing the *mTn5gusA-O-pgfp21* plasmid. The UNU-BioLac program supported F. Rosconi studies at the Departamento de Bioquímica e Biología Molecular, UFPR, Curitiba, PR Brazil. This work was partially supported by the Research Institute for Innovative Technology for the Earth (RITE), Kyoto, Japan, through funds provided to PRG and by the Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), Uruguay.

References

- Andrews SC, Robinson AK & Rodriguez-Quinones F (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 215–237.
- Baldani JI, Baldani VLD, Seldin L & Döbereiner J (1986) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. Nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *Int J Syst Bacteriol* **36**: 86–93.
- Baldani VLD, Baldani JI & Döbereiner J (2000) Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. *Biol Fertility Soils* **30**: 485–491.
- Beringer JE (1974) R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* **84**: 188–198.
- Bosch M, Garrido E, Llagostera M, Perez de Rozas AM, Badiola I & Barbe J (2002) *Pasteurella multocida* *exbB*, *exbD* and *tonB* genes are physically linked but independently transcribed. *FEMS Microbiol Lett* **210**: 201–208.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254.
- Dilworth MJ (1966) Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. *Biochim Biophys Acta* **127**: 285–294.
- Georgiadis MM, Komiya H, Chakrabarti P, Woo D, Kornuc JJ & Rees DC (1992) Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. *Science* **257**: 1653–1659.
- Herrero M, de Lorenzo V & Timmis KN (1990) Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **172**: 6557–6567.
- James EK, Gyaneshwar P, Mathan N, Barraquio WL, Reddy PM, Iannetta PP, Olivares FL & Ladha JK (2002) Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Mol Plant Microbe Interact* **15**: 894–906.
- Jefferson RA, Burgess SM & Hirsh D (1986) β -glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 8447–8451.

- Klassen G, Pedrosa FO, de Souza EM, Funayama S & Rigo LU (1997) Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. *Can J Microbiol* **43**: 887–891.
- Klassen G, Pedrosa FO, de Souza EM, Yates MG & Rigo LU (2003) Nitrogenase activity of *Herbaspirillum seropedicae* grown under low iron levels requires the products of *nifXorf1* genes. *FEMS Microbiol Lett* **224**: 255–259.
- Machado I, Yates M, Machado H, Souza E & Pedrosa F (1996) Cloning and sequencing of the nitrogenase structural genes *nifHDK* of *Herbaspirillum seropedicae*. *Braz J Med Biol Res* **29**: 1599–1602.
- Mayer SM, Lawson DM, Gormal CA, Roe SM & Smith BE (1999) New insights into structure–function relationships in nitrogenase: a 1.6 Å resolution X-ray crystallographic study of *Klebsiella pneumoniae* MoFe-protein. *J Mol Biol* **292**: 871–891.
- Miller JH (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor, New York.
- Pedrosa FO, Benelli EM, Yates MG, Wassem R, Monteiro RA, Klassen G, Steffens MB, Souza EM, Chubatsu LS & Rigo LU (2001) Recent developments in the structural organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Herbaspirillum seropedicae*. *J Biotechnol* **91**: 189–195.
- Postle K & Kadner RJ (2003) Touch and go: tying TonB to transport. *Mol Microbiol* **49**: 869–862.
- Rees DC & Howard JB (2000) Nitrogenase: standing at the crossroads. *Curr Opin Chem Biol* **4**: 559–566.
- Schollhorn R & Burris RH (1967) Acetylene as a competitive inhibitor of N₂ fixation. *Proc Natl Acad Sci USA* **58**: 213–216.
- Schwyn B & Neilands JB (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* **160**: 47–56.
- Siegel LM, Murphy MJ & Kamin H (1973) Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-sulfite reductase of enterobacteria. I. The *Escherichia coli* hemoflavoprotein: molecular parameters and prosthetic groups. *J Biol Chem* **248**: 251–264.
- Souza EM, Funayama S, Rigo LU & Pedrosa FO (1991) Cloning and characterization of the *nifA* gene from *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. *Can J Microbiol* **37**: 425–429.
- Souza EM, Pedrosa FO, Drummond M, Rigo LU & Yates MG (1999) Control of *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity by ammonium ions and oxygen. *J Bacteriol* **181**: 681–684.
- Stork M, Di Lorenzo M, Mourino S, Osorio CR, Lemos ML & Crosa JH (2004) Two *tonB* systems function in iron transport in *Vibrio anguillarum*, but only one is essential for virulence. *Infect Immun* **72**: 7326–7329.
- Wassem R, Pedrosa FO, Yates MG, Rego FG, Chubatsu LS, Rigo LU & Souza EM (2002) Control of autogenous activation of *Herbaspirillum seropedicae* *nifA* promoter by the IHF protein. *FEMS Microbiol Lett* **212**: 177–182.
- Xi C, Lambrecht M, Vanderleyden J & Michiels J (1999) Bi-functional *gfp*- and *gusA*-containing mini-Tn5 transposon derivatives for combined gene expression and bacterial localization studies. *J Microbiol Methods* **35**: 85–92.

CAPÍTULO 4: IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS SEROBACTINAS, UN GRUPO DE SIDERÓFOROS LIPOPEPTÍDICOS PRODUCIDOS POR *Herbaspirillum seropedicae*

Rosconi, F., Davyt, D., Martinez, V., Martinez, M., Abin-Carriquiry, J.A., Zane, H., Butler, A., de Souza, E.M., y Fabiano, E. (2013) *Identification and structural characterization of serobactins, a suite of lipopeptide siderophores produced by the grass endophyte Herbaspirillum seropedicae*. Environ Microbiol **15**(3): p. 916-27.

Resumen

El objetivo del trabajo presentado en este capítulo fue identificar y caracterizar los sideróforos producidos por *H. seropedicae*. Mediante herramientas computacionales y partiendo de la secuencia del gen Hsero_2343 codificante para una NRP-Sintetasa, interrumpido en la mutante 4.3, se predijo la estructura química del sideróforo. Esta estructura se confirmó luego por análisis químico. A partir de los resultados obtenidos concluimos que los sideróforos producidos por *H. seropedicae* Z67 son un conjunto de lipopéptidos anfifílicos, a los cuales nombramos como serobactina A, B y C, que varían en la longitud de la cadena del ácido graso. Se demostró además la actividad biológica de las serobactinas como fuentes nutricionales de hierro para *H. seropedicae*. Estos son los primeros sideróforos estructuralmente caracterizados producidos por bacterias endófitas.

Objetivos

1. Identificar la estructura química de los sideróforos producidos por *H. seropedicae*
2. Comprobar la actividad biológica de estas moléculas como fuentes nutricionales de hierro

Principales resultados

En este capítulo se demostró que *H. seropedicae* produce un grupo de sideróforos lipopeptídicos con igual estructura peptídica pero con diferente largo de la cadena del ácido graso, siendo todos ellos sintetizados por la NRP-Sintetasa producto del gen Hsero_2343. Se decidió nombrarlos serobactinas. Comprobamos que el complejo Fe³-serobactina se une al hierro de forma hexadentada y posee una estequiometría 1:1. La unión al hierro está dada por dos grupos α -

hidroxicarboxilatos (2 β -hidroxiaspartatos) y un grupo hidroxamato (N^5 -ciclohidroxiornitina). Demostramos que las serobactinas comparten las dos características descritas para la mayoría de los sideróforos producidos por bacterias marinas: anfifilicidad y fotorreactividad. Mediante ensayos de crecimiento en medio líquido y bioensayos en medio sólido se confirmó la función esperada de sideróforo para las serobactinas identificadas.

Conclusiones

Dada la función de las serobactinas en la adquisición de hierro por *H. seropedicae* Z67, su producción sería una característica importante para la vida celular cuando la bacteria se encuentra en ambientes donde la disponibilidad de hierro es escasa.

Los nichos naturales de *H. seropedicae* incluyen la rizósfera y tejidos internos de pastos tropicales, que están protegidos de la luz solar. Sin embargo, *H. seropedicae* se encuentran en gran número en los vasos del xilema de las hojas de arroz, sorgo, maíz, trigo y plantas e incluso en la superficie de las hojas de arroz, que está expuesta a la luz solar. Por lo tanto, de producirse serobactinas en estos nichos y formarse el complejo con Fe^{3+} se desencadenaría el proceso fotorreactivo. A pesar del predominio de sideróforos marinos fotorreactivos cuando se encuentran coordinados al ion Fe^{3+} , la importancia biológica de esta fotorreactividad, sigue siendo desconocida [201]. El destino del Fe^{2+} derivado de esta reacción es incierto y necesita de más estudios.

Contribución personal al trabajo y aporte a los objetivos planteados

En el trabajo presentado en este capítulo realicé los estudios bioinformáticos de la NRP-Sintetasa, las caracterizaciones biológicas de los compuestos purificados, la caracterización de las mutantes y puse a punto las condiciones de producción óptimas de los sideróforos. Con la colaboración de Danilo Davyt, de la Cátedra de Química Farmacéutica de la Facultad de Química, y con el personal de la Plataforma HPLC del IIBCE desarrollamos el protocolo de purificación de las serobactinas y participé del análisis de estos resultados. El análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF lo hice con la colaboración del personal del UByPA, IP Mont y D. Davyt. Otros ensayos complementarios de espectrometría de masas los realicé en colaboración con el grupo de Emanuel de Souza, en Curitiba, Brasil, durante pasantías financiadas por un proyecto bilateral PROSUL-CNPq. EL resto de los ensayos químico-analíticos, como la fotorreactividad y quiralidad de los aminoácidos los realicé durante una pasantía financiada por PEDECIBA en el Department of

Chemistry and Biochemistry, University of California Santa Barbara, EE.UU., liderado por Alison Butler. Los ensayos de NMR fueron realizados y analizados por el grupo de D. Davyt.

Identification and structural characterization of serobactins, a suite of lipopeptide siderophores produced by the grass endophyte *Herbaspirillum seropedicae*

Federico Rosconi,^{1*} Danilo Davyt,³
Verónica Martínez,³ Marcela Martínez,²
Juan Andrés Abin-Carriquiry,² Hannah Zane,⁴
Alison Butler,⁴ Emanuel M. de Souza⁵ and
Elena Fabiano¹

¹Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas and ²Plataforma HPLC, IIBCE, Montevideo, Uruguay.

³Cátedra de Química Farmacéutica, Facultad de Química, Montevideo, Uruguay.

⁴Department of Chemistry and Biochemistry, UCSB, Santa Barbara, USA.

⁵Departamento de Bioquímica e Biología Molecular, UFPR, Curitiba, Brazil.

Summary

Herbaspirillum seropedicae Z67 is a diazotrophic endophyte able to colonize the interior of many economically relevant crops such as rice, wheat, corn and sorghum. Structures of siderophores produced by bacterial endophytes have not yet been elucidated. The aim of this work was to identify and characterize the siderophores produced by this bacterium. In a screening for mutants unable to produce siderophores we found a mutant that had a transposon insertion in a non-ribosomal peptide synthase (NRPS) gene coding for a putative siderophore biosynthetic enzyme. The chemical structure of the siderophore was predicted using computational genomic tools. The predicted structure was confirmed by chemical analysis. We found that siderophores produced by *H. seropedicae* Z67 are a suite of amphiphilic lipopeptides, named serobactin A, B and C, which vary by the length of the fatty acid chain. We also demonstrated the biological activity of serobactins as nutritional iron sources for

H. seropedicae. These are the first structurally described siderophores produced by endophytic bacteria.

Introduction

Endophytic bacteria colonize internal tissues of plants without causing disease to the host (Ryan *et al.*, 2008; Reinhold-Hurek and Hurek, 2011). *Herbaspirillum seropedicae* Z67, a member of the *Betaproteobacteria* class, is a plant endophytic bacterium able to colonize and survive within tissues of many important agricultural crops such as rice, sorghum, wheat, corn and sugar cane (Baldani *et al.*, 1986; James *et al.*, 2002). This bacterium, which was isolated in Brazil (the name refers to the location of the EMBRAPA National Center for Agrobiological in Seropédica, Rio de Janeiro), is of biotechnological interest due to its nitrogen-fixing and plant growth-promoting capabilities (Gyaneshwar *et al.*, 2002; Roncato-Maccari *et al.*, 2003).

The nitrogen-fixation process is highly dependent on iron (Rees and Howard, 2000). We demonstrated that in *H. seropedicae* Z67 the activity and expression of nitrogenase respond to iron availability (Rosconi *et al.*, 2006). Our results indicated that under iron sufficient conditions, nitrogenase activity and *nif* gene expression are optimal. Whereas when the iron level is reduced, *nifH* and *nifA* expression is depressed and under severe iron depletion the nitrogenase activity is completely lost. In addition to biological nitrogen fixation, numerous metabolic processes depend on iron including respiration, amino acid synthesis, and the Krebs cycle (Andrews *et al.*, 2003). Despite its relevance, information about systems involved in iron homeostasis in *H. seropedicae* is scarce. Moreover, very little is known about the iron role in the interaction between plant and endophytes. With the exception of epichloënin, a ferrichrome-related siderophore produced by the fungal endophyte *Epichloë festucae* (Koulman *et al.*, 2012), to our knowledge, no other siderophore produced by a plant endophyte has been structurally and functionally characterized.

Analysis of the published genome sequence of *H. seropedicae* SmR1 showed that at least 27 genes are

Received 2 May, 2012; revised 28 November, 2012; accepted 10 December, 2012. *For correspondence. E-mail federh@iibce.edu.uy; Tel. (+598) 24871616 ext. 146; Fax (+598) 24875461. The authors have declared that no competing interest exists.

predicted to be involved in iron transport and metabolism. A putative gene (Hsero_2343) coding for a modular peptide synthase has been identified as a likely candidate in siderophore biosynthesis (Pedrosa *et al.*, 2011).

Siderophores are low molecular weight metabolites with masses below 2000 Da that have a very high affinity for ferric ion (Schalk *et al.*, 2011). Their main role is to provide the cell with nutritional iron. Siderophore production is widespread among bacteria and fungi and is found even in higher plants. The major Fe³⁺ ligands found in bacterial and fungal siderophores are catecholates, hydroxamic acids, and α -hydroxycarboxylic acids, although the overall structures differ widely among known siderophores (Miethke and Marahiel, 2007). Depending on the biosynthetic pathways, siderophores can be classified as Non-Ribosomal Peptide Synthetases (NRPS)-dependent or NRPS-independent (Challis, 2005).

NRPSs are the focus of intense investigation. These synthetases are modular enzymes containing consecutive arrays of tandem domains and are involved in the synthesis of peptide siderophores, antibiotics or surfactants (Strieker *et al.*, 2010). Each module is responsible for the incorporation of a specific residue into the peptide backbone. Usually, modules are colinear with the amino acids they link according to the N-terminal-to-C-terminal colinearity rule (Grunewald and Marahiel, 2006). Each NRPS module contains at least three domains: an adenylation domain (A), a peptidyl-carrier protein (PCP) or T domain and a condensation domain (C). The A domain is responsible for the recognition of the amino acid and its activation as an acyl adenylate. The activated amino acid is then transferred to the thiol group of the 4'-phosphopantetheine cofactor present at the PCP domain where a thioester bond is produced. The C domain joins two substrates through a condensation reaction performing the peptide elongation. An additional domain, the thioesterase (TE) domain, located at the end of the module, catalyses the release of the peptide by either hydrolysis or macrocyclization (Strieker *et al.*, 2010). This basic structure can be complemented by substrate-modifying domains, including substrate epimerization, α -hydroxylation, N methylation, and heterocyclic ring formation.

A large database of novel NRPS gene sequences is present in microbial genomes and metagenomes. *In silico* analyses of the amino acid sequences allow the substrate specificity of the A-domain to be predicted through particular sequence signatures or through machine learning methods (Jenke-Kodama and Dittmann, 2009; Rottig *et al.*, 2011). Phylogeny and sequence examination also allow the prediction of functional subtypes of C domains (^LC_L, ^DC_L, starter, heterocyclization, epimerization, and dual E/C domains), giving relevant information to aid structural determination, such as prediction of the amino acid isomeric form (D or L) in the nascent peptide, the

presence of an β -hydroxy-carboxylic acid in the first amino acid, cyclization of cysteine, serine or threonine residues or amino acid epimerization, etc. (Rausch *et al.*, 2007). Genome mining and bioinformatics approaches are promising strategies for the discovery and design of new peptides derived from NRPS (Winter *et al.*, 2011).

In this work we identified an NRPS of the plant growth-promoting endophyte *H. seropedicae* Z67 responsible for synthesizing siderophores. Computational genomics of the NRPS sequence enabled prediction of the siderophore structure. The isolated siderophores, named the serobactins A–C, were structurally characterized, as reported herein. Furthermore, we showed that these siderophores can be used by *H. seropedicae* as an iron source. These results suggest that production of siderophores by *H. seropedicae* is an important trait in environments where iron is scarce.

Results

Identification of an NRPS gene implicated in siderophore biosynthesis in H. seropedicae Z67

Colonies of *H. seropedicae* Z67 produce a strong orange halo on chromo azurolsulfonate (CAS) plates indicative of siderophore production. We used this CAS assay in a genetic screen for mutants unable to produce siderophores. From random mutagenized derivatives of *H. seropedicae* Z67, a mutant named Hs 4.3 that did not produce a visible halo on CAS plates (Fig. 1A) was selected. Southern blot analysis confirmed that the Hs 4.3 mutant had a single transposon insertion. Supernatants from cultures of wild type and Hs 4.3 mutant were applied to Sep Pak cartridges and the presence of iron-binding compounds in the eluents was investigated by using the CAS assay. Only the supernatant of the wild-type strain grown in low iron media showed CAS activity (Fig. 1B). Thus, the interrupted locus was essential for siderophore production in the CAS medium, suggesting that *H. seropedicae* Z67 produces a unique siderophore or that different siderophores produced share a common biosynthetic gene.

The DNA sequence of the 5' transposon flanking region in the Hs 4.3 mutant was determined. Results obtained by BLASTx searches in the *H. seropedicae* SmR1 genome (Pedrosa *et al.*, 2011) indicated that transposon insertion was in a locus identical (100% identity) to Hsero_2343. The genome sequence of *H. seropedicae* Z67 has been sequenced by the Parana State Genome Programme (Genopar Consortium) using the next generation platform ABI-Solid, and only single nucleotide polymorphisms were found in comparison with the genome of *H. seropedicae* SmR1 strain (E. M. de Souza, results unpubl.). Therefore we retrieved the entire sequence of Hsero_2343 for further analyses. The deduced product

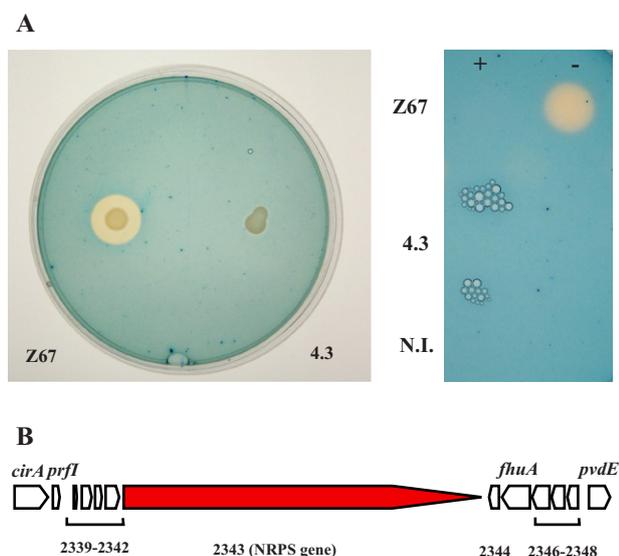


Fig. 1. Siderophore production of *H. seropedicae* Z67 wild-type strain and Hs 4.3 mutant strain grown on solid or in liquid medium. A. Ten microlitres of a late exponential phase cultures containing 1×10^6 cfu were spotted on the CAS solid medium and incubated 48 h at 30°C.

B. Supernatants obtained from 50 ml of early stationary phase cultures (containing about 1×10^8 cfu ml⁻¹) of wild-type *H. seropedicae* Z67 and Hs 4.3 mutant strains grown in NfbHP-GG media with (+) or without (-) 37 µM FeCl₃ were purified with Sep Pak cartridges as described in *Experimental procedures*. Five microlitres of each purified supernatants were spotted on CAS solid medium. N.I. refers to non-inoculated media.

C. Genomic context of the NRPS interrupted gene (red) in the Hs 4.3 mutant. Positions of predicted ORFs are indicated by arrows and correspond to the following Locus tags: Hsero_2337 (*cirA* gene), Hsero_2338 (*prfI* gene), Hsero_2339 to Hsero_2343 (NRPS gene), Hsero_2344, Hsero_2345 (*fhuA* gene), Hsero_2346 to Hsero_2348 and Hsero_2349 (*pvdE* gene) from left to right respectively. Information of each ORF is summarized in Table 1.

of Hsero_2343 is a NRPS of 9160 amino acids (993 755 Da). The genetic context of Hsero_2343 in *H. seropedicae* SmR1 is depicted in Fig. 1C and information of each locus summarized in Table 1. This context includes genes encoding proteins with homology to NRPS

tailoring enzymes, those involved in siderophore biosynthesis and processing, regulators of siderophore production and siderophore transporters (Agnoli *et al.*, 2006; Cornelis, 2010).

Prediction of the siderophore structure

To obtain insight into the chemical structure of the *H. seropedicae* Z67 siderophore, we applied a computational analysis of the NRPS coded by Hsero_4323. Knowledge of the probable structure is a useful tool for the design and analysis of purification and chemical characterization approaches. The domain architecture of the enzyme encoded by the Hsero_2343 locus and the specificity of A domains were predicted using publically available software (Ansari *et al.*, 2004; Bachmann and Ravel, 2009; Finn *et al.*, 2010; Markowitz *et al.*, 2010; Rottig *et al.*, 2011) and the predicted architecture is shown in Fig. 2. The predicted biosynthetic cluster comprises six classical NRPS modules (C-A-T), and a terminal TE. The first domain of the predicted protein presented homology with AMP-dependent synthetase/ligase (Pfam 00501, $e = 2.1^{-91}$), acyl-CoA synthetase related enzymes (PTHR 22754:SF4 $e = 7.4^{-136}$) and to members of the fatty acyl-AMP ligase family (FAAL, cd05931, $e = 0$). Taking into account the 30 and 31% identity with the first domain of NRPSs involved in iturin and mycosubtilin lipopeptide biosynthesis respectively (Hansen *et al.*, 2007; Chooi and Tang, 2010) and the 52% identity with the first domain of PvdL responsible for pyoverdinin acylation (Drake and Gulick, 2011), we hypothesized that the first residue in the siderophore was a fatty acid. *In silico* analysis of the adenylation domains indicated that the subsequent five residues were aspartic acid, serine, aspartic acid, threonine and serine, in that order. The last residue could not be clearly predicted, as different software analysis predicted different amino acids. Probable residues were glutamine, lysine or N⁵-hydroxyornithine according to the procedure described by Ansari and colleagues (2004) and

Table 1. Genomic context of *H. seropedicae* NRPS gene.

Locus tag	ORF predicted function	Gene annotation	GenBank Accession
Hsero_2337	TonB-dependent siderophore receptor protein	<i>cirA</i>	YP_003775744
Hsero_2338	Ferric regulator sigma-24 subunit	<i>prfI</i>	YP_003775745
Hsero_2339	MbtH-like protein		YP_003775746
Hsero_2340	thioesterase involved in non-ribosomal peptide biosynthesis protein		YP_003775747
Hsero_2341	4'-phosphopantetheinyl transferase (EC:2.7.8.-)		YP_003775748
Hsero_2342	clavaminc acid synthetase like protein		YP_003775749
Hsero_2343	non-ribosomal peptide synthetase		YP_003775750
Hsero_2344	esterase/lipase		YP_003775751
Hsero_2345	TonB-dependent receptor protein	<i>fhuA</i>	YP_003775752
Hsero_2346	L-ornithine N ⁵ -monooxygenase (EC:1.13.12.-)		YP_003775753
Hsero_2347	acetyltransferase-like protein		YP_003775754
Hsero_2348	Iron reductase		YP_003775755
Hsero_2349	siderophore (cyclic peptide) ABC transporter protein	<i>pvdE</i>	YP_003775756

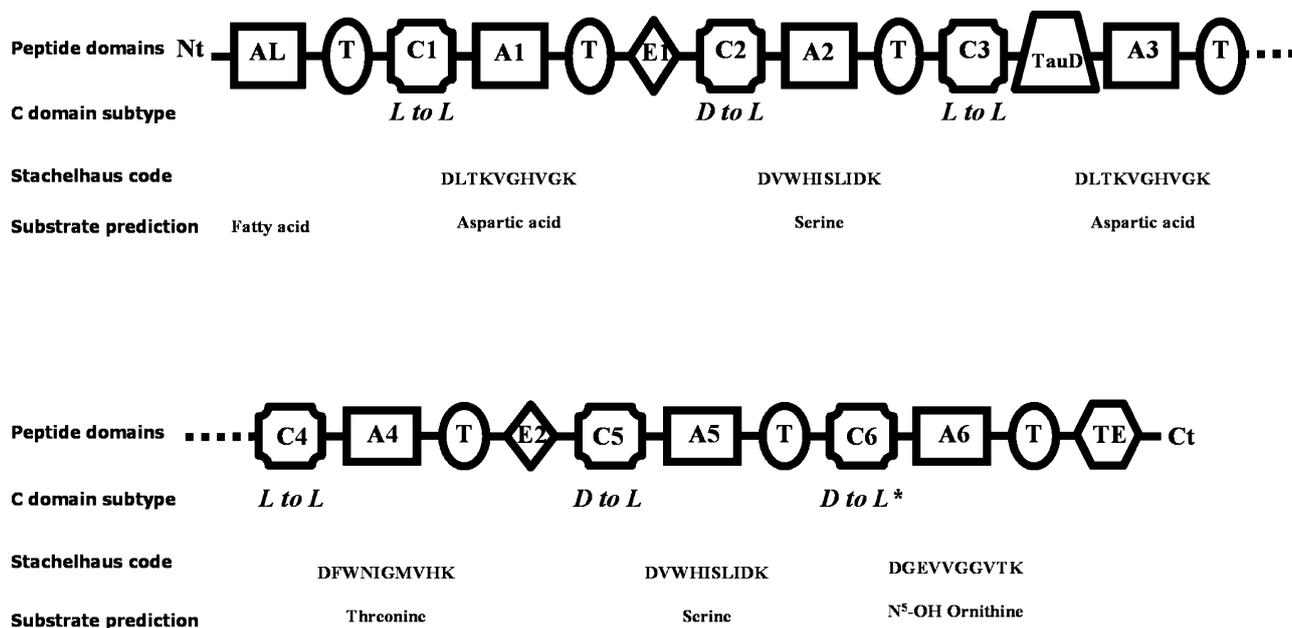
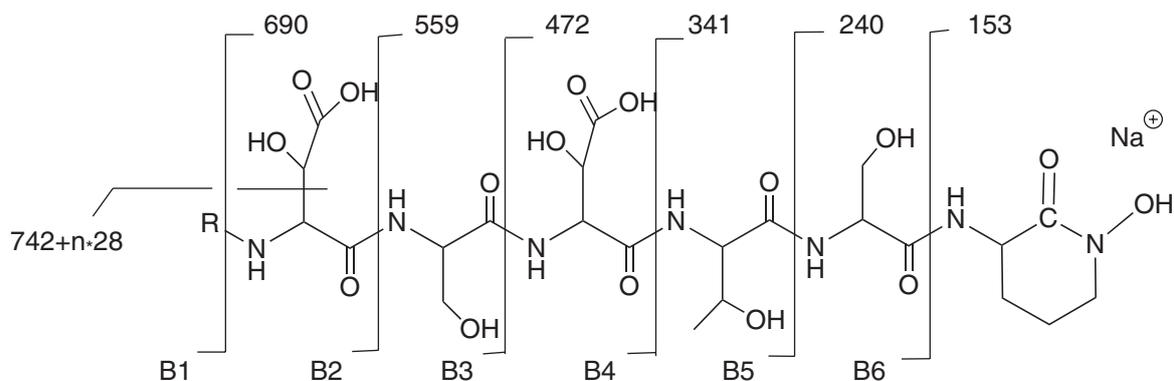
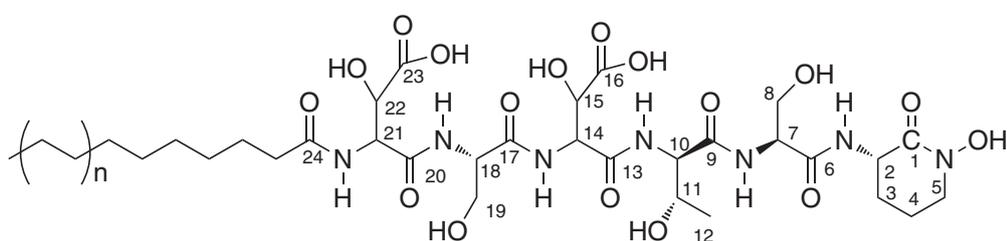


Fig. 2. Domain architecture of the NRPS protein codified by the Hsero_2343 locus. Below each A domain (A1 to A6) is shown the Stachelhaus '8 amino acid code' (delimited by the conserved aspartate and lysine residues) and the predicted substrate. Below each C domain (C1 to C6) is shown the predicted subtype according to the phylogenetic and functional classification described by Rausch and colleagues (2007). *Although the sixth C domain clustered within the ^DC_L branch, biochemical characterization showed that it corresponds to a ^LC_L subtype. Domains symbols: AL, acyl ligase; A, adenylation; T, thiolation; C, condensation; E, epimerization; TauD, pfam02668.

Rottig and colleagues (2011) or by Bachmann and Ravel (2009). Analysis of the genomic context in *H. seropedicae* SmR1 indicates that Hsero_2346 and Hsero_2347 loci encode proteins with homology to L-lysine/ornithine-N-monooxygenase and acetyl transferase-like proteins respectively (Table 1). It has been reported that the concerted action of both enzymes is responsible for the insertion of an hydroxamic acid group into other siderophores (Challis, 2005). Thus we propose that the last residue is converted to hydroxamic acid. The presence of a TauD domain in the NRPS (Fig. 2) and the proximity to a putative TauD homologue (encoded by Hsero_2342) (Table 1) suggested hydroxylation of the aspartic acid residues (Singh *et al.*, 2008). The presence and location of two epimerase domains (Fig. 2) suggested that the first aspartic acid (β -hydroxyaspartic acid) and threonine (fifth residue) have a D configuration. Moreover, the second C-domain (presumably responsible for the condensation of the first β -hydroxyaspartic acid with serine), and the fifth C-domain (probably involved in the condensation of threonine and serine) were phylogenetically related to ^DC_L-domain subtypes (Fig. S1) (Rausch *et al.*, 2007) involved in the condensation of D-amino acid in the nascent peptide to the L-amino acid of the next NRPS module. The sixth C-domain (predicted to be responsible for the condensation of serine with the last residue) also clustered within the ^DC_L branch, although no associated epimerase domain was observed (Figs 2 and S1).

Purification and structural characterization of the siderophores produced by H. seropedicae

In order to proceed with the chemical characterization and purification of the siderophore, supernatants of *H. seropedicae* Z67 cells grown in NfbHP-GG media were collected and subjected to purification by analytical and preparative HPLC (high-performance liquid chromatography) (see elution profiles in Fig. S2). Three metabolites with CAS activities were isolated corresponding to retention times of 16.5 min, 19.9 min and 23.7 min. These compounds were named serobactin A, serobactin B and serobactin C respectively. The amounts recovered of each compound were less than one milligram. The MALDI-TOF mass spectrum of the major component, serobactin B, exhibited a peak of m/z 872.37 Da (Fig. S3A) which was determined to be the $[M + Na]^+$ ion by MALDI-TOF MS/MS. Masses of 'y' fragments (Roepstorff and Fohlman, 1984) obtained by MALDI-TOF tandem MS/MS indicated that the second to the sixth residues were β -hydroxyaspartic acid, serine, β -hydroxyaspartic acid, threonine and serine (Fig. S3B). This peptide sequence is in agreement with the serobactin-predicted structure obtained by computational genomics (Fig. 3A). The mass obtained for the seventh residue (153.07 Da) did not correspond to N⁵-OH-ornithine, but rather to a N⁵-OH-cycloornithine associated with a Na⁺ ion. This result supports one of the *in silico*

A**B**

- 1 A, n = 1
- 2 B, n = 2
- 3 C, n = 3

Fig. 3. Chemical structures of serobactins A, B and C.

A. Structure of fragments obtained by MALDI-TOF MS/MS. Vertical lines show the masses $[M + Na + H]^+$ of the 'y' fragments (Roepstorff and Fohlman, 1984) (see Fig. S3B). These fragments are common for serobactin A, B and C. R represents the fatty acid tail appendages of serobactins A, B and C.

B. Overall structure of serobactins A, B and C.

predictions, suggesting that the protein encoded by Hsero_2346 (a probable L-ornithine- N^5 -monooxygenase) could be involved in the hydroxylation of the N^5 of ornithine, followed by cyclization by the last TE domain. As a result of the action of these two enzymes, a hydroxamic acid group is generated. The cyclic nature of the last residue was later confirmed by analysing the methylated derivatives of serobactin B by MALDI-TOF mass spectrometry, which showed an increase of only 28 Da (m/z 900.42 Da) indicating dimethylation of serobactin B (Fig. S4A), as opposed to 42 Da if a terminal carboxylate had been present. Moreover, results obtained by MALDI-TOF tandem MS/MS confirmed that methylation occurs at the β -hydroxyaspartic residues (Fig. S4B). Based on the data obtained by MS and MS/MS (not shown), the structures of serobactin A and serobactin C are homologous of serobactin B, with the decrease of 28 Da or increase of 28 Da, respectively, at the N-terminus of the peptide (Fig. 3B).

By using a preparative purification protocol (Fig. S2B), 10 mg of serobactin A (retention time of 25.5 min) and 16 mg of serobactin B plus serobactin C (which eluted together at 29.0 min) were obtained, along with a minor peak with a retention time of 27.5 min. This minor peak had a mass of 866.37 Da, and the MALDI-TOF MS/MS analysis indicated that it had the same peptide core of serobactins A, B and C with a different fatty acid residue. Unfortunately, this minor compound could not be further characterized. Serobactin B and serobactin C were successfully separated by an alternative preparative purification protocol performed under isocratic conditions (not shown).

The final structure of serobactin B was elucidated by NMR (nuclear-magnetic resonance). The 1H and ^{13}C chemical shift assignments are summarized in Fig. 4, Table 2 and Fig. S5. The results confirmed the amino acid sequence indicated by mass spectrometry. Analyses of NMR spectra, as well as the absence of free amines

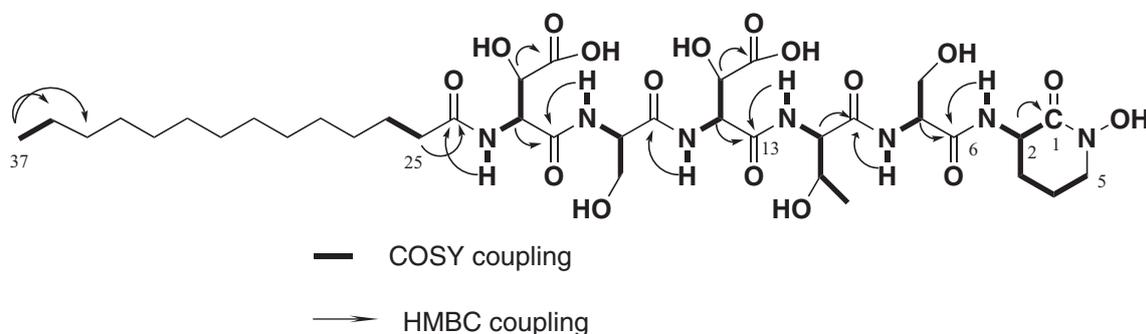


Fig. 4. Selected correlations in 2D NMR spectra of serobactin B.

determined by EttanCaf (not shown), support results obtained by MALDI-TOF analysis, demonstrating that the C-terminal residue is a cyclic N⁵-OH-ornithine.

The ¹H-NMR spectrum of serobactin B displayed signals distinctive of a lipid chain (16 protons at 1.24 ppm coupled to a triplet signal at 0.86 ppm and to methylenes at 1.47 and 2.15 ppm). The ¹H-NMR spectrum presented six signals characteristic of amides, while the 2D spectra (TOCSY and HMBC) indicated that one resonance corresponded to an amide coupled with a fatty acid chain (Fig. 4).

Finally, to confirm that the serobactins are lipopeptides distinguished by different fatty acids, the serobactins A, B and C were partially hydrolysed and their methyl esters were analysed by GC-MS to identify the fatty acids. Decanoic, lauric and myristic acids were found in serobactins A, B and C respectively. The GC-MS spectrum of serobactin B is shown in Fig. S6. In conclusion, *H. seropedicae* Z67 produces a new suite of amphiphilic siderophores with a common peptide core substituted by fatty acids of different lengths (Fig. 3B).

Amino acid chirality analysis

As stated above, the domain architecture of the NRPS responsible for the biosynthesis of serobactin, predicted that the first β-hydroxyaspartic acid and the threonine have D configurations. In order to confirm this prediction, the amino acid analysis was carried out using Marfey's reagent, as previously carried out for characterization of other siderophores (Martinez *et al.*, 2000; Bhushan and Bruckner, 2004; Homann *et al.*, 2009; Vraspir *et al.*, 2011; Kreutzer *et al.*, 2012). The amino acid content of serobactin was revealed through both reductive hydrolysis with 2M HI and non-reductive hydrolysis with 6M HCl (Fig. S7A and B, Table S1). Stereochemical assignments of peaks were made by co-injections with Marfey's derivatized standards (data not shown). Results obtained demonstrate that the molecule contains D-threonine, both DL-*threo*-β-hydroxyaspartic acids, L-serine and

Table 2. ¹H (400 MHz) and ¹³C NMR (100 MHz) data for serobactin B (12 mg) in d₆-DMSO.

	δ _H (J in Hz)	δ _C (J in Hz)	HMBC
	Cyclic, N-OH Ornithine		
1	–	170.5	1
2	4.31, m	49.8	
3	1.67, m; 1.92, bs	27.6	
4	1.92, bs	20.7	
5	3.46, m	51.2	
N2	8.06, d (8.6)		6
	Serine		
6	–	169.9	
7	4.31, m	55.2	
8	3.60, bs	62.0	
N3	7.83, d (7.9)		9
	Threonine		
9	–	170.3	
10	4.21, m	58.8	9, 11
11	3.80, m	68.9	
12	1.04, d (6.0)	20.5	10, 11
N4	7.73, d (7.9)		13
	β-OH Aspartic Acid		
13	–	169.2	
14	4.70, d (8.6)	55.6	15
15	4.51, d (8.6)	70.0	16
16	–	173.5	
N5	8.06, d (8.6)		17
	Serine		
17	–	170.1	
18	4.39, m	54.6	
19	3.42, m; 3.66, m	61.8	
N6	7.67, d (7.2)		20
	β-OH Aspartic Acid		
20	–	169.9	
21	4.70, d (8.6)	56.1	22, 23
22	4.51, d (8.6)	70.4	23
23	–	173.5	
N7	7.87, d (8.6)		24
	Fatty Acid Tail		
24	–	173.1	
25	2.15, t (6.6)	35.7	24, 26
26	1.47, bs	25.7	
27	1.15–1.35 bs	29.0	
28	1.15–1.35 bs	29.2	
29	1.15–1.35 bs	29.3	
30	1.15–1.35 bs	29.5	
31	1.15–1.35 bs	29.4	
32	1.15–1.35 bs	29.3	
33	1.15–1.35 bs	31.7	
34	1.15–1.35 bs	22.5	
35	0.86, t (6.4)	14.4	35, 36

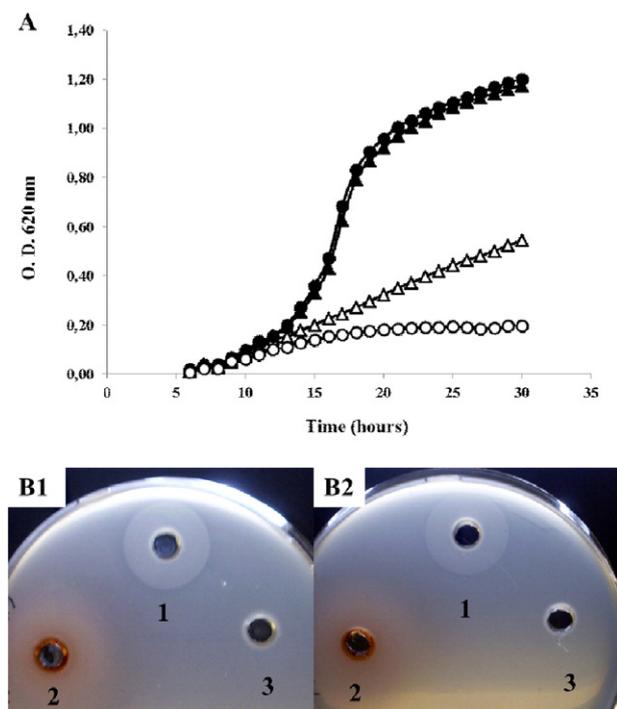


Fig. 5. Growth assays.

A. Growth of *H. seropedicae* Z67 wild-type strain (triangles) and of Hs 4.3 mutant strain (circles) in NfbHP-GG medium containing 37 μM FeCl_3 (solid symbols), and in NfbHP-GG medium plus 25 μM 2,2'-dipyridyl (open symbols).

B. Bioassays of *H. seropedicae* Z67 wild-type strain (B1) and of Hs 4.3 mutant strain (B2). Bacteria were grown in TY solid medium plus 500 μM EDDHA. Twenty microlitres of a 300 nM Fe^{3+} -serobactin (well 1), 37 mM FeCl_3 (well 2) and purified supernatant of Hs 4.3 mutant cells (well 3) were added to a 5 mm hole in the agar.

L-ornithine. The absence of a D-serine showed that the sixth condensation domain in *H. seropedicae* NRPS corresponds to a $^1\text{C}_\text{L}$ subtype.

The iron complex of serobactin

Iron(III) complexation by serobactins is expected to occur through coordination of both β -hydroxyaspartic acid groups and the hydroxamic acid group present in the cyclic N^5 -hydroxyornithine, in an hexadentate manner. Thus, a 1:1 stoichiometry is expected for the Fe^{3+} -serobactins complexes. Additionally, the presence of β -hydroxyaspartic acid suggested that the Fe^{3+} -serobactin complex would be photoreactive, as has been described for other siderophores containing α -hydroxycarboxylic acids (Barbeau *et al.*, 2001; Vraspir and Butler, 2009; Butler and Theisen, 2010; Kreuzer *et al.*, 2012). To test these hypotheses, equimolar quantities of serobactin A and FeCl_3 were mixed and the product was then purified by HPLC and analysed by ESI-MS (Fig. S8A and B). The peaks m/z (436.12 Da) and m/z (873.28 Da) correspond

to the Fe^{3+} -serobactin A complex confirming a 1:1 stoichiometry. The UV-Vis spectrum (Fig. S8C) shows two absorption bands at c. 300 nm and 440 nm, consistent with coordination by both β -hydroxyaspartic acid groups and the hydroxamic acid group to Fe^{3+} (Barbeau *et al.*, 2001; Homann *et al.*, 2009). After 180 min of UV radiation, the charge-transfer band from hydroxamic acid- Fe^{3+} (440 nm) remained while the charge-transfer band from β -hydroxyaspartic acids- Fe^{3+} (300 nm) was lost indicating that the Fe^{3+} -serobactin complexes are photoreactive.

Biological activity of serobactins

Growth of the wild type and the Hs 4.3 mutant strains were evaluated in liquid NfbHP-GG medium supplemented with 37 μM FeCl_3 or with 25 μM 2,2'-dipyridyl. Both the mutant and the wild type grew at slower rate in the iron depleted medium, but the former was more sensitive to the presence of the chelator (Fig. 5A). In order to assess the use of serobactins as iron nutritional source, we performed bioassays as previously described (Amarelle *et al.*, 2010). As shown in Fig. 5B1 and B2, ferric serobactins were able to restore the growth of the wild type and the Hs 4.3 mutant strains in the presence of the iron chelator. Moreover, the Sep Pak-extracted supernatant of the Hs 4.3 mutant could not restore the growth. Both, growth and bioassay experiments, demonstrated the biological role of serobactins as nutritional iron sources.

Discussion

In this work we structurally characterized the serobactins, a new suite of amphiphilic siderophores produced by the grass endophyte *H. seropedicae* Z67. In addition we demonstrate that serobactins are the only siderophores produced by *H. seropedicae* Z67 under the conditions assayed. This conclusion is based on the fact that the Hs 4.3 mutant strain did not produce a visible halo on CAS plates and no detectable fractions with siderophore activity were detected in Hs 4.3 culture supernatants. Serobactins share two structural features common to many siderophores produced by aquatic bacteria discovered to date: (i) production of families of amphiphilic compounds, consisting of a central Fe^{3+} -binding headgroup that is appended by one of a series of fatty acids and; (ii) the presence of an α -hydroxycarboxylic acid moiety (β -hydroxyaspartic acid or citric acid), which is photoreactive when coordinated to Fe^{3+} (Sandy and Butler, 2009). Siderophores produced by soil bacteria with these characteristics include corrugatin and ornicrogatin from *Pseudomonas* spp. (Matthijs *et al.*, 2008), ornibactins from *Burkholderia* species (Stephan *et al.*, 1993; Agnoli *et al.*, 2006), and rhizobactin 1021, from *Sinorhizobium*

meliloti 1021 (Smith *et al.*, 1985; Nogales *et al.*, 2010). Corrugatin and ornibactins have shorter fatty acid tails (no more than 8 carbons in length) and, in the case of ornibactins, they are attached to the N⁵ of the first ornithine residue while in corrugatin they are attached to the N² amine group. In turn, rhizobactin 1021 is a non-peptide NRPS-independent siderophore. The recently described siderophore cupriachelin produced by *Cupriavidus necator* H16, a bacterium isolated from sludge in a creek, is structurally very similar to serobactins (Kreutzer *et al.*, 2012). Moreover, the genomic context of the cupriachelin biosynthetic genes is conserved in comparison with the *H. seropedicae* SmR1 genome. The two β -hydroxyaspartic acid and the cyclic N⁵ OH-ornithine residues are responsible for iron coordination. These residues are also present in other siderophores such as the pyoverdines and loihichelins (Visca *et al.*, 2007; Homann *et al.*, 2009).

The biological advantages conferred by amphiphilicity and photoreactivity in marine bacteria may be related to diffusion gradients and iron recycling in the water column reached by sunlight (Sandy and Butler, 2009; Vraspir and Butler, 2009; Butler and Theisen, 2010). Amphiphilicity of rhizobactin 1021 produced by *S. meliloti* 1021, as well as other non-siderophore lipopeptides produced by *Pseudomonas* species have been demonstrated to be involved in swarming motility (Berti *et al.*, 2007; Nogales *et al.*, 2010). Natural niches of *H. seropedicae* include rhizosphere and internal tissues of tropical grasses, which are protected from sunlight. However, *H. seropedicae* was found in high numbers in the xylem vessels of leaves of rice, sorghum, maize, and wheat plants (James *et al.*, 1997; Gyaneshwar *et al.*, 2002; Roncato-Maccari *et al.*, 2003) and even on the surface of rice leaves (Gyaneshwar *et al.*, 2002), which is exposed to sunlight, suggesting that serobactin photoreactivity may be important for survival of the bacterium in these niches. Also, the affinity of α -hydroxycarboxylates siderophores for ferric ion under low pHs makes them efficient under these conditions (Miethke and Marahiel, 2007).

During the last decade, in depth studies on NRPSs were undertaken by many groups (Baltz *et al.*, 2005; Challis, 2008; Nikolouli and Mossialos, 2012), due mainly to the interest of discovery, combinatorial synthesis and exploitation of novel and already described non-ribosomal peptides for diverse environmental and pharmaceutical applications. The increase in whole-genome and metagenome sequencing projects, and bioinformatics advances allow the prediction with accuracy of the number and type of building blocks that are incorporated into a final NRPS product, as well as the prediction of modifications from tailoring domains (Winter *et al.*, 2011). This work is another example of the successful application of genomics, bioinformatics and biochemical approaches in NRPS

studies. Structural characterization of NRPS products also gives feedback on *in silico* techniques, in addition to increasing biochemical characterized databases on which prediction approaches are based. As an example, in this work we found that the sixth NRPS condensation domain clustered phylogenetically close to the ^DC_L subtype, but it acts as an ^LC_L, possibly due to the absence of an associated epimerase domain (Rausch *et al.*, 2007).

The relevance of iron uptake systems mediated by siderophores is clearly established for animal pathogens (Miethke and Marahiel, 2007). In phytopathogens the importance is less clear, depending on the host–pathogen system studied (Pandey and Sonti, 2010; Jones and Wildermuth, 2011), while the importance of siderophores in the interaction of bacterial endophytes with its hosts, is largely unknown. The complete genomes of 12 endophytic bacteria and a rice endophyte metagenome show numerous copies of genes coding putative TonB-dependent receptors and iron storage proteins, suggesting that iron acquisition systems have a relevant role in part or all of the life cycle of endophytes (Reinhold-Hurek and Hurek, 2011; Sessitsch *et al.*, 2012).

In this work, we demonstrated the biological importance of serobactins in iron acquisition by *H. seropedicae* Z67, suggesting that the production of the siderophores by this bacterium is an important trait in environments where iron is scarce. Additionally the high number of putative TonB dependent receptors genes present in the *H. seropedicae* genome may suggest that siderophore ‘piracy’ (Traxler *et al.*, 2012) or utilization of other iron nutritional sources, such as hemin or citrate, are also possible strategies used by this bacterium to circumvent iron deficiency.

Experimental procedures

Bacteria and media

Herbaspirillum seropedicae Z67 (ATCC 35892) is a nalidixic acid resistant, wild-type strain. Siderophore production of *H. seropedicae* Z67 can be clearly evaluated as the formation of an orange halo on a blue background using the CAS agar plate method (Schwyn and Neilands, 1987). Strain Hs 4.3 is a derivative mutant of *H. seropedicae* Z67. This mutant was obtained by random mutagenesis performed with the mini-transposon mTn5gusA-O-pgfp as previously described (Rosconi *et al.*, 2006). The Hs 4.3 mutant was selected by screening transconjugants for the absence of an orange halo on CAS plates. Southern analysis of Pvu I-digested genomic DNA using biotinylated mTn5gusA-O-pgfp as a probe was performed in order to confirm a single insertion of the mini-transposon in the genome of the Hs 4.3 mutant.

Strains were grown at 30°C in the TY media (tryptone 5 g l⁻¹, yeast extract 3 g l⁻¹, CaCl₂ 0.1 g l⁻¹) (Beringer, 1974) or in the NfbHP-GG medium for siderophore production. The NfbHP-GG media is a modification of the NfbHP-malate media (Klassen *et al.*, 1997), with the addition of 11 mM glucose, as a carbon source instead of malate, 3 mM

glutamate, 20 mM NH₄Cl and 0.4 mM biotin. Different iron availability conditions were obtained with the addition of 37 µM FeCl₃, the metal-chelators 2,2'-dipyridyl (DP) or ethylenediamine-di-*o*-hydroxyphenylacetic acid (EDDHA) as indicated for each assay. Bioassay experiments were carried out as previously described (Amarelle *et al.*, 2010).

For growth assays, *H. seropedicae* Z67 and Hs 4.3 mutant strain were grown in Cell Star[®], Greiner Bio One 96-well plates, and incubated at 30°C in a Varioskan Flash[®] (Thermo). Growth was monitored by absorbance at 620 nm. Different media were inoculated with cells in late exponential phase previously grown in NfbHP-GG media containing 37 µM FeCl₃ and diluted to an initial cell density of 1 × 10⁵ colony-forming units (cfu) ml⁻¹.

Bioinformatic analyses of NRPS sequences

Substrate specificity of A-domains was determined using the '8 amino acid code' method (Stachelhaus *et al.*, 1999) and transductive support vector machines (TSVMs) (Rausch *et al.*, 2005). Software was obtained from three different web servers (Ansari *et al.*, 2004; Bachmann and Ravel, 2009; Rottig *et al.*, 2011). The amino acid sequence of a NRPS (YP_003775750.1) present in the *H. seropedicae* SmR1 genome (Pedrosa *et al.*, 2011) was used as a query for these bioinformatic analysis.

Phylogenetic analysis of NRPS condensation and epimerase domains was performed as described (Rausch *et al.*, 2007). Briefly, a subsets of at least ten different domains from each subtype (L to L, D to L, Dual, Starter, Epimerase, Heterocyclization) together with the predicted condensation and epimerase domains obtained from the bioinformatic analysis of the YP_003775750.1 amino acid sequence, were used to build a phylogenetic tree using MEGA, Neighbour-joining method (NJ), Jones-Taylor-Thornton (JTT) amino acid substitution matrix and gamma distributed rate variation with four categories. The support values were based on 100-fold bootstrapping.

Siderophore purification

For small-scale purification procedures, *H. seropedicae* Z67 strain was grown at 30°C for 24 h in 50 ml NfbHP-GG medium without added iron. Cells were removed by centrifugation at 10 000 *g* for 10 min and the supernatant was filtered through a 0.45 µm pore filter. The pH of the clear supernatant was adjusted to 3 with 10% TFA and loaded onto a C18 Sep Pak cartridge (Waters) previously equilibrated in 0.01% TFA. The cartridge was washed first with 10 ml of 0.01% TFA and then with 10 ml of a mixture of methanol and 0.01% TFA (20:80). Samples were eluted with 5 ml of methanol : 0.01% TFA (80:20), the eluted fractions were concentrated by vacuum and suspended in 1/10 initial volume of a mixture of methanol : DMSO : H₂O (60:25:15). Siderophores were purified by HPLC after loading 200 µl of the concentrated sample (diluted in an equal volume of 0.1% formic acid) in a C18 Phenomenex Luna analytical HPLC column using 10% of solvent B (0.01% formic acid in acetonitrile) and 90% solvent A (0.01% formic acid in water) for 40 min and then 90% solvent B and 10% solvent A for 7 min. The elution was

monitored at 210 nm and siderophore activity was evaluated by the production of orange halos of 10 µl spots on CAS plates.

For large-scale purification of *H. seropedicae* Z67 siderophore, the wild-type strain was grown in 1 l NfbHP-GG medium at 30°C for 24 h. The supernatant was recovered, filtered and adjusted to pH 3 as described before. The total sample (1 l) was loaded in a 50 ml medium pressure column of C18 reverse phase. The loaded column was washed with 0.01% TFA and methanol : 0.01% TFA (20:80) and the elution was achieved with methanol : 0.01% TFA (80:20). Fractions with siderophore activity were pooled, concentrated by rotary vacuum evaporation and lyophilized. Samples were solubilized in methanol and further purified on a C4 preparative HPLC column. Fractions showing siderophore activity were concentrated using a rotary vacuum evaporator and then lyophilized. Lyophilized samples were suspended in 3 ml of 25% DMSO, loaded on a Sep Pak cartridge and eluted as described above. Finally, samples were concentrated using a rotary vacuum evaporator, lyophilized and stored at 4°C.

For bioassays, supernatants obtained from 50 ml of cultures (1 × 10⁸ cfu ml⁻¹) in stationary phase of *H. seropedicae* Z67 and Hs 4.3 mutant cells grown in NfbHP-GG media without FeCl₃ added were purified by Sep Pak cartridges as described above. Samples were incubated with 300 nM FeCl₃ and diluted half in Tris 10 mM pH 7.5. Free iron was removed by incubation with Chelex 100[®] (Bio-Rad), according to manufacturer's instructions.

Mass spectrometry

The masses and fragmentation patterns of the HPLC-purified compounds were analysed in a 4800 MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (AbiSciex) and in a Micromass Q-TOF2 (Waters Corp.). For MALDI-TOF/TOF analysis, aliquots of the samples were previously mixed with the same volume of a matrix-saturated solution of alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHA) in 50% acetonitrile–0.1% trifluoroacetic acid. The mixture was deposited directly onto the MALDI target and allowed to crystallize at room temperature for at least 1 min before mass analysis. All spectra were acquired by operating the mass spectrometer in the reflector mode with an accelerating voltage of 20 kV, and 250 laser shots per spectrum. External calibration was done by using a peptide standard mixture spotted immediately next to the sample. The purified Fe³⁺-serobactin A complex was directly injected in a ESI-MS Bruker Micromass QTOF2 (Waters Corp) using N₂ as the collision gas and analysed in the negative mode.

To obtain methyl ester derivatives, 1 µl of air-dried samples were incubated for 30 min with 50 µl of a solution of methanol and acetyl chloride (5:1) at room temperature in the dark. Samples were then concentrated to dryness using a vacuum centrifuge, washed twice with methanol and solubilized in 0.5 µl of 0.1% TFA. Derivatives were analysed by MALDI-TOF.

Detection of free amines was carried out by using the Ettan CAF MALDI Sequencing Kit (Amersham) according to the manufacturer's instruction.

For the identification of fatty acids present in serobactin variants, samples were incubated for 3 h with methanolic HCl at 110°C. Fatty acids were extracted with *n*-hexane, dried

over MgSO₄, and analysed using a Varian 4000 GC-MS equipped with a DB-225-MS column (J&W) (Sasaki *et al.*, 2008).

Nuclear-magnetic resonance spectroscopy

Approximately 12 mg of serobactin B was dissolved in 0.6 ml of dimethylsulfoxide-*d*₆ (*d*₆-DMSO, 99.9% Cambridge Isotopes). The 1D ¹H and ¹³C spectra; the homonuclear 2D COSY and TOCSY spectra, and the ¹H–¹³C gHSQC and gHMBC spectra were recorded on a Bruker Avance 400 instrument at room temperature using standard pulse software. The TOCSY spectrum was recorded by using a mixing time of 60 ms. The 1D spectra were acquired with 65 536 data points, whereas 2D spectra were collected using 2048 points in the F2 dimension and 256 increments in the F1 dimension. Chemical shifts of ¹H and ¹³C were referenced to the solvent signals. The spectra were processed using topspin, version 2.0.

Amino acid analysis

Configuration of the amino acids present in serobactins was determined using Marfey's reagent (Bhushan and Bruckner, 2004). Purified serobactin A was hydrolysed with 2M HI or 6M HCl at 100°C for 24 h. Samples were then derivatized with Marfey's reagent (1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alanine amide; 1% w/v in acetone) as described (Martinez *et al.*, 2000; Bhushan and Bruckner, 2004; Homann *et al.*, 2009; Vraspir *et al.*, 2011; Kreutzer *et al.*, 2012) and loaded onto a C4 reverse phase HPLC analytical column. Derivatized serobactins were eluted with a linear gradient of 10% solvent B (acetonitrile) and 90% solvent A (50 mM triethylamine phosphate, pH 3.0) to 40% solvent B and 60% solvent A, for 45 min. Elution was monitored at 340 nm.

Identification of the D- and L-amino acids was accomplished by co-injection of amino acid standards that were derivatized with Marfey's reagent (Sigma-Aldrich).

Photoreactivity of the ferric-serobactin A complex

Purified serobactin A and FeCl₃ were mixed in equimolar quantities (2.4 mM, 3 ml total volume), the pH was adjusted to 9 and complex formation was allowed to proceed overnight at 4°C. The complex was purified by HPLC using a C4 reverse phase column under the aforementioned conditions. Fractions containing the Fe³⁺-serobactin A complex were collected, concentrated via rotary vacuum evaporation, lyophilized and resuspended in 3 ml of double distilled H₂O. The UV-Vis spectrum (300–550 nm) was recorded before and after 3 h of continuous irradiation to UV light with a 200 W mercury arc lamp.

Acknowledgements

This work was partially supported by ANII and PEDECIBA, Uruguay and PROSUL-CNP-q, Brasil, and NSF CHE-1059067 (Alison Butler) grant.

We thank Rosario Durán (UByPA, Institute Pasteur Montevideo, Uruguay) and Luciano Huergo (Departamento de

Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR, Brazil) for MS-MS analyses, Arquimedes Paixão de Santana Filho (Laboratório de Química de Carboidratos, UFPR, Brazil) and Cecilia Callejas (Unidad de Microbiología Molecular, IIBCE, Uruguay) for GC-MS analyses. We also thank M. G. Yates for critical reading of the manuscript.

References

- Agnoli, K., Lowe, C.A., Farmer, K.L., Husnain, S.I., and Thomas, M.S. (2006) The ornibactin biosynthesis and transport genes of *Burkholderia cenocepacia* are regulated by an extracytoplasmic function sigma factor which is a part of the Fur regulon. *J Bacteriol* **188**: 3631–3644.
- Amarelle, V., Koziol, U., Rosconi, F., Noya, F., O'Brian, M.R., and Fabiano, E. (2010) A new small regulatory protein, HmuP, modulates haemin acquisition in *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology* **156**: 1873–1882.
- Andrews, S.C., Robinson, A.K., and Rodriguez-Quinones, F. (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 215–237.
- Ansari, M.Z., Yadav, G., Gokhale, R.S., and Mohanty, D. (2004) NRPS-PKS: a knowledge-based resource for analysis of NRPS/PKS megasynthases. *Nucleic Acids Res* **32**: W405–W413.
- Bachmann, B.O., and Ravel, J. (2009) Chapter 8. Methods for in silico prediction of microbial polyketide and nonribosomal peptide biosynthetic pathways from DNA sequence data. *Methods Enzymol* **458**: 181–217.
- Baldani, J., Baldani, V.L.D., Seldin, L., and Döbereiner, J. (1986) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. Nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *Int J Syst Bacteriol* **36**: 86–93.
- Baltz, R.H., Miao, V., and Wrigley, S.K. (2005) Natural products to drugs: daptomycin and related lipopeptide antibiotics. *Nat Prod Rep* **22**: 717–741.
- Barbeau, K., Rue, E.L., Bruland, K.W., and Butler, A. (2001) Photochemical cycling of iron in the surface ocean mediated by microbial iron(III)-binding ligands. *Nature* **413**: 409–413.
- Beringer, J.E. (1974) R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* **84**: 188–198.
- Berti, A.D., Greve, N.J., Christensen, Q.H., and Thomas, M.G. (2007) Identification of a biosynthetic gene cluster and the six associated lipopeptides involved in swarming motility of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *J Bacteriol* **189**: 6312–6323.
- Bhushan, R., and Bruckner, H. (2004) Marfey's reagent for chiral amino acid analysis: a review. *Amino Acids* **27**: 231–247.
- Butler, A., and Theisen, R.M. (2010) Iron(III)-siderophore coordination chemistry: reactivity of marine siderophores. *Coord Chem Rev* **254**: 288–296.
- Challis, G.L. (2005) A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases. *Chembiochem* **6**: 601–611.
- Challis, G.L. (2008) Mining microbial genomes for new natural products and biosynthetic pathways. *Microbiology* **154**: 1555–1569.
- Chooi, Y.H., and Tang, Y. (2010) Adding the lipo to lipopeptides: do more with less. *Chem Biol* **17**: 791–793.

- Cornelis, P. (2010) Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**: 1637–1645.
- Drake, E.J., and Gulick, A.M. (2011) Structural characterization and high-throughput screening of inhibitors of PvdQ, an NTN hydrolase involved in pyoverdine synthesis. *ACS Chem Biol* **6**: 1277–1286.
- Finn, R.D., Mistry, J., Tate, J., Coghill, P., Heger, A., Pollington, J.E., et al. (2010) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **38**: D211–D222.
- Grunewald, J., and Marahiel, M.A. (2006) Chemoenzymatic and template-directed synthesis of bioactive macrocyclic peptides. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 121–146.
- Gyaneshwar, P., James, E.K., Reddy, P.M., and Ladha, J.K. (2002) *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. *New Phytol* **154**: 131–145.
- Hansen, D.B., Bumpus, S.B., Aron, Z.D., Kelleher, N.L., and Walsh, C.T. (2007) The loading module of mycosubtilin: an adenylation domain with fatty acid selectivity. *J Am Chem Soc* **129**: 6366–6367.
- Homann, V.V., Sandy, M., Tincu, J.A., Templeton, A.S., Tebo, B.M., and Butler, A. (2009) Loihichelins A-F, a suite of amphiphilic siderophores produced by the marine bacterium *Halomonas* LOB-5. *J Nat Prod* **72**: 884–888.
- James, E.K., Olivares, F.L., Baldani, J.I., and Döbereiner, J. (1997) *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue *Sorghum bicolor* L. Moench. *J Exp Bot* **48**: 785–798.
- James, E.K., Gyaneshwar, P., Mathan, N., Barraquio, W.L., Reddy, P.M., Iannetta, P.P., et al. (2002) Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Mol Plant Microbe Interact* **15**: 894–906.
- Jenke-Kodama, H., and Dittmann, E. (2009) Bioinformatic perspectives on NRPS/PKS megasynthases: advances and challenges. *Nat Prod Rep* **26**: 874–883.
- Jones, A.M., and Wildermuth, M.C. (2011) The phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 has three high-affinity iron-scavenging systems functional under iron limitation conditions but dispensable for pathogenesis. *J Bacteriol* **193**: 2767–2775.
- Klassen, G., Pedrosa, F.O., Souza, E.M., Funayama, S., and Rigo, L.U. (1997) Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. *Can J Microbiol* **43**: 887–891.
- Koulman, A., Lee, T.V., Fraser, K., Johnson, L., Arcus, V., Lott, J.S., et al. (2012) Identification of extracellular siderophores and a related peptide from the endophytic fungus *Epichloe festucae* in culture and endophyte-infected *Lolium perenne*. *Phytochemistry* **75**: 128–139.
- Kreutzer, M.F., Kage, H., and Nett, M. (2012) Structure and biosynthetic assembly of cupriachelin, a photoreactive siderophore from the bioplastic producer *Cupriavidus necator* H16. *J Am Chem Soc* **134**: 5415–5422.
- Markowitz, V.M., Chen, I.M., Palaniappan, K., Chu, K., Szeto, E., Grechkin, Y., et al. (2010) The integrated microbial genomes system: an expanding comparative analysis resource. *Nucleic Acids Res* **38**: D382–D390.
- Martinez, J.S., Zhang, G.P., Holt, P.D., Jung, H.T., Carrano, C.J., Haygood, M.G., and Butler, A. (2000) Self-assembling amphiphilic siderophores from marine bacteria. *Science* **287**: 1245–1247.
- Matthijs, S., Budzikiewicz, H., Schafer, M., Wathélet, B., and Cornelis, P. (2008) Ornicorrugatin, a new siderophore from *Pseudomonas fluorescens* AF76. *Z Naturforsch C* **63**: 8–12.
- Miethke, M., and Marahiel, M.A. (2007) Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**: 413–451.
- Nikolouli, K., and Mossialos, D. (2012) Bioactive compounds synthesized by non-ribosomal peptide synthetases and type-I polyketide synthases discovered through genome-mining and metagenomics. *Biotechnol Lett* **34**: 1393–1403.
- Nogales, J., Dominguez-Ferreras, A., Amaya-Gomez, C.V., van Dillewijn, P., Cuellar, V., Sanjuan, J., et al. (2010) Transcriptome profiling of a *Sinorhizobium meliloti* fadD mutant reveals the role of rhizobactin 1021 biosynthesis and regulation genes in the control of swarming. *BMC Genomics* **11**: 157.
- Pandey, A., and Sonti, R.V. (2010) Role of the FeoB protein and siderophore in promoting virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* on rice. *J Bacteriol* **192**: 3187–3203.
- Pedrosa, F.O., Monteiro, R.A., Wassem, R., Cruz, L.M., Ayub, R.A., Colauto, N.B., et al. (2011) Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. *PLoS Genet* **7**: e1002064.
- Rausch, C., Weber, T., Kohlbacher, O., Wohlleben, W., and Huson, D.H. (2005) Specificity prediction of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases (NRPS) using transductive support vector machines (TSVMs). *Nucleic Acids Res* **33**: 5799–5808.
- Rausch, C., Hoof, I., Weber, T., Wohlleben, W., and Huson, D.H. (2007) Phylogenetic analysis of condensation domains in NRPS sheds light on their functional evolution. *BMC Evol Biol* **7**: 78.
- Rees, D.C., and Howard, J.B. (2000) Nitrogenase: standing at the crossroads. *Curr Opin Chem Biol* **4**: 559–566.
- Reinhold-Hurek, B., and Hurek, T. (2011) Living inside plants: bacterial endophytes. *Curr Opin Plant Biol* **14**: 435–443.
- Roepstorff, P., and Fohlman, J. (1984) Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom* **11**: 601.
- Roncato-Maccari, L.D., Ramos, H.J., Pedrosa, F.O., Alquini, Y., Chubatsu, L.S., Yates, M.G., et al. (2003) Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in graminaceous plants. *FEMS Microbiol Ecol* **45**: 39–47.
- Rosconi, F., Souza, E.M., Pedrosa, F.O., Platero, R.A., Gonzalez, C., Gonzalez, M., et al. (2006) Iron depletion affects nitrogenase activity and expression of *nifH* and *nifA* genes in *Herbaspirillum seropedicae*. *FEMS Microbiol Lett* **258**: 214–219.
- Rottig, M., Medema, M.H., Blin, K., Weber, T., Rausch, C., and Kohlbacher, O. (2011) NRPSpredictor2 – a web server for predicting NRPS adenylation domain specificity. *Nucleic Acids Res* **39**: W362–W367.
- Ryan, R.P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D.J., and Dowling, D.N. (2008) Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiol Lett* **278**: 1–9.

- Sandy, M., and Butler, A. (2009) Microbial iron acquisition: marine and terrestrial siderophores. *Chem Rev* **109**: 4580–4595.
- Sasaki, G.L., Souza, L.M., Serrato, R.V., Cipriani, T.R., Gorin, P.A., and Iacomini, M. (2008) Application of acetate derivatives for gas chromatography-mass spectrometry: novel approaches on carbohydrates, lipids and amino acids analysis. *J Chromatogr A* **1208**: 215–222.
- Schalk, I.J., Hannauer, M., and Braud, A. (2011) New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environ Microbiol* **13**: 2844–2854.
- Schwyn, B., and Neilands, J.B. (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* **160**: 47–56.
- Sessitsch, A., Hardoim, P., Doring, J., Weilharther, A., Krause, A., Woyke, T., *et al.* (2012) Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. *Mol Plant Microbe Interact* **25**: 28–36.
- Singh, G.M., Fortin, P.D., Koglin, A., and Walsh, C.T. (2008) beta-Hydroxylation of the aspartyl residue in the phytotoxin syringomycin E: characterization of two candidate hydroxylases AspH and SyrP in *Pseudomonas syringae*. *Biochemistry* **47**: 11310–11320.
- Smith, M.J., Shoolery, J.N., Schwyn, B., Holden, I., and Neilands, J.B. (1985) Rhizobactin, a structurally novel siderophore from *Rhizobium meliloti*. *J Am Chem Soc* **107**: 1739–1743.
- Stachelhaus, T., Mootz, H.D., and Marahiel, M.A. (1999) The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* **6**: 493–505.
- Stephan, H., Freund, S., Beck, W., Jung, G., Meyer, J.M., and Winkelmann, G. (1993) Ornibactins – a new family of siderophores from *Pseudomonas*. *Biometals* **6**: 93–100.
- Strieker, M., Tanovic, A., and Marahiel, M.A. (2010) Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. *Curr Opin Struct Biol* **20**: 234–240.
- Traxler, M.F., Seyedsayamdost, M.R., Clardy, J., and Kolter, R. (2012) Interspecies modulation of bacterial development through iron competition and siderophore piracy. *Mol Microbiol* **86**: 628–644.
- Visca, P., Imperi, F., and Lamont, I.L. (2007) Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol* **15**: 22–30.
- Vraspir, J.M., and Butler, A. (2009) Chemistry of marine ligands and siderophores. *Ann Rev Mar Sci* **1**: 43–63.
- Vraspir, J.M., Holt, P.D., and Butler, A. (2011) Identification of new members within suites of amphiphilic marine siderophores. *Biometals* **24**: 85–92.
- Winter, J.M., Behnken, S., and Hertweck, C. (2011) Genomics-inspired discovery of natural products. *Curr Opin Chem Biol* **15**: 22–31.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Identification of D and L configurations. Reductive and non-reductive hydrolysis refers to HPLC chromatograms of Fig. S7A and B respectively.

Fig. S1. Phylogenetic tree of different subtypes of condensation domains of *H. seropedicae* NRPS (Hsero_2343), including the condensation (C_DOMAIN_1 to 6, Nt to Ct, red boxes) and epimerase (E_DOMAIN_1 and 2, blue boxes). Nomenclature: C Domain Subtype_NCBI accession number.

Fig. S2. HPLC chromatograms obtained from analytical (A) or preparative (B) purifications of *H. seropedicae* Z67 siderophores.

A. HPLC from supernatant of a bacterial culture grown in 50 ml of a low-content iron media.

B. HPLC from supernatant of a bacterial culture grown in 1 l of low-content iron media.

Fig. S3. A. MALDI-TOF analyses of the CAS positive eluent with a retention time of 19.9 min obtained by analytical HPLC (Fig. S2A).

B. MALDI-TOF MS/MS analysis of the 872 m/z peak. The vertical lines through the structure show the mass to charge $[M + Na + H]^+$ for the 'y' fragments (Roepstorff and Fohlman, 1984).

Fig. S4. Methanol:acetyl chloride derivatization of the 872.32 Da metabolite. Mass (A) and tandem mass spectra (B) of the methyl ester derivative of the 872.32 Da metabolite.

Fig. S5. A. $^1\text{H-NMR}$ of 12 mg of serobactin B in 600 μl d_6 -DMSO.

B. $^{13}\text{C-NMR}$ of 12 mg of serobactin B in 600 μl d_6 -DMSO.

C. HSQC of 12 mg of serobactin B in 600 μl d_6 -DMSO.

Fig. S6. Identification of the first residue of serobactin B as dodecanoic acid.

A. GC chromatogram of derivatized fatty acids present in a hydrolysed serobactin B sample.

B. MS-MS spectra of the peak of retention time 5 min 18 s, marked with a red circle in the chromatogram.

Fig. S7. Identification of D and L configurations in the residues of Serobactin.

A. HPLC chromatogram of serobactin A hydrolysed with 2M HI and derivatized with Marfey's reagent.

B. Similar to A, but the hydrolysis was performed with 6M HCl. Identification of peaks is shown in Table S1.

Fig. S8. Photoreactivity of the Fe^{3+} -serobactin complex.

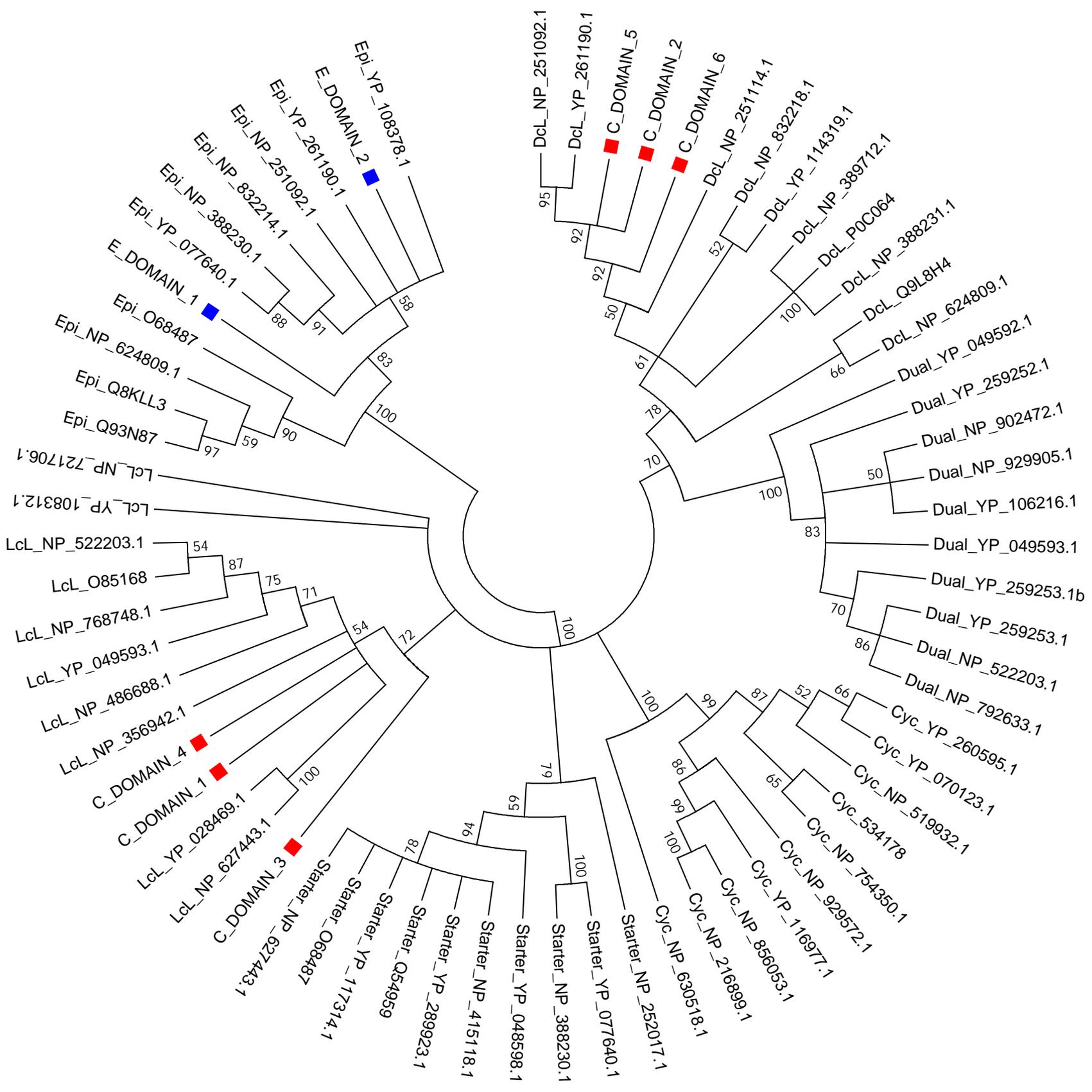
A. HPLC chromatogram of Fe^{3+} -serobactin A complex.

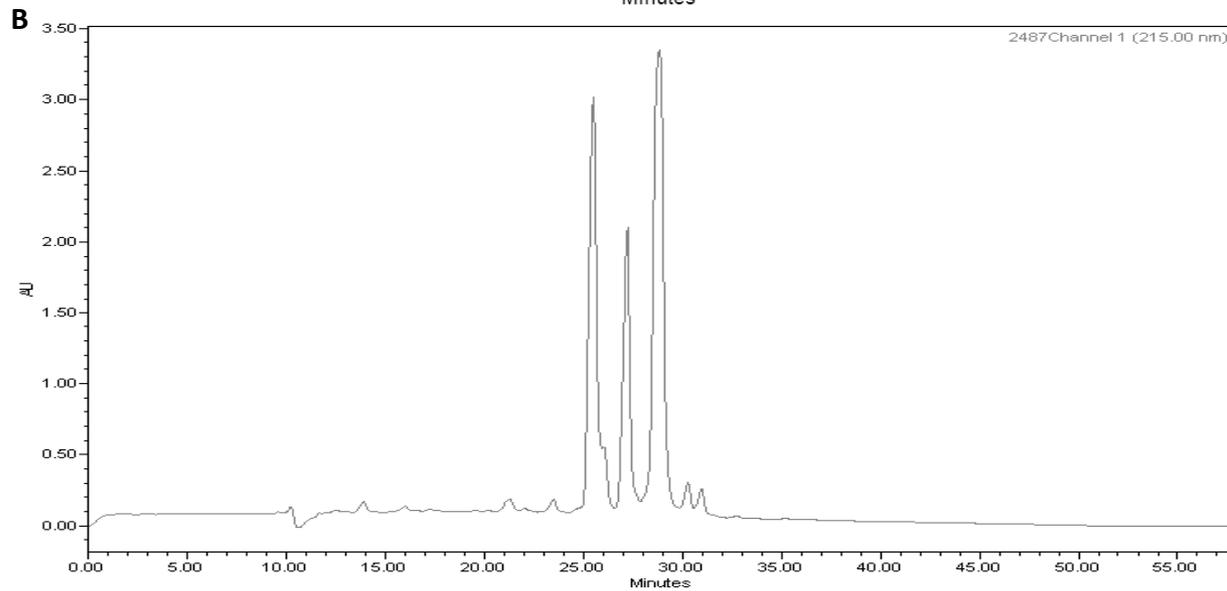
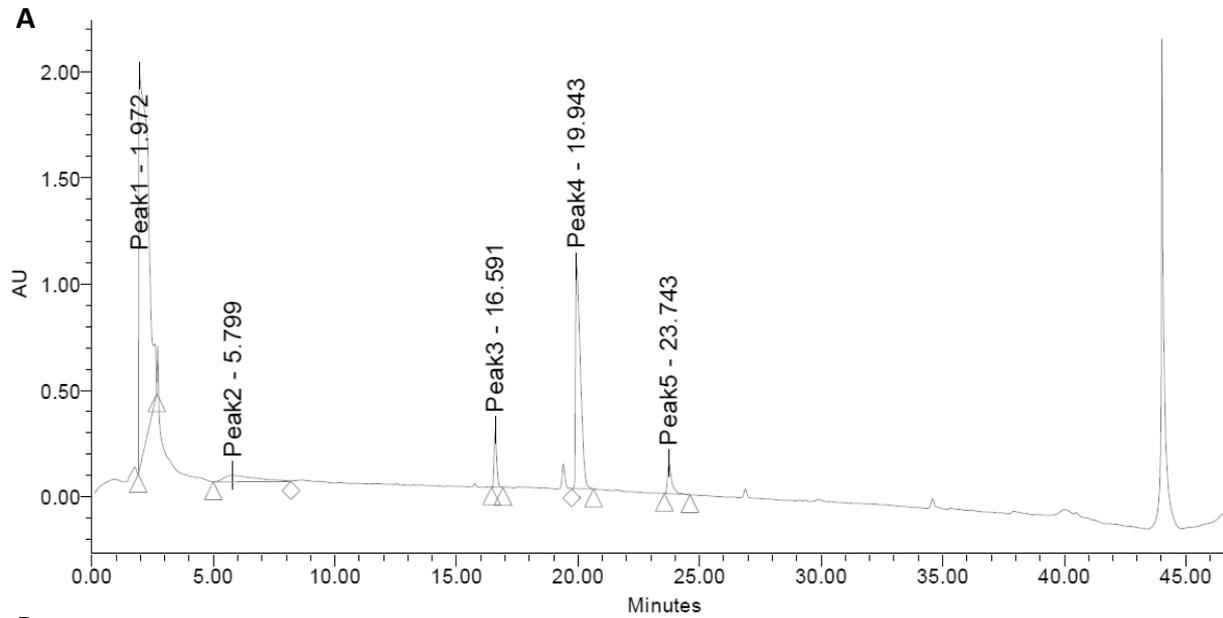
B. ESI-MS in negative mode of the purified Fe^{3+} -serobactin A complex.

C. UV-Vis spectra of Fe^{3+} -serobactin A before (filled line) and after 3 h of continuous irradiation with a 200 W mercury arc lamp (dot line).

Table S1. Identification of D and L configurations. Reductive and non-reductive hydrolysis refers to HPLC chromatograms of Figs. S7A and B respectively.

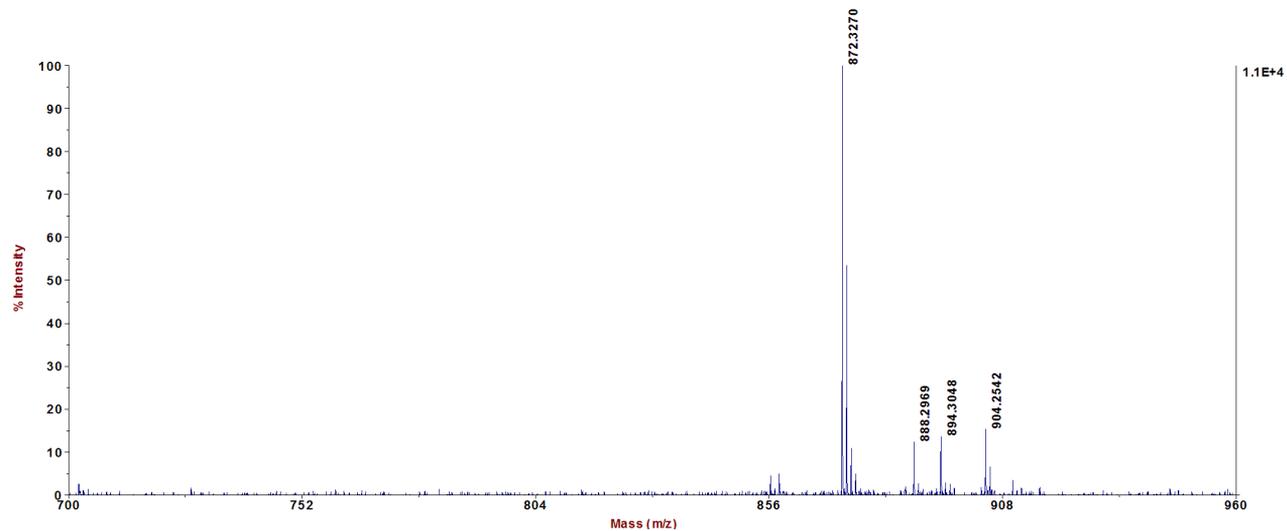
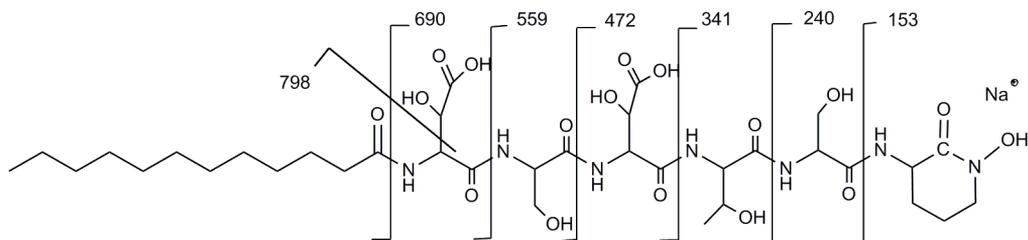
Reductive hydrolysis	
Retention Time (min)	Residue
18.9	D- <i>threo</i> - β -hydroxyaspartic acid
19.3	L- <i>threo</i> - β -hydroxyaspartic acid + L-ornithine (N ² derivatized)
22.7	L-ornithine (N ⁵ derivatized)
24.8	L-serine
31.4	D-threonine
36.4	Marfey's reagent
45.5	Double derivatized L-ornithine
Non-reductive hydrolysis	
21.8	D- <i>threo</i> - β -hydroxyaspartic acid
23.3	L- <i>threo</i> - β -hydroxyaspartic acid
37.5	Marfey's reagent



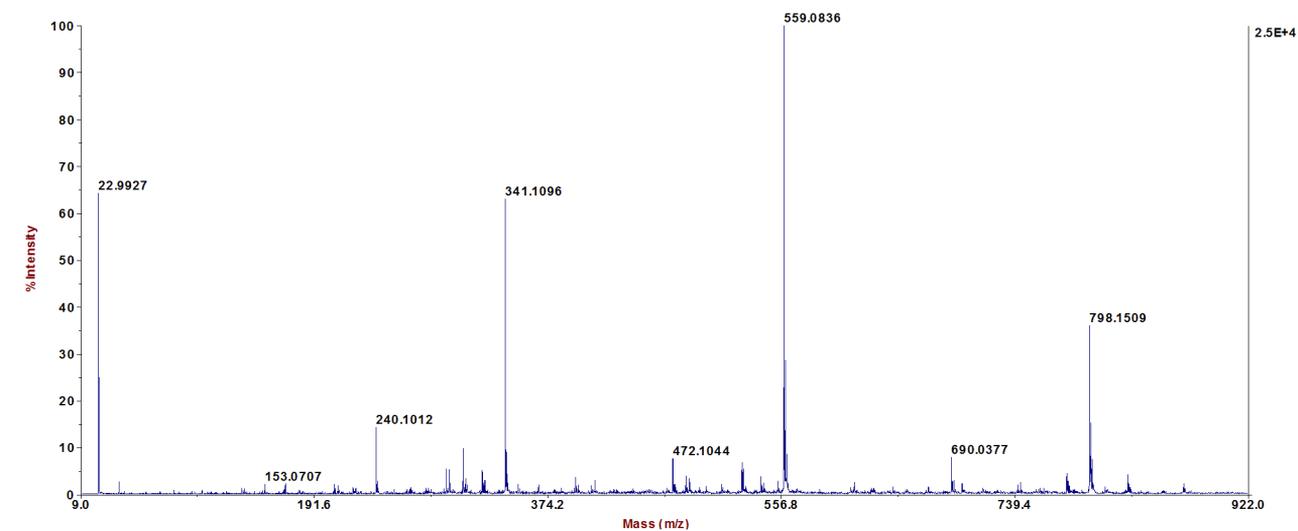


A

4700 Reflector Spec #1[BP = 872.3, 11027]

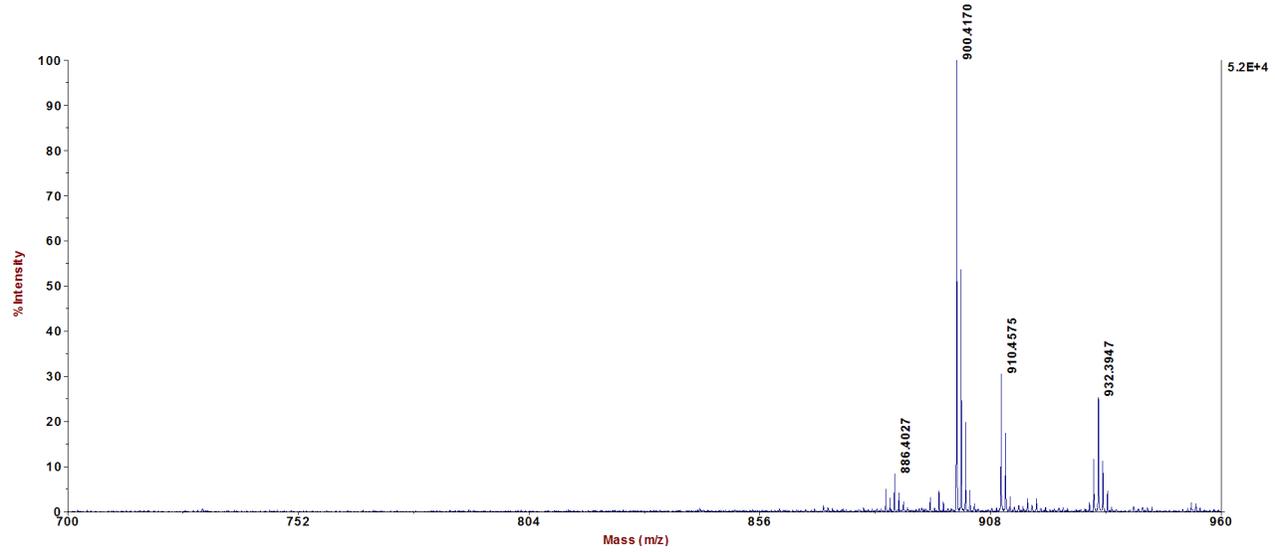
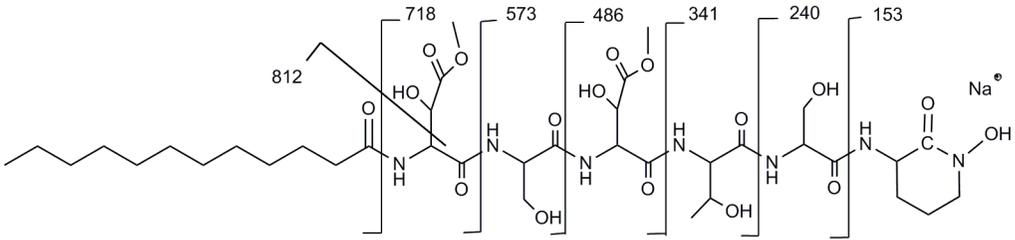
**B**

4700 MSMS Precursor 872.32 Spec #1[BP = 559.1, 25446]

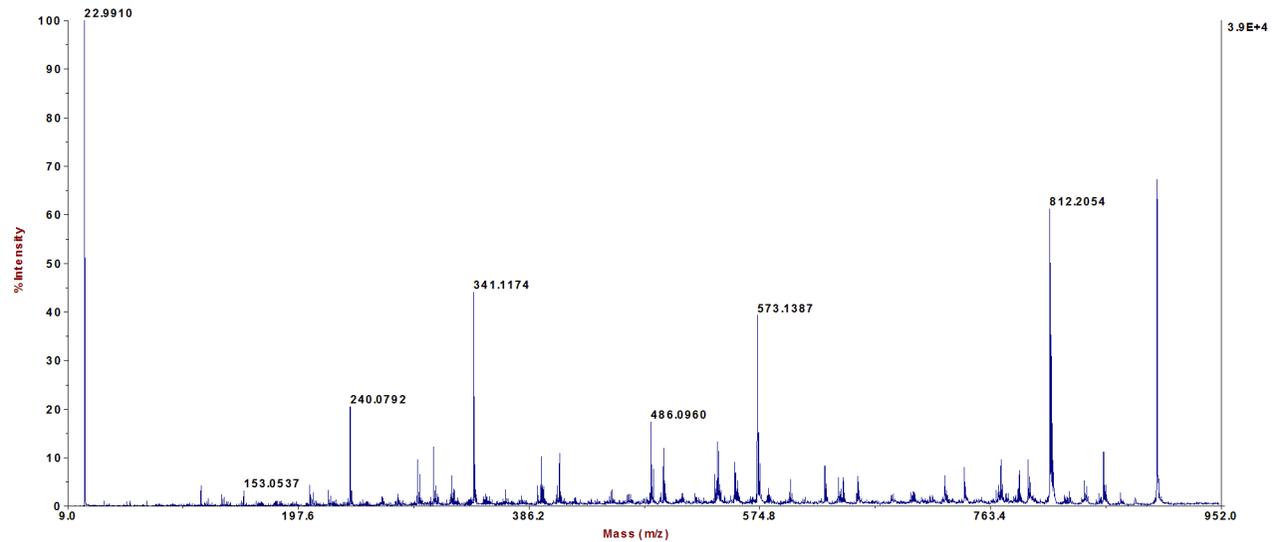


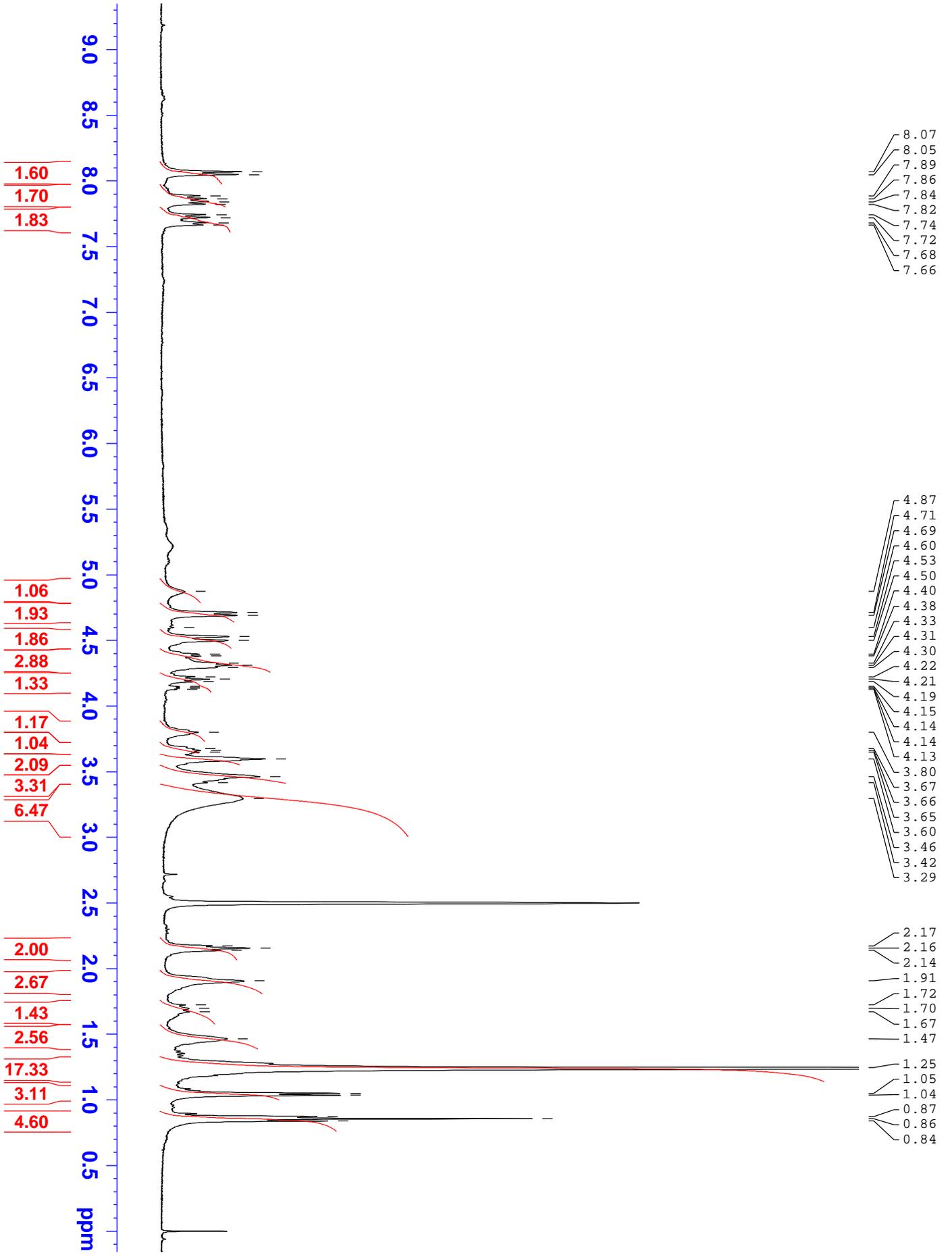
A

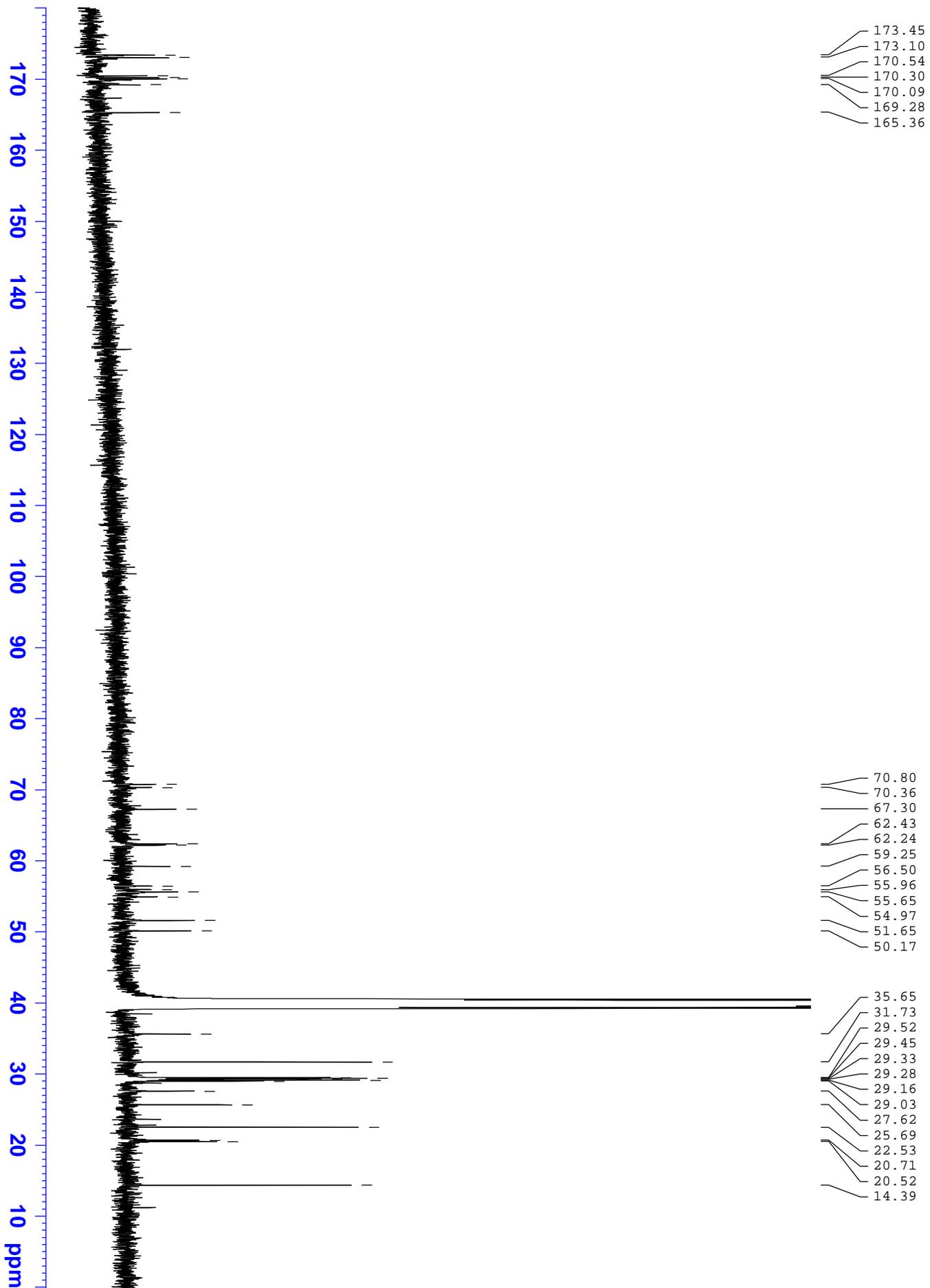
4700 Reflector Spec #1[B P = 900.4, 52196]

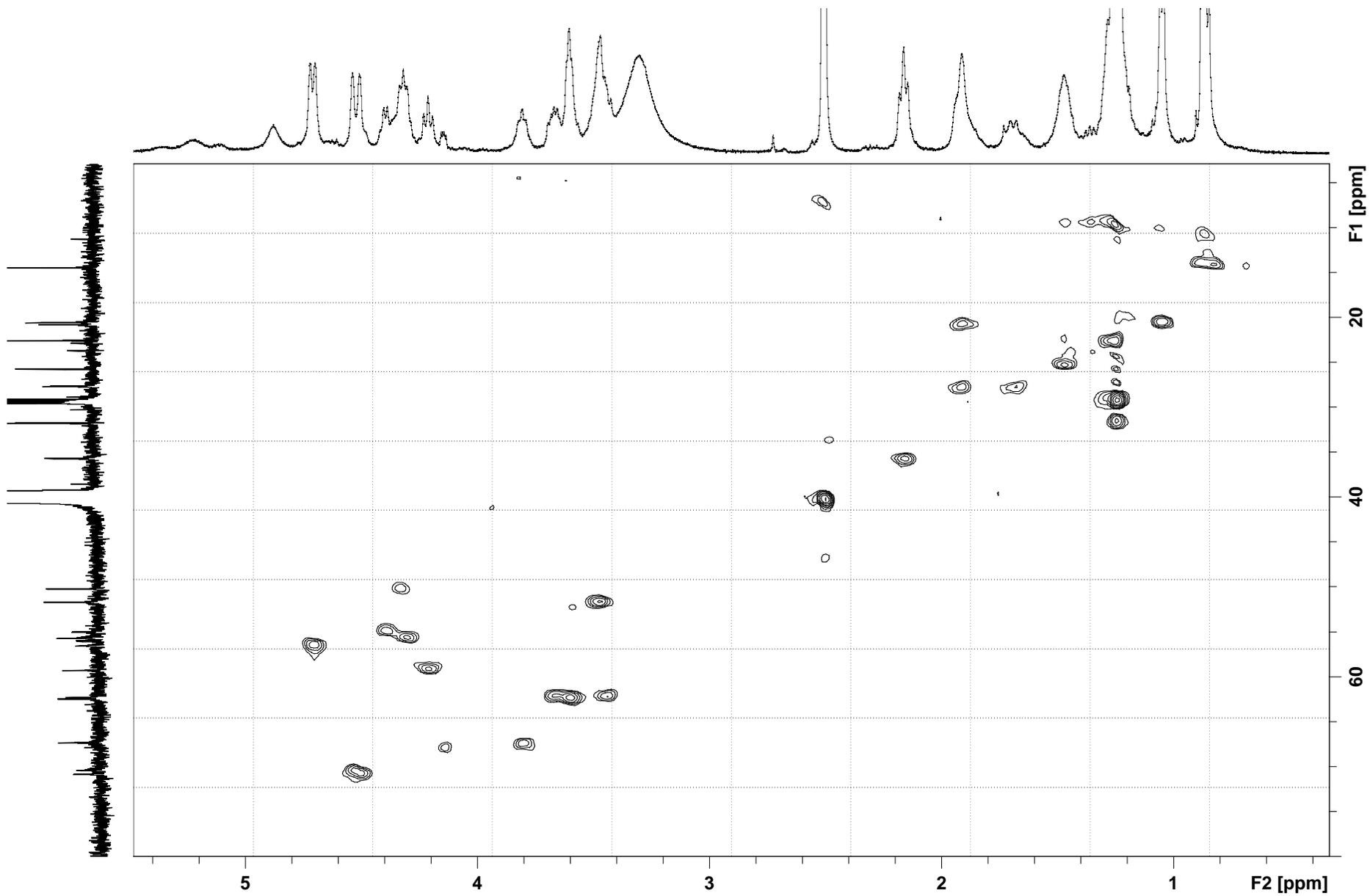
**B**

4700 MS/MS Precursor 900.35 Spec #1[B P = 23.0, 38525]

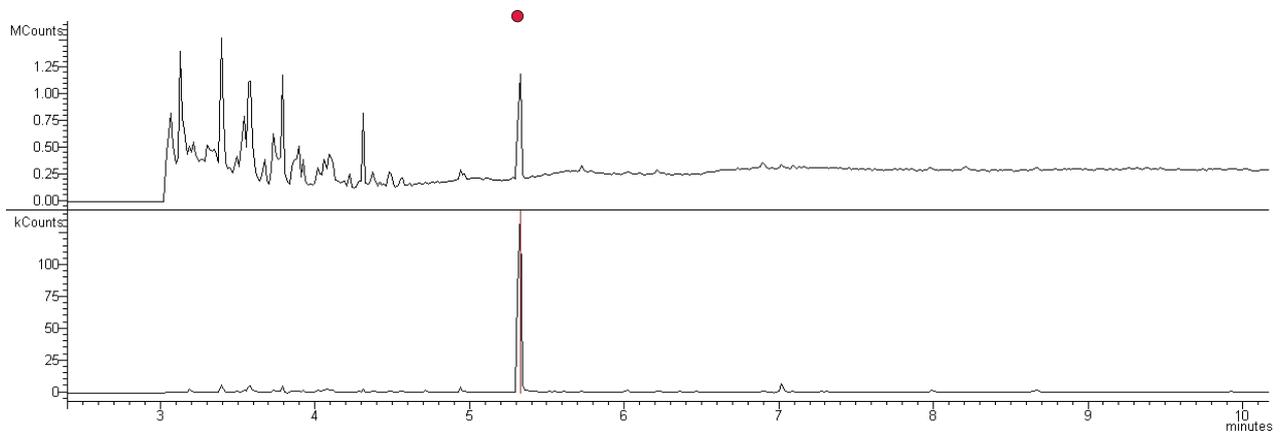




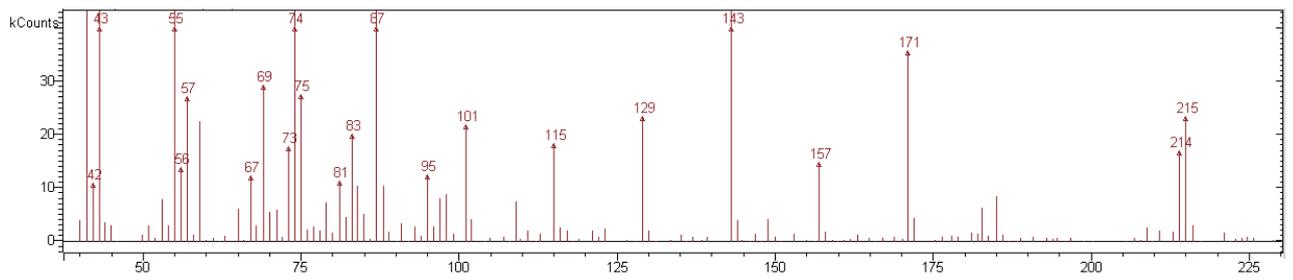




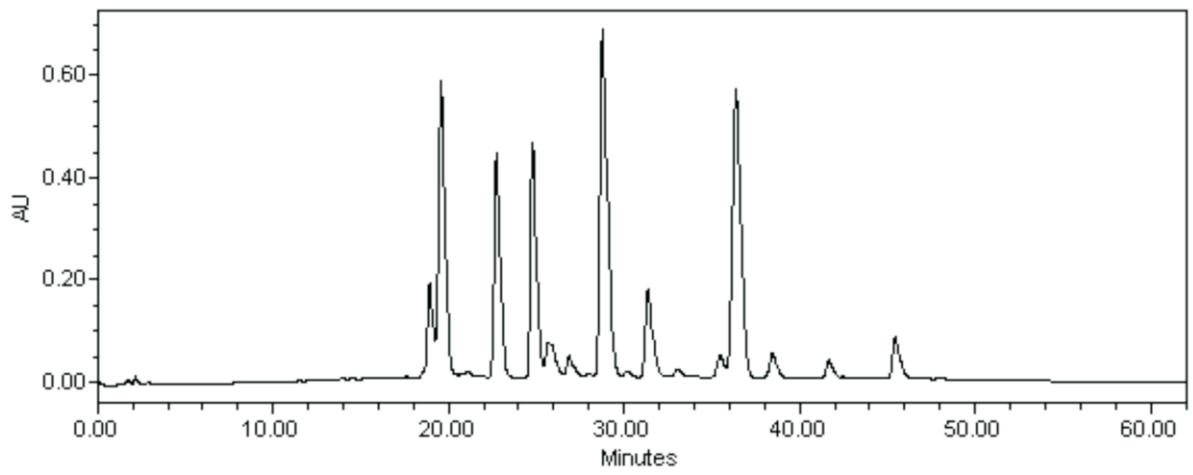
A



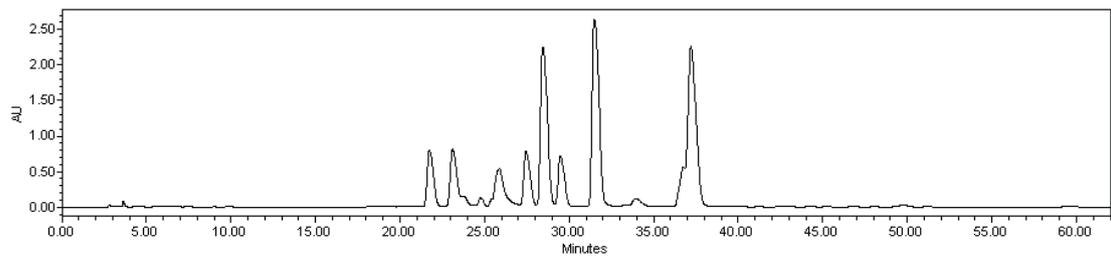
B

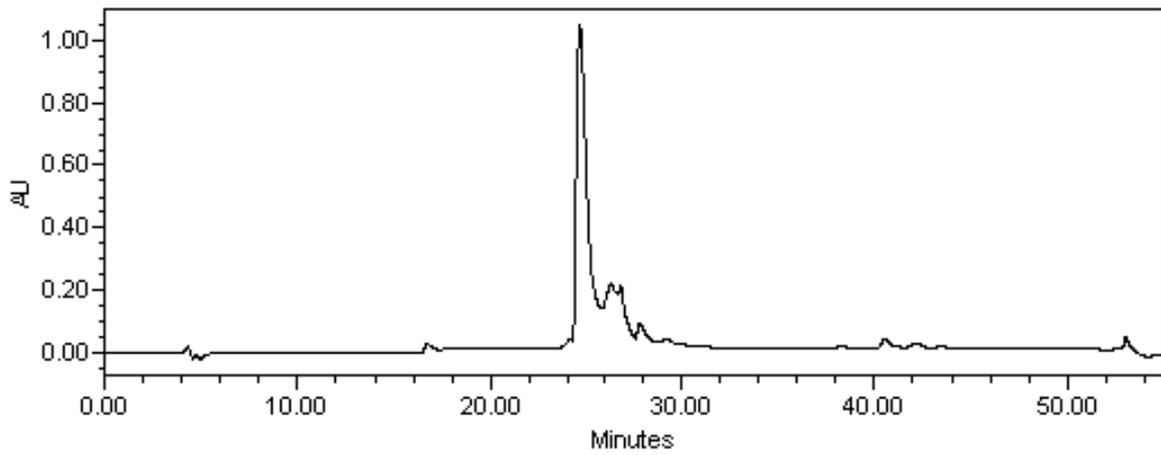
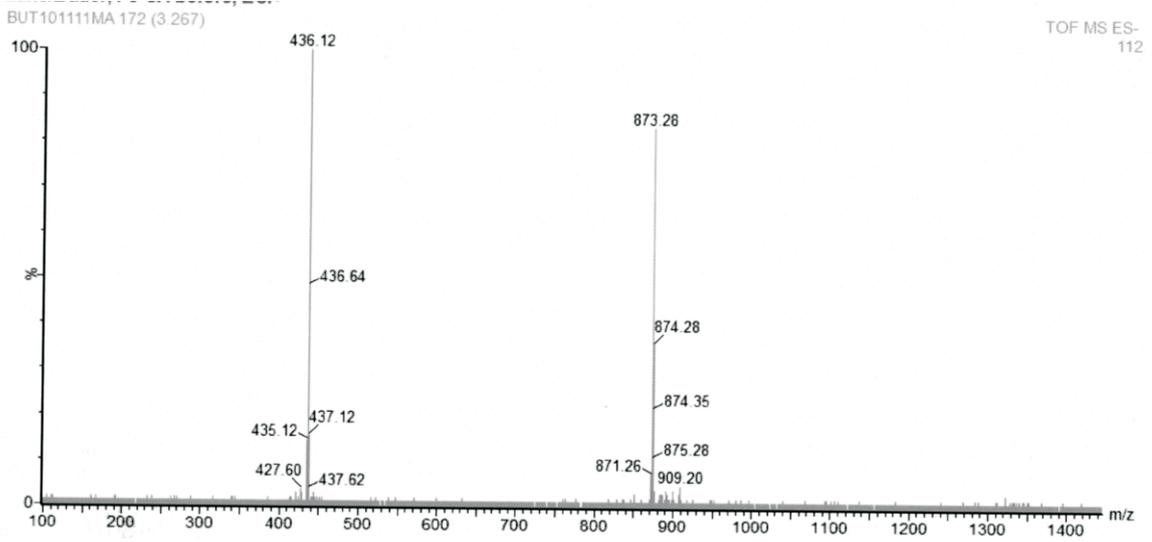
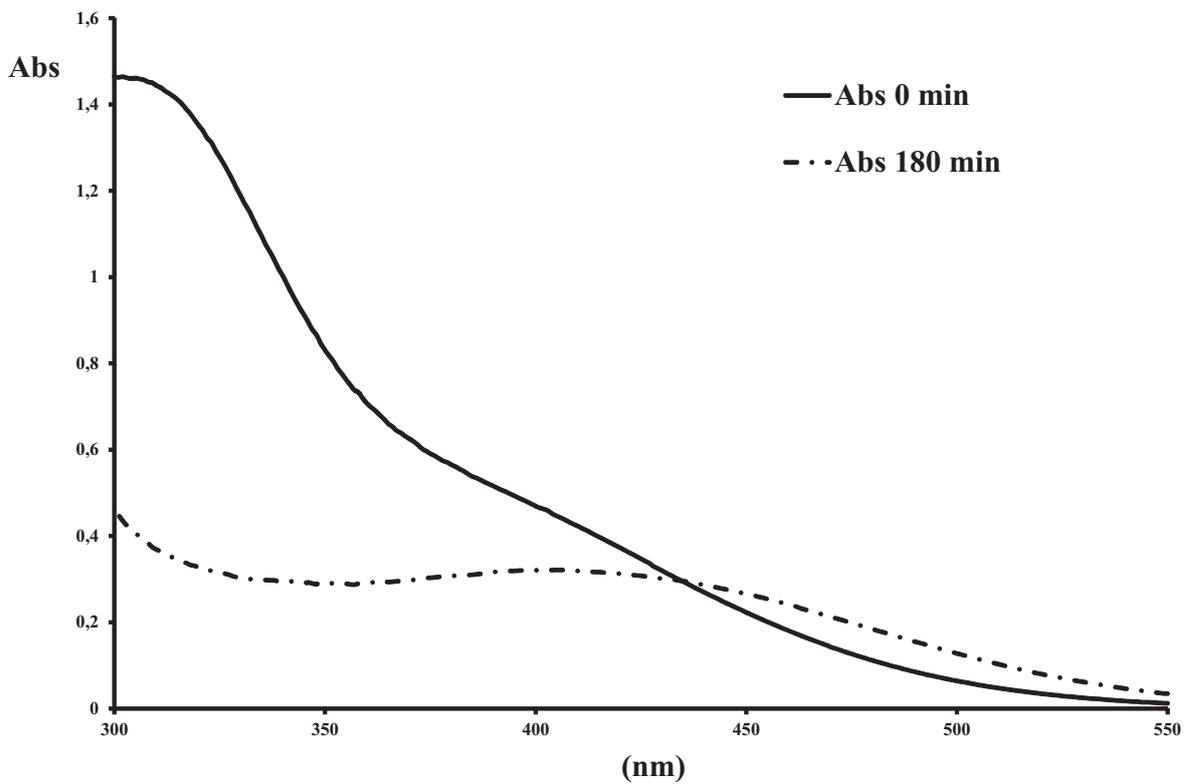


A



B



A**B****C**

CAPÍTULO 5: BÚSQUEDA Y ANÁLISIS DE SISTEMAS DE TRANSPORTE DE SEROBACTINAS Y REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE SEROBACTINAS Y SU SISTEMA DE TRANSPORTE

Resumen

Mediante análisis *in silico* del genoma de *H. seropedicae* SmR1 se encontraron dos ORFs homólogos a receptores de membrana externa de sideróforos cercanos al gen Hsero_2343 responsable de la biosíntesis de las serobactinas. Estos ORFs, anotados como *cirA* y *fhuA* en el genoma de *H. seropedicae* SmR1, tienen un 63% de identidad entre ellos. La secuencia aminoacídica deducida para el producto del gen *cirA* presenta dominios característicos de transductores TonB-dependientes, mientras que la secuencia aminoacídica predicha del producto del gen *fhuA* indicaría que es un transportador TonB-dependiente convencional. Corriente abajo del gen *cirA* se encuentra un ORF anotado como *pfri*, homólogo al factor σ ECF *pvdS* de *P. aeruginosa*, involucrado en la regulación de la producción de los sideróforos pioverdinas. En el trabajo presentado en este capítulo, se construyeron mutantes carentes de estos genes y se analizó su fenotipo.

Los resultados obtenidos sugieren que el receptor de las serobactinas está codificado por el gen *fhuA*, que la expresión de los genes de biosíntesis de sideróforos está regulada por el producto del gen *pfri*, y que la proteína codificada por el gen *cirA* actúa como un transductor de señal pero no como un transportador.

Introducción

Las bacterias se adaptan rápidamente a las variaciones que ocurren en el entorno cambiante en el que viven alterando la expresión de proteínas de su superficie celular como forma de sobrellevar estos cambios [26]. La disponibilidad y fuente nutricional de hierro presente en el ambiente es una de estas variaciones, y la expresión de receptores TonB-dependientes con diferentes especificidades de sustrato, una de las respuestas de las bacterias Gram- a dicha variación. La expresión de los receptores es, en la mayoría de los casos, regulada a nivel transcripcional de una manera tal que un receptor dado sea sólo expresado si la fuente de hierro que reconoce específicamente está disponible en el ambiente [116].

Transportadores y transductores TonB-dependientes

En el mecanismo de regulación más común presente en bacterias, el propio receptor TonB-dependiente funciona como un transductor de señal transmembrana. Estos receptores se producen normalmente en pequeñas cantidades y su expresión se induce al máximo sólo en presencia de la fuente de hierro específica. Esta subclase de receptores, implicados tanto en el transporte de fuentes de hierro como en la transducción de señales, han sido llamados transductores TonB-dependientes, para diferenciarlos de los receptores TonB-dependientes convencionales únicamente implicados en el transporte [105].

El paradigma del mecanismo de acción de un transductor TonB-dependiente es el de FecA, receptor específico para dicitrato férrico en *E. coli* K12 [25]. La unión de dicitrato férrico a una de las pocas moléculas del receptor constitutivamente expresadas conduce a la activación transcripcional del gen *fecA*. Esta transducción de la señal desde el exterior celular al citoplasma se da a través de los productos de dos genes próximos a *fecA*, los genes *fecI* y *fecR*. El gen *fecI* codifica un factor σ de la familia de los ECF (E_xtracytoplasmic F_unction). El otro gen, *fecR*, codifica una proteína ubicada en la membrana citoplasmática y es el fundador de la subfamilia de factores anti- σ [105]. La proteína FecA actúa como receptor y como transmisor de señales a través de la membrana externa. La proteína FecR actúa como un receptor de una señal del periplasma y la consiguiente transmisión de la señal a través de la membrana citoplasmática hacia el citoplasma, donde libera al factor σ FecI en su forma activa el cual se une a la ARN polimerasa e inicia específicamente la transcripción del operón de los genes de transporte *fecABCDE*. En *E. coli* la transcripción de los genes reguladores *fecIR* es reprimida por hierro a través de la acción del complejo Fe^{2+} -Fur. Bajo condiciones limitantes de hierro, los genes *fecIR* son transcritos, y las proteínas producidas FecI y FecR detectan y responden a la presencia de citrato férrico en el medio mediante FecA [25]. Existe una amplia evidencia apoyando la teoría que la proteína TonB no sólo es necesaria para el transporte de citrato férrico hacia el periplasma, sino que también es necesaria para la señalización mediada por las proteínas FecAIR [26]. En la figura 1 se muestra un esquema de la transducción de señales mediada por FecAIR.

Los transductores TonB-dependientes pueden reconocerse por la presencia de copias de genes homólogos a los genes *fecIR* contiguos al gen codificante para el posible transductor o por la presencia de dominios característicos en su secuencia aminoacídica deducida [25, 26, 115, 116]. Además de presentar los dominios característicos correspondientes al barril β , al corcho y a la caja TonB, los transductores poseen una típica extensión N-terminal de aproximadamente 70 a 80 aminoácidos ausente en los receptores TonB-dependientes convencionales (Pfam 07660) [52,

105]. Esta extensión es responsable de la transferencia de la señal pero no tiene efecto sobre la unión y el transporte del sustrato. Por lo tanto, este dominio se cree interactúa con el factor anti-sigma [116]. Otra característica peculiar de los transductores TonB-dependientes es que muchos de ellos contienen secuencias de señal N-terminales largas e inusuales. La función sugerida para estas secuencias es lograr un pasaje lento a través del sistema de secreción Sec-dependiente para lograr el correcto plegado de la proteína en la membrana [115].

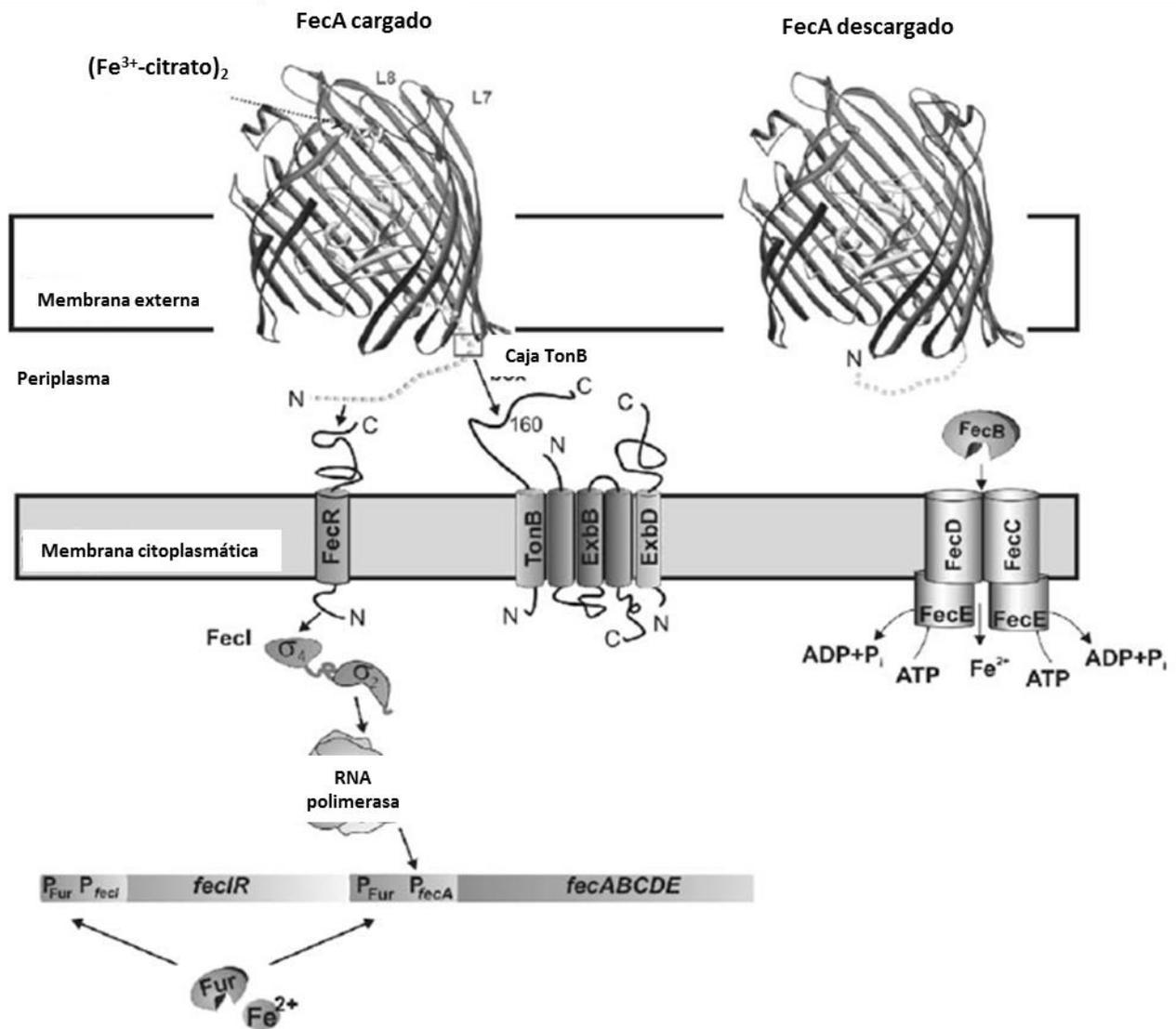


Figura 1: El transporte de citrato férrico en *E. coli* y su sistema de regulación. Se muestra la vía de señalización de FecA a FecI a través de FecR, la participación de TonB, ExbB y ExbD en la señalización y el transporte, y el transporte de hierro a través de la proteína periplásmica FecB y los transportadores ABC FecCDE. El complejo Fur-Fe²⁺ reprime la expresión de *fecIR* y de *fecABCDE* ocupando sus promotores y se disocia de los mismos en condiciones de poco hierro. Adaptado de Braun y col. [25].

Factores sigma de función extracelular

El uso de diferentes factores σ que reconocen secuencias de promotores diferentes es un mecanismo utilizado por las bacterias para redirigir la transcripción de genes. Los factores σ se clasifican en dos familias no relacionados estructuralmente: σ^{70} y σ^{54} . En todas las bacterias, el factor responsable de la síntesis de ARN de genes constitutivos pertenece a la familia σ^{70} . Esta familia se ha dividido en cuatro grupos filogenéticos según la estructura y función del gen. El grupo más grande y más divergente, presente en Gram- como Gram+, es el de la subfamilia de factores σ ECF (ExtracYtoplasmic Function) [100, 116, 143].

La función de los factores ECF se asocia principalmente con la adaptación a diferentes condiciones extracelulares. Diferentes factores regulan la respuesta al estrés periplásmico, al shock térmico, los sistemas de eflujo de iones metálicos, la secreción de alginato, la síntesis de carotenoides y el transporte de hierro [149]. La mayoría de estos factores autorregulan su propia expresión y son controlados por un factor anti- σ , una proteína de membrana citoplásmica a menudo codificada en el mismo operón que el factor σ en sí. La actividad o liberación del factor σ es inducida por la inhibición de la actividad del factor anti- σ por uno de varios mecanismos: la degradación del factor anti- σ , un cambio conformacional del mismo, o la fosforilación de otro factor anti-anti- σ [87]. Por lo general, estos factores controlan un regulón relativamente pequeño [16].

El primer factor ECF identificado fue σ^E de *E. coli*, que responde al shock térmico en este organismo. Los factores ECF PvdS de *Pseudomonas* spp y OrbS de *Burkholderia* spp están implicados en la regulación de los sistemas de captación de hierro en estos grupos de bacterias y serán descritos en las siguientes secciones [2, 113].

Transporte y regulación de las pioverdinas en *Pseudomonas* spp.

Las pioverdinas (PVDs) son sideróforos verde-fluorescentes NRP-Sintetasa dependientes que representan el sistema de captación de hierro primario del género *Pseudomonas*, aunque algunas especies también pueden sintetizar sideróforos adicionales tales como la pioquelina, quinolobactina o pueden adquirir el hierro unido a una variedad de quelantes exógenos, incluyendo muchos sideróforos heterólogos [200]. A la fecha, más de 60 PVDs de diferentes cepas y especies de *Pseudomonas* han sido caracterizadas químicamente. Todos estos sideróforos se componen de tres partes: un cromóforo responsable de su fluorescencia, un péptido específico de cada cepa que comprende de 6 a 12 aminoácidos cuya secuencia es específica a cada especie, y una cadena lateral unidos al átomo de nitrógeno en la posición C-3 del cromóforo. En la mayoría de los casos, esta cadena lateral es un ácido del ciclo de Krebs, tal como ácido succínico, málico o

α -cetoglutarico o alguno de sus derivados amídicos. La cadena peptídica y la cadena lateral están conectadas al grupo carboxilo y al grupo NH_2 del cromóforo, respectivamente (Fig. 2). La secuencia peptídica difiere sustancialmente entre las especies e incluso entre cepas de la misma especie. Por ejemplo, *P. aeruginosa* produce tres tipos distintos que difieren en la cadena peptídica: PVDI, PVDII y PVDIII [169, 200]. La unión al hierro por parte de este tipo de sideróforos se da a través del grupo catecol presente en el cromóforo y de grupos hidroxamato y/o α -hidroxiácidos de aminoácidos modificados presentes en la cadena peptídica del compuesto [155].

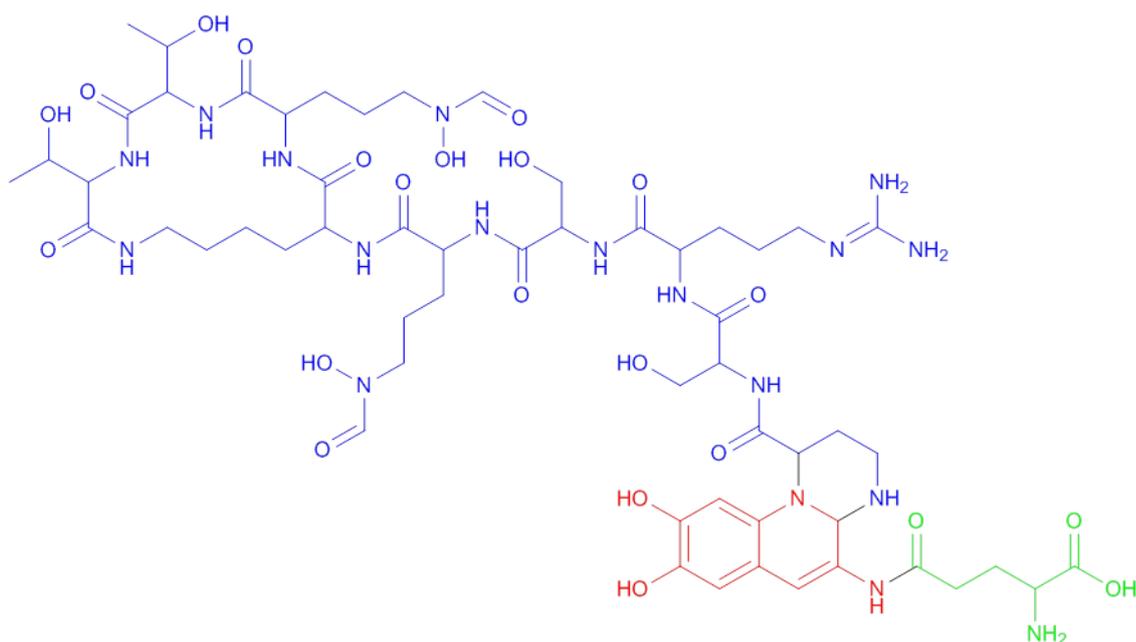
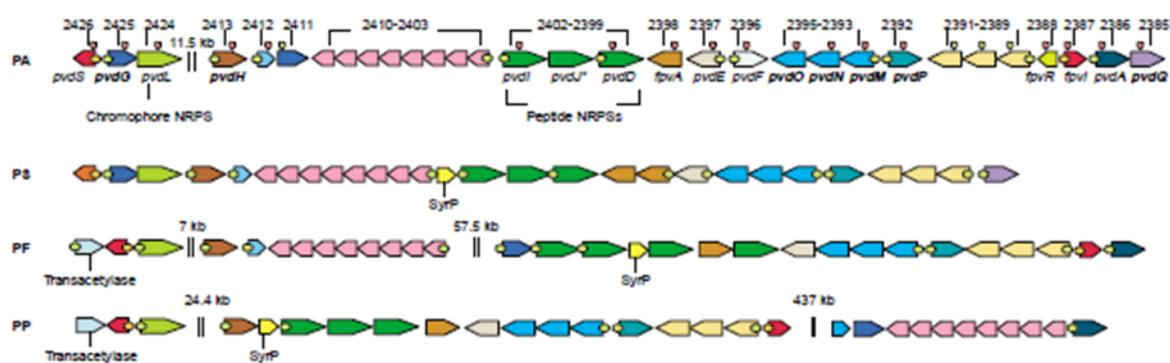


Figura 2: Estructura del sideróforo PVD I producido por *P. aeruginosa*. Se representa en rojo el cromóforo, en azul la cadena peptídica y en verde la cadena lateral.

Al menos 12 enzimas están involucradas en la biosíntesis de las PVDs incluyendo las NRP-Sintetasas. Los genes involucrados en la biosíntesis, transporte y regulación de las PVDs forman un único clúster en *P. syringae*, dos en *P. aeruginosa* PAO1 y tres en *P. putida*, separados dos de ellos por 437 kb (Fig. 3) [155]. La síntesis de las PVDs comienza en el citoplasma con el precursor no fluorescente ferribactina, el cual es exportado al periplasma a través del exportador ABC PvdE. Los pasos finales en la maduración de las PVDs se dan en el periplasma y el producto es secretado al medio extracelular mediante acción de la bomba de eflujo tripartita PvdTR y OpmQ. El complejo Fe^{3+} -PVD es internalizado al periplasma por el receptor TonB-dependiente FpvA, dónde el metal es liberado por reducción y la PVD es nuevamente exportada al medio extracelular por acción de PvdTR, OpmQ. Por lo tanto el Fe^{2+} y no el complejo es internalizado al citoplasma [42, 168, 169].



Locus Tag	Gen	Producto
PA2426	<i>pvdS</i>	Factor ECF
PA2425	<i>pvdG</i>	Tioesterasa
PA2424	<i>pvdL</i>	NRP-Sintetasa (cromóforo)
PA2413	<i>pvdH</i>	Aminotransferasa
PA2412		MbtH
PA2411		Tioesterasa
PA2410-03		Proteínas de membrana
PA2402-399	<i>pvdIJD</i>	NRP-Sintetasas
PA2398	<i>fvpA</i>	Receptor TonB-dependiente
PA2397	<i>pvdE</i>	Exportador del tipo ABC
PA2396	<i>pvdF</i>	N ⁵ -hidroxiornitina formiltransferasa
PA2395-93	<i>pvdONM</i>	Proteínas periplásmicas
PA2392	<i>pvdP</i>	Proteína con señal TAT
PA2391-89	<i>pvdRT ompQ</i>	Sistema tripartita de eflujo
PA2388	<i>fvpR</i>	Factor anti-σ
PA2387	<i>fvpI</i>	Factor ECF
PA2386	<i>pvdA</i>	L-ornitina hidroxilasa
PA2385	<i>pvdQ</i>	Acilasa

Figura 3: Organización de los genes involucrados en la biosíntesis, transporte y regulación de las PVDs en *Pseudomonas*. PA: *P. aeruginosa*, PS: *P. syringae*, PF: *P. fluorescens* y PP: *P. putida*. Los genes homólogos se muestran en el mismo color. Genes regulados por el factor ECF PvdS están precedidos por un punto verde, que representa la secuencia de reconocimiento consenso (TAAAT-N16-CGT), mientras que los genes regulados por Fur están precedidos por un punto naranja. Los polígonos de color rojo y verde por encima de los genes corresponden a mutaciones que resultan en un fenotipo de no producción de PVDs o neutras respectivamente. Los genes no están representados en función de su tamaño. Las líneas verticales dobles representan ADN intermedio, la longitud del cual se indica en kb. Adaptado de Ravel y Cornelis [157].

En *P. aeruginosa* PAO1, la expresión de los genes de biosíntesis y transporte de PVDs incluye al regulador global Fur, el transductor TonB-dependiente FpvA, los factores ECF PvdS y Fpvl, y el factor anti- σ FpvR [149, 155]. La proteína Fur reprime la expresión los genes *pvdS* y *fpvl*. Cuando la disponibilidad de hierro se vuelve limitante, PvdS y Fpvl son producidos pero quedan retenidos e inactivados en la membrana interna en complejo con FpvR. El receptor FpvA es un transductor TonB-dependiente. La disponibilidad de estructuras cristalográficas en estados diferentes, y estudios funcionales en mutantes puntuales han permitido un conocimiento detallado del transporte de PVDs a través de FpvA y de la transducción de señal al citoplasma realizado por el mismo [167]. El reconocimiento del complejo Fe^{3+} -PVD por parte de FpvA activa la transducción de señales a través de FpvR y ambos factores ECF son liberados en el citoplasma. Fpvl activa la transcripción de *fpvA* mientras que PvdS activa la transcripción de los genes de que codifican para los genes de biosíntesis de PVDs. A su vez, PvdS activa genes no relacionados con la adquisición de hierro pero sí con la patogenicidad de *P. aeruginosa*, como el gen *prpL* y la exotoxina A [43, 149]. El factor PvdS reconoce una secuencia específica (TAAAT-N16/17-CGT) conocida como secuencia IS (Iron Starvation) [192, 193, 207]. Curiosamente, *P. syringae* no posee copias de *fpvl*, sin embargo una secuencia IS canónica está presente en el promotor del gen *fpvA*, lo que sugiere que este gen podría estar regulado por PvdS [155]. En la figura 4 se muestra un esquema del transporte y la regulación de la producción de pioverdinas en *P. aeruginosa*.

Transporte y regulación de las ornibactinas en *Burkholderia* spp.

Las ornibactinas son sideróforos lipopeptídicos NRP-Sintetasa dependientes producidos por casi todas las especies del complejo *Burkholderia cepacia* [192]. La cadena peptídica está formada por cuatro residuos: L-ornitina, D-hidroxiaspartato, L-serina y L-ornitina (Fig. 5). La primera L-ornitina posee el N⁵ hidroxilado y acilado por un β -hidroxiácido de 4, 6 u 8 carbonos, lo cual diferencia a la ornibactina B, D y F respectivamente. La cuarta L-ornitina posee el N⁵ hidroxilado y formilado, y un residuo de putrescina en el grupo α -carboxilo [2]. Las dos ornitinas hidroxiladas y aciladas o formiladas, junto al aspartato hidroxilado forman los tres grupos bidentados de unión a hierro.

El genoma de la cepa *B. cenocepacia* J2315 presenta 15 genes presumiblemente involucrados en la biosíntesis, regulación y transporte de las ornibactinas agrupados en un único clúster (Fig. 6). La cadena peptídica es sintetizada por la acción de las NRPSs OrbI y OrbJ. La proteína OrbE, homóloga a PvdE, podría estar involucrada en la exportación de las ornibactinas al periplasma. La proteína OrbA es el receptor específico del complejo Fe^{3+} -ornibactina. Este receptor no posee el dominio N-terminal de los transductores TonB-dependientes, por lo que actuaría únicamente como

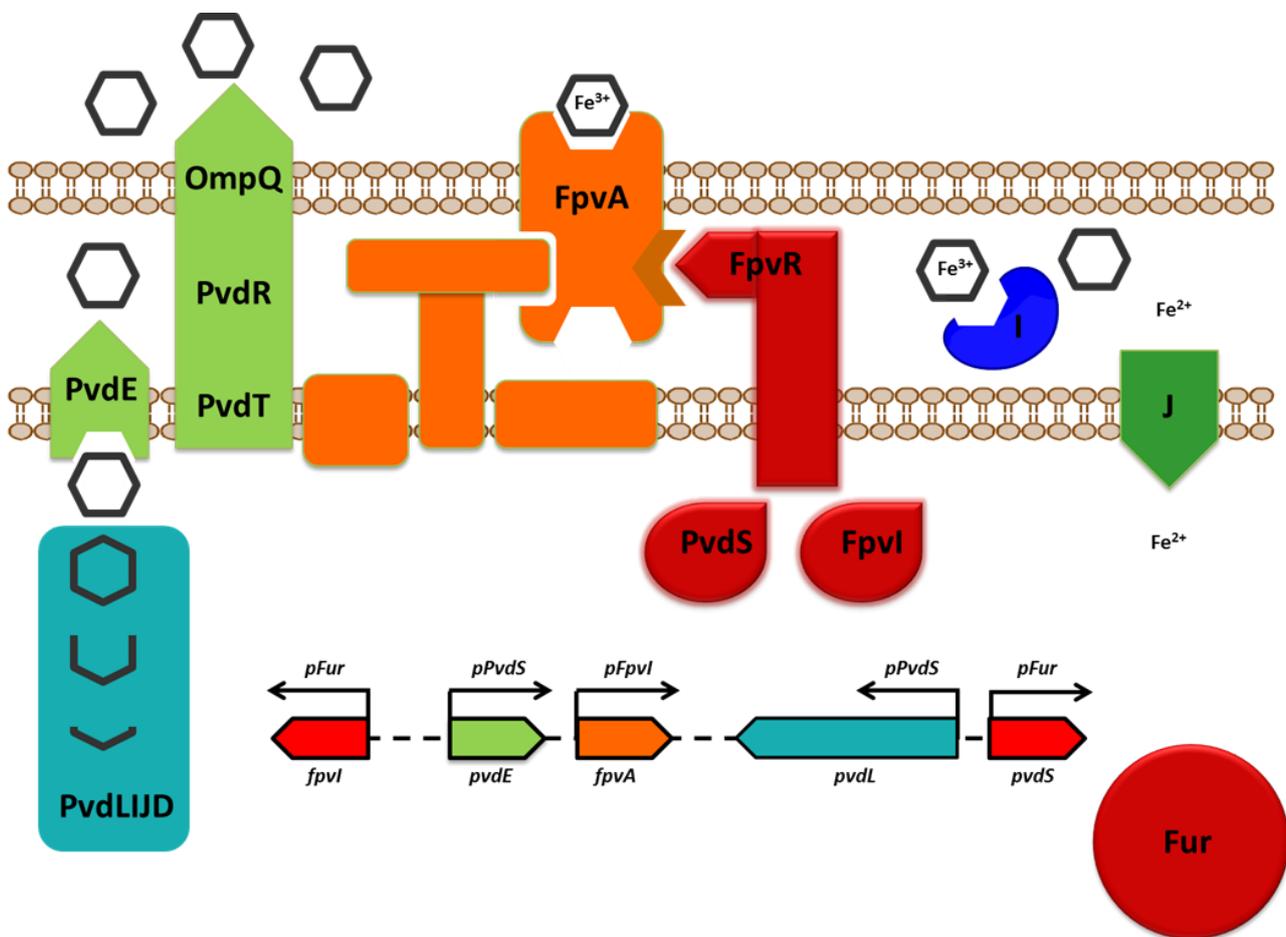


Figura 4: Sistemas de adquisición de hierro mediados por el sideróforo pioverdina (PVD) en *P. aeruginosa*. En condiciones limitantes en hierro el regulador global Fur desreprime (entre otros) los promotores de los genes *pvdS* y *fpvI* que codifican para dos factores ECF. Estos factores son mantenidos inactivos asociados a la membrana por el factor anti- σ FpvR. La presencia de Fe³⁺-PVD en el medio extracelular desencadena la activación de los factores ECF mediante el reconocimiento y la transducción de señal del transductor TonB-dependiente FpvA. El factor PvdS activa entonces la transcripción de los genes involucrados en la biosíntesis de pioverdinas, como los de las NRP-Sintetasas PvdLIJD. A su vez activa la expresión del gen *pvdE* que codifica para el transportador del tipo ABC involucrado en la secreción al periplasma del precursor de la PVD. Una vez en el periplasma se completa la maduración de la PVD y es secretada al medio extracelular por la bomba de eflujo tripartita OmpQ-PvdRT. El factor ECF FpvI activa a su vez la transcripción del gen del receptor específico *fpvA*. Este receptor internaliza la Fe³⁺-PVD al periplasma mediante interacción con el complejo TonB. Por mecanismos aún no del todo claros el complejo Fe³⁺-PVD es reducido en el periplasma y el Fe²⁺ internalizado al citoplasma. La pioverdina es entonces nuevamente secretada al medio extracelular mediante OmpQ-PvdRT.

transportador. Una vez en el periplasma, el complejo es reconocido por la proteína OrbB e internalizado al citoplasma por un sistema de transporte ABC codificado por los genes *orbCD*. La liberación del hierro del complejo se daría a través de la acción de la reductasa férrica OrbF en el citoplasma (Fig. 7).

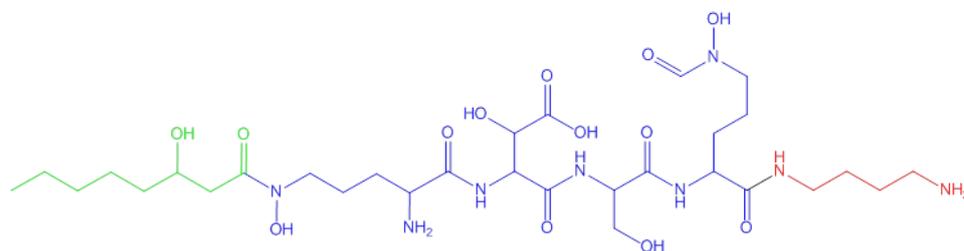


Figura 5: Estructura del sideróforo ornibactina F producido por *Burkholderia* spp. Se representa en verde el β -hidroxiácido de 8 carbonos, en azul la cadena peptídica y en rojo el residuo de putrescina.

La regulación de la expresión de los genes de biosíntesis y transporte de las ornibactinas se da de una manera más sencilla que la descrita para las PVDs. El regulador global es también la proteína Fur, pero el único gen del clúster reprimido por Fe^{2+} -Fur es el gen *orbS*, que codifica para un factor ECF homólogo a PvdS [2, 192]. El resto de los genes del clúster son activados por este factor σ , cuya actividad no está regulada por un factor anti- σ , por lo que la producción de estos sideróforos no responde a la presencia de complejos Fe^{3+} -ornibactina en el medio. Los promotores activados por OrbS presentan secuencias IS similares o idénticas a la descrita para PvdS. La figura 7 muestra de manera esquematizada la regulación de la producción de ornibactinas.

Objetivos

El objetivo general es elucidar los sistemas de transporte de las serobactinas y la regulación de los genes de biosíntesis y transporte de las mismas.

Los objetivos específicos son identificar el receptor de membrana externa específico de las serobactinas y elucidar el posible papel regulatorio del producto del gen *pfrI* en la producción y transporte de estos sideróforos.

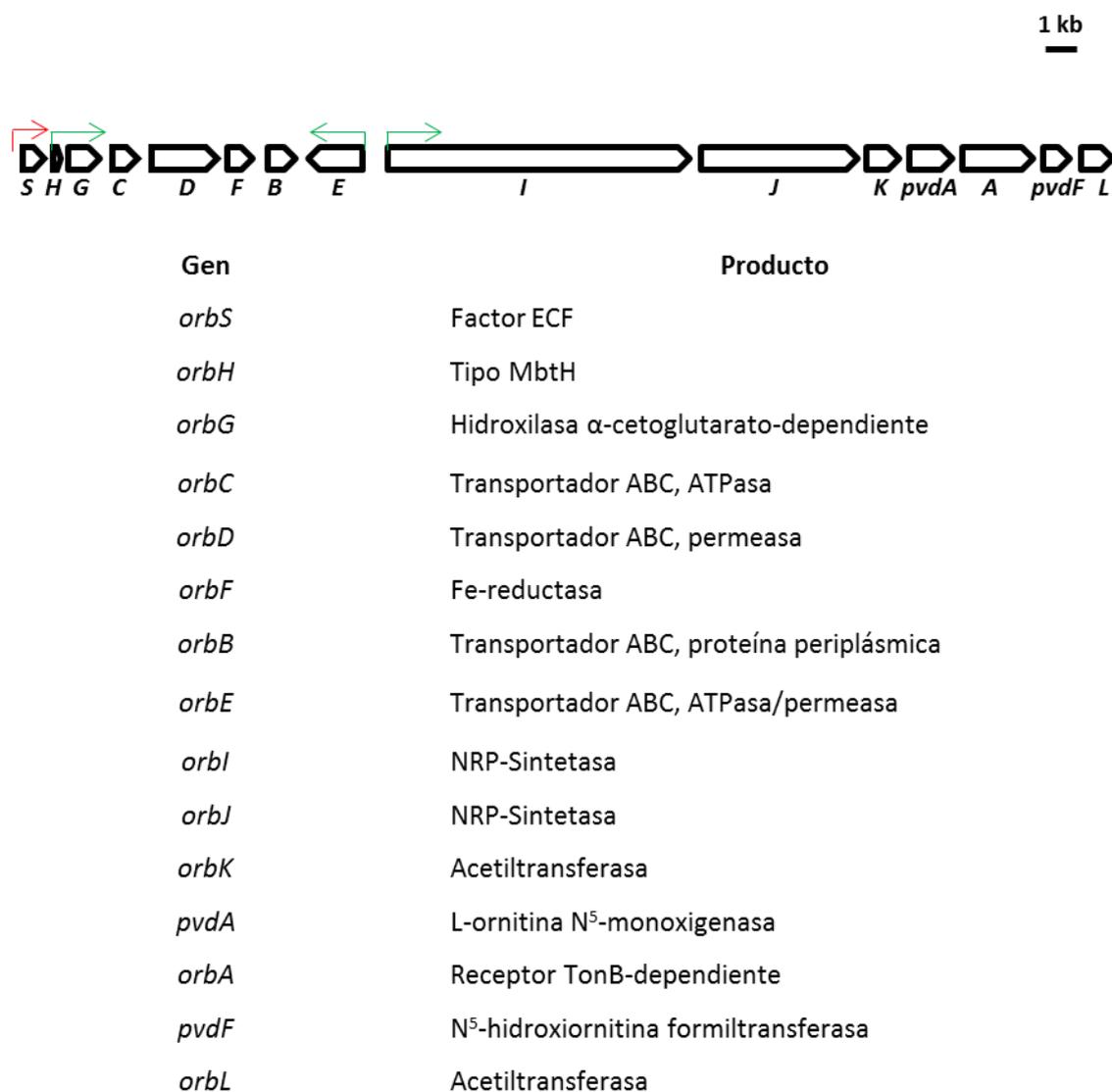


Figura 6: Organización de los genes de la biosíntesis, el transporte y la regulación de las ornibactinas en *Burkholderia cenocepacia* J2315. El regulador global Fur reprime la expresión de *orbS* (flecha roja) en condiciones no limitantes en hierro. Los genes regulados por el factor ECF OrbS están señalados por una flecha verde que representa la secuencia de reconocimiento consenso (TAAAT-N16-CGT).

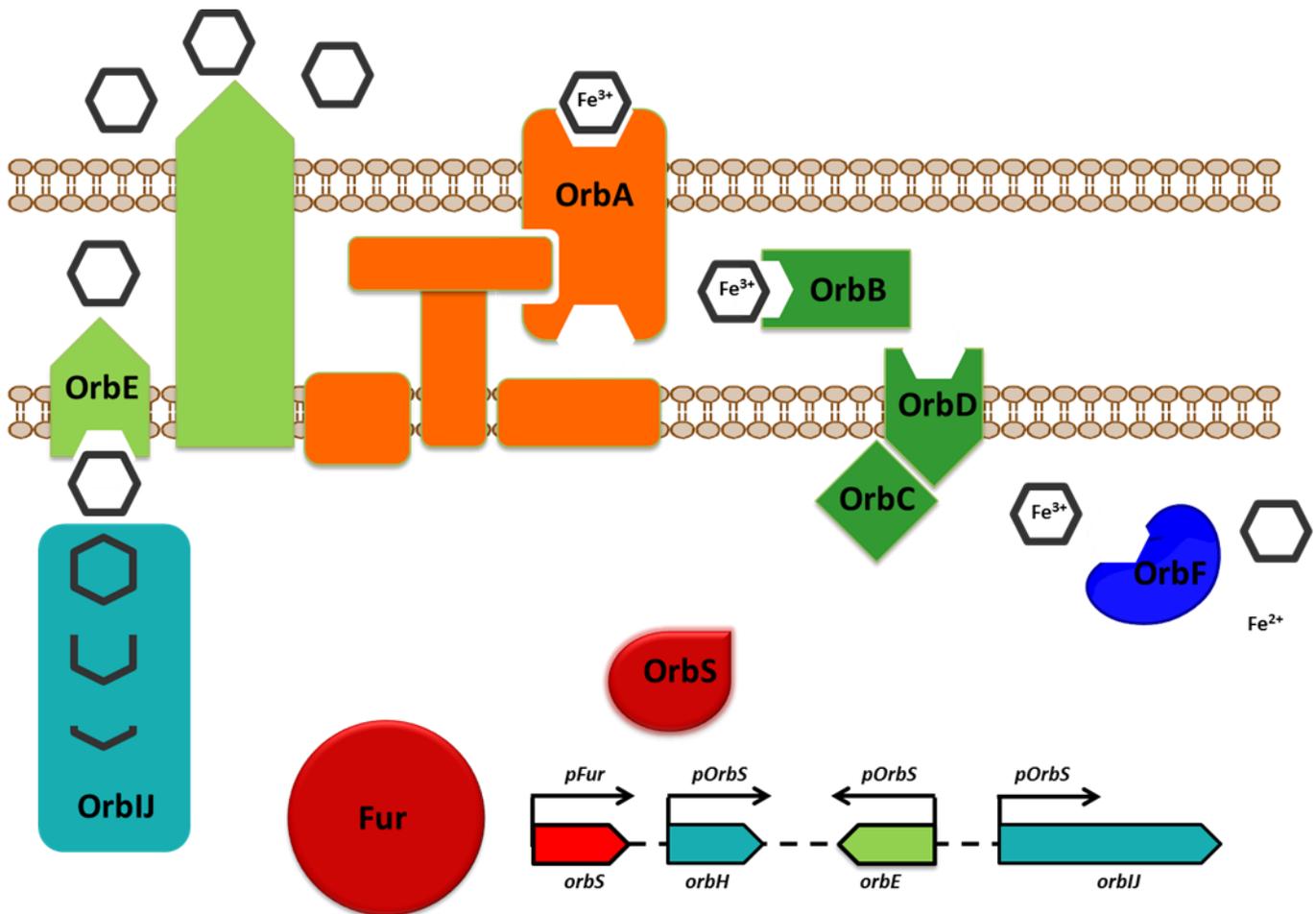


Figura 7: Sistemas de adquisición de hierro mediados por el sideróforo ornibactina en *B. cenocepacia*. En condiciones limitantes en hierro el regulador global Fur desreprime (entre otros) el promotor del gen *orbS* que codifica para un factor ECF. Este sistema de regulación carece de un factor anti- σ y de un transductor TonB-dependiente. OrbS activa entonces la transcripción de los genes involucrados en la biosíntesis de pioverdinas, como los de las NRP-Sintetasas OrbI/J. A su vez activa la expresión del gen *orbE* que codifica para el transportador del tipo ABC involucrado en la secreción al periplasma de la ornibactina. Es desconocido el sistema de secreción de las ornibactinas del periplasma al medio extracelular. El receptor TonB-dependiente OrbA internaliza la Fe^{3+} -ornibactina al periplasma mediante interacción con el complejo TonB. El complejo Fe^{3+} -ornibactina es reconocido específicamente por la proteína de unión periplásmica OrbB, quién lo transporta hasta la permeasa OrbD, y mediante hidrólisis acoplada de ATP realizada por OrbC se introduce el complejo al citoplasma, donde la Fe-reductasa OrbF libera el ion por reducción.

Materiales y métodos

Crecimiento bacteriano

Las cepas de *H. seropedicae* se cultivaron a 30°C en medio TY (triptona 5 g/L, extracto de levadura 3 g/L, CaCl₂ 0,1 g/L) [18], NfbHP-malato [102] o en el medio NfbHP-GG. Este medio es una modificación del NfbHP-malato, pero conteniendo glucosa 11 mM como fuente de carbono en lugar de malato, glutamato 3 mM, NH₄Cl 20 mM y biotina 0,4 mM. Diferentes condiciones de disponibilidad de hierro se obtuvieron con el agregado de FeCl₃ 37 µM, o de los quelantes de metales 2,2'-dipiridilo (DP) o de etilendiamina-di-O-hidroxifenilacetato (EDDHA), como se indica para cada ensayo. La cepa de *E. coli* TOP10 se cultivó rutinariamente en medio LB [20] a 37°C.

Todos los ensayos y repeticiones se realizaron a partir de colonias frescas crecidas en medio TY o LB sólido a 30°C o 37°C durante 48 o 24 horas, sembradas a partir de cultivos stock en glicerol 25% (v/v) conservados a -80°C.

Los antibióticos empleados se utilizaron en las siguientes concentraciones: ampicilina 50 µg/ml (Amp⁵⁰), ácido nalidíxico 5 µg/ml (Nal⁵), tetraciclina 10 µg/ml para resistencias portadas en plásmidos y 5 µg/ml para inserciones cromosómicas (Tc¹⁰, Tc⁵), gentamicina 20 µg/ml (Gm²⁰), el X-galactopiranosido (X-gal²⁰) se agregó en una concentración final de 20 µg/ml.

Para los ensayos de crecimiento en medio líquido, la cepa *H. seropedicae* Z67 y las mutantes isogénicas derivadas se crecieron en 200 µl de medio NfbHP-GG con diferentes condiciones de disponibilidad de hierro en placas de 96 pocillos Cell Star®, Greiner Bio One, incubándose a 30°C en un lector de placas Varioskan Flash® (Thermo), con agitación periódica de 30 segundos cada veinte minutos. El crecimiento se determinó por medidas de densidad óptica a 620 nm. Los diferentes medios se inocularon con células crecidas en medio NfbHP-GG suplementado con FeCl₃ 37 µM en fase exponencial tardía con una densidad celular inicial de 1 x 10⁵ ufc/ml.

Bioensayos

La capacidad de distintos compuestos de ser utilizados como fuentes nutricionales de hierro fue evaluada mediante bioensayos en medio sólido como se describió anteriormente [4, 139]. Brevemente, se inocularon de manera incorporada aproximadamente 10⁸ células de las cepas a estudiar en placas con TY EDDHA 500 µM, previamente crecidas en TY líquido durante 24 horas. Una vez solidificado el medio, se realizaron pocillos de 5 mm en la placa y se agregaron en los

mismos 10 µl de las siguientes fuentes nutricionales de hierro: FeCl₃ 37 µM; Fe³⁺-ferricromo 300 µM y Fe³⁺-serobactina aprox. 300 µM. La obtención de Fe³⁺-serobactina se describe en el artículo presentado en el capítulo 4.

Análisis in silico

El análisis de la región del genoma de *H. seropedicae* SmR1 involucrada en la biosíntesis de serobactinas se hizo con las herramientas disponibles en la plataforma IMG <http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/w/main.cgi> [119]. El análisis de dominios Pfam se realizó usando la plataforma de IMG y la plataforma del Instituto SANGER, disponible en el sitio <http://pfam.sanger.ac.uk/> [66]. El alineamiento de las secuencias aminoacídicas deducidas para las proteínas CirA y FhuA se hizo a través de la herramienta MUSCLE [63] disponible en la página <http://www.ebi.ac.uk/>.

Extracción de proteínas de membrana externa

Para la obtención de una fracción enriquecida en proteínas de membrana externa se cultivó la cepa *H. seropedicae* Z67 en 50 ml de TY FeCl₃ 37 µM, TY EDDHA 250 µM, NfbHP-GG FeCl₃ 72 µM y NfbHP-GG DP 50 µM durante 24 horas con agitación constante (200 rpm). Los diferentes medios se inocularon con células crecidas hasta fase exponencial tardía en medio TY o en medio NfbHP-GG suplementado con FeCl₃ 72 µM según corresponde logrando una densidad celular inicial de 1 x 10⁵ ufc/ml.

Los cultivos se centrifugaron durante 10 min a 10.000g, luego las células se lavaron dos veces con Tris-HCl 10 mM pH 7,5 y se resuspendieron en 10 ml del mismo tampón. Esta suspensión celular se lisó por presión mecánica pasándose tres veces por una French Press, y el extracto lisado se incubó durante 90 min con 0,4 mg/ml de ADNasa, 0,4 mg/ml de ARNasa y 10 mg/ml de lisozima (todas adquiridas en SIGMA-Aldrich). Posteriormente se incubó con Sarkosyl 0,75% /p/v durante 60 min a temperatura ambiente y las mezclas se centrifugaron 10 min a 10.000g. Se descartó el sedimento conteniendo las células sin romper, y los sobrenadantes obtenidos se centrifugaron 2 h a 59.000 g y a 4°C. Se descartaron los sobrenadantes y los pellet conteniendo la fracción enriquecida en proteínas de membrana externa (PME) se guardaron para su posterior análisis.

Identificación de proteínas por espectrometría de masas

Las fracciones obtenidas enriquecidas en PMEs se analizaron por electroforesis en geles desnaturizantes de acrilamida 12%, bis-acrilamida 0,8% mediante la técnica clásica de SDS-PAGE

[112]. Los pellet de PME se resuspendieron en 500 μ l de H₂O bidestilada y 500 μ l del tampón de muestra y se calentaron a 95°C durante 4 min. Luego de la electroforesis, las proteínas se tiñeron con azul brillante de Coomassie. Las bandas a analizar se cortaron con bisturí estéril y se analizaron por espectrometría de masas como se describió previamente [50, 51]. Brevemente las bandas se destiñeron con acetonitrilo 100 % y se digirieron con tripsina 20 μ g/ml a 37°C durante toda la noche. Los péptidos digeridos se extrajeron con una solución de ácido trifluoroacético (TFA) 5% (v/v), acetonitrilo 50% (v/v) y se concentraron por vacío. Las muestras obtenidas se desalaron usando puntas PerfectPure® C-18 (Eppendorf) y se eluyeron directamente sobre la matriz en la placa para su análisis. Los espectros de masas se adquirieron usando un espectrómetro Autoflex MALDI-TOF-MS (Bruker Daltonics) en modo de reflexión de ion positivo/retardado con un voltaje de aceleración de 20 kV, tiempo de retardo de 150 ns y el rango de masa de adquisición 800-3200 Da. La calibración externa se realizó utilizando un kit de calibración de péptido en el intervalo de masas 800-3200 Da (Bruker Daltonics). Para la calibración interna, se utilizaron los picos conocidos de autólisis de la tripsina porcina. Las búsquedas de bases de datos se realizaron con el software ProteinProspector v3.2.1 en un servidor local (www.genopar.org). Las listas de los picos se crearon utilizando el software FlexAnalysis 2.0 (Bruker Daltonics). Los criterios utilizados para la identificación de proteínas incluyen un mínimo de cinco fragmentos péptidicos que cubran al menos el 20% de la proteína y una puntuación MOWSE al menos 10³ veces mayor que el segundo candidato cuando existe más de una proteína candidata.

Técnicas generales de biología molecular

Los cebadores utilizados en este trabajo se muestran en la tabla 1 y los programas de ciclado se describen en el anexo II. Las enzimas utilizadas fueron la Taq polimerasa y la Pfu polimerasa ambas de Fermentas. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 50 μ l conteniendo el tampón correspondiente 1 x de cada enzima utilizada (Taq o Pfu) con KCl, MgCl₂ o MgSO₄ 2 mM para la enzima Taq o Pfu respectivamente, dNTPs 0,2 mM, DMSO 5% (v/v), los cebadores correspondientes 0,2 μ M cada uno, molde de ADN 50 ng totales, y 1,25 U de Taq polimerasa o 2,5 U de Pfu polimerasa. Para los PCR de colonia se tocó con palillos estériles la colonia a analizar y se resuspendió la misma en la mezcla de PCR sin polimerasa. La suspensión resultante se incubó 20 min a 95 °C, luego de los cuales se agregó Taq polimerasa y se procedió con el ciclo de amplificado correspondiente al par de cebadores utilizados (Anexo II). Los ensayos de digestión y de ligación se realizaron según recomendación de los fabricantes y las enzimas utilizadas fueron adquiridas en

PROMEGA o Fermentas. La cepa *E. coli* TOP10 se utilizó como cepa portadora de las distintas construcciones. Trabajos rutinarios de biología molecular como preparación plasmídica por lisis alcalina, transformación por shock térmico y preparación de células quimiocompetentes se realizaron mediante técnicas clásicas ya descritas [164]. La confirmación de la obtención de plásmidos, digestiones, o productos de amplificación se realizó en geles de agarosa 0,8 % (p/v) en presencia de GoodView® y posterior exposición a luz UV. Para la purificación de bandas de geles de agarosa se utilizó el QIAquick Gel Extraction Kit® (QIAGEN).

Tabla 1. Cebadores utilizados en este trabajo.

Cebador	Secuencia	Sitios de corte presentes
FHUA _{sense}	5' ATACTCGAGT GCCGGCGCTTCAATC 3'	XhoI (CTCGAG)
FHUA _{anti}	5' GGC GCGGCGCTCGTAGTC 3'	
CIRA _{sense}	5' AAATCTAGACTG CAGCTCGTTCGGCATACAAAG 3'	XbaI (TCTAGA) PstI (CTGCAG)
CIRA _{anti}	5' AAACTCGAGCTG CAGGGACTTCGGCGATCTTGATG 3'	XhoI (CTCGAG) PstI (CTGCAG)
INVCIRA _{sense}	5' CGTGACCTGCCGCCCTG 3'	
INVCIRA _{anti}	5' GTCAGCAACCTCGCCAACCG 3'	
PFRI _{sense}	5' GGAAAACGCCGCCAGGTCATC 3'	
PFRI _{anti}	5' CACCGCATCGTCAGCATCAAAACTC 3'	
2348 _{sense}	5' GAAGATCTCGGCGCTGTCATGGAAGGTG 3'	BglIII (AGATCT)
2348 _{anti}	5' GAAGATCTGCTGGCGCGGTTGCG 3'	BglIII (AGATCT)

Construcción de plásmidos para mutagénesis y obtención de mutantes por conjugación

Las cepas utilizadas en este trabajo se describen en la tabla 2. Los plásmidos utilizados se representan en la tabla 3 y los mapas de los vectores y las construcciones están esquematizados en el anexo III. La estrategia general utilizada para la obtención de todos los mutantes dirigidos fue mediante dos eventos de recombinación homóloga. En dicha estrategia los diferentes genes deletados o interrumpidos se clonaron en el vector suicida pWS233 [176], el cual posee una copia de los genes *sacRB*, que provocan sensibilidad a altas concentraciones de sacarosa.

Para la construcción del pWFHUA::LacZ se procedió de la siguiente manera: el gen *fhuA* se amplificó utilizando los cebadores FHUA_{sense} y FHUA_{anti} (Tabla 1). Dicho producto de amplificación se digirió con las enzimas NotI-XhoI y el fragmento obtenido se clonó en los sitios

NotI-Sall del vector de clonado pBluescript SK+® (pBSK, Stratagene) que permite la visualización de cepas portadoras de plásmido con inserto (colonias blancas en medio con el indicador X-gal) por α -complementación de la enzima β -galactosidasa. De esta manera se obtuvo el pBFHUA. El casete *lacZaacC1* se escindió del plásmido pAB2001 [17] con la enzima Sall y se clonó en el mismo sitio del pBFHUA presente en la secuencia del gen, obteniéndose el plásmido pBFHUA::LacZ. Dicho plásmido fue digerido con BamHI y el fragmento interno del gen interrumpido con el *lacZaacC1* se clonó en el sitio BglII del pWS233.

El plásmido p Δ FHUA se obtuvo de la siguiente manera: el pBFHUA se digirió con BamHI. Dicha digestión escinde un fragmento de 1317 pb (múltiplo de tres) internos a la secuencia del gen que mantiene el marco abierto de lectura. El fragmento remanente de esta digestión conteniendo el vector y los extremos del gen se religó obteniéndose el p Δ FHUA. El fragmento con el gen deletado se amplificó con la enzima Pfu (Fermentas) utilizando los cebadores FHUAense y FHUAanti. El amplicón obtenido de extremos romos se clonó en pWS233 digerido con BglII, luego de reparar y fosforilar los extremos cohesivos utilizando las enzimas comerciales End Repair Enzyme Mix incluidas en el CopyControl™ HTP Fosmid Library Production Kit (Epicentre) según indicación de los fabricantes.

Para la construcción del p Δ CIRA se amplificó el gen con los cebadores CIRAsense y CIRAanti. El producto obtenido se digirió con XbaI-XhoI y se ligó en pBSK digerido con las mismas enzimas obteniéndose el pBCIRA. Utilizando este plásmido como molde se realizó una PCR invertida utilizando los cebadores InvCIRAsense e InvCIRAanti con la enzima Pfu. El amplicón obtenido se religó obteniéndose el p Δ CIRA. Dicho plásmido se digirió con PstI y se ligó con pAB2001 también digerido con PstI, obteniéndose el pA1 Δ CIRA, el cual se digirió con BamHI y se clonó en el sitio BglII de pWS233.

Para la construcción del pWPFRI::LacZ se amplificó con la enzima Pfu el gen *pfri* empleando los primers PFRIense y PFRIanti, y el producto obtenido se clonó en el sitio EcoRV del pBSK, obteniéndose el pBPFRI. El cassette *lacZaacC1* se escindió del pAB2001 con la enzima SmaI y se clonó en el sitio EcoRV del pBPFRI presente en el medio del gen, obteniéndose el pBPFRI::LacZ. Dicha construcción se digirió con las enzimas BamHI-HindIII y se clonó el gen interrumpido en los sitios BamHI-HindIII del pAB2002 [17], obteniéndose el pA2PFRI::LacZ. Esta vez el gen interrumpido se escindió con la enzima EcoRI y se clonó en sitio EcoRI del pWS233.

Las diferentes construcciones pWFHUA::LacZ, p Δ FHUA, p Δ CIRA y pWPFRI::LacZ, se introdujeron en la cepa Z67 mediante conjugación triparental usando la cepa de *E. coli* TOP10 conteniendo el plásmido a recombinar (pWx) y la cepa TOP10 conteniendo el plásmido pRK2013

[60], que posee los genes de transferencia necesarios para la conjugación. La selección del primer evento de recombinación se realizó en medio TY Tc⁵ Nal⁵. Colonias aisladas en este medio se repicaron en 5 ml de TY Nal⁵ y luego de 24 horas de crecimiento, 2 x 10⁶ células se plaquearon en NfbHP-malato sólido suplementado con sacarosa 8% (p/v) Nal⁵. Para el caso de aquellas mutantes interrumpidas con el casete *lacZaacC1*, las cepas donde hubiera sucedido un doble evento de recombinación se seleccionaron por desarrollo de color azul en medios con X-gal²⁰. En el caso de las mutantes por delección, entre 20 y 40 colonias aisladas en medio NfbHP-malato sacarosa 8% (p/v) se analizaron por PCR de colonia. La confirmación de los mutantes se realizó por hibridación “Southern blot” [163] o por PCR.

Tabla 2. Cepas utilizadas en este trabajo.

Cepas	Fenotipo	Referencia
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>		
Z67	Cepa salvaje, Nal ^R	[8]
Z67- <i>fhuA::lacZ</i>	Mutante polar por inserción de casete <i>lacZaacC1</i> en Hsero_2345	Este trabajo
Z67- <i>ΔfhuA</i>	Mutante no polar por delección en Hsero_2345	Este trabajo
Z67- <i>ΔcirA</i>	Mutante no polar por delección en Hsero_2337	Este trabajo
Z67- <i>pfri::lacZ</i>	Mutante polar por inserción de casete <i>lacZaacC1</i> en Hsero_2338	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i>		
TOP10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-	Invitrogen

Construcción de plásmidos para complementación y obtención de complementantes

Para los ensayos de complementación *in trans* se utilizó el vector pCPP30 [90], de amplio rango de huésped, el cual permite identificar la presencia de colonias portadoras de insertos en el vector mediante diferenciación de colonias blancas (con inserto) de las azules (sin inserto) en medios con X-gal.

El pCFHUA se obtuvo subclonando el fragmento KpnI-SacI del pBFHUA en el sitio KpnI-SacI del pCPP30. En el caso del pCCIRA, se digirió con PstI el pBCIRA y el fragmento conteniendo el gen *cirA* se clonó en el sitio PstI del pCPP30. La orientación del gen con respecto al promotor *lac* del pCPP30 se determinó mediante restricción con la enzima HindIII y se nombraron aquellos plásmidos donde el gen *cirA* quedó en la misma dirección que dicho promotor como pCCIRA+ y

aquellos donde el gen quedó en sentido opuesto al promotor como pCCIRA-. Para el caso del pCPFRI se subclonó un fragmento HindIII-EcoRI del pBPFRI en los mismos sitios del pCPP30.

Tabla 3. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmidos	Fenotipo	Referencia
pBluescript SK+®	Vector de clonado, Amp ^R , Selección Azul/Blanco	Stratagene
pBFHUA	<i>fhuA</i> clonado en pBSK	Este trabajo
pBCIRA	<i>cirA</i> clonado en pBSK	Este trabajo
pBPFRI	<i>pfri</i> clonado en pBSK	Este trabajo
pBFHUA::LacZ	<i>fhuA</i> interrumpido con <i>lacZaacC1</i> clonado en pBSK	Este trabajo
pΔFHUA	<i>fhuA</i> deletado clonado en pBSK	Este trabajo
pΔCIRA	<i>cirA</i> deletado clonado en pBSK	Este trabajo
pBPFRI::LacZ	<i>pfri</i> interrumpido con <i>lacZaacC1</i> clonado en pBSK	Este trabajo
pB2348pr	Región intergénica de Hsero_2348 y <i>pvdE</i> clonada en pBSK	Este trabajo
pWS233	Vector suicida en <i>Herbaspirillum</i> , Gm ^R , Tc ^R , <i>sacBR</i>	[176]
pWFHUA::LacZ	<i>fhuA</i> interrumpido con <i>lacZaacC1</i> clonado en pWS233	Este trabajo
pWΔFHUA	<i>fhuA</i> deletado clonado en pWS233	Este trabajo
pWΔCIRA	<i>cirA</i> deletado clonado en pWS233	Este trabajo
pWPFRI::LacZ	<i>pfri</i> interrumpido con <i>lacZaacC1</i> clonado en pWS233	Este trabajo
pAB2001		[17]
pA1ΔCIRA	<i>cirA</i> deletado clonado en pAB2001	Este trabajo
pAB2002		[17]
pA2PFRI::LacZ	<i>pfri</i> interrumpido con <i>lacZaacC1</i> clonado en pAB2002	Este trabajo
pCPP30	IncP, Vector de complementación, Tc ^R , Selección Azul/Blanco	[90]
pCFHUA	<i>fhuA</i> clonado en pCPP30	Este trabajo
pCCIRA+	<i>cirA</i> clonado en pCPP30 en el mismo sentido que el promotor <i>lac</i>	Este trabajo
pCCIRA-	<i>cirA</i> clonado en pCPP30 en sentido opuesto al del promotor <i>lac</i>	Este trabajo
pCPFRI	<i>pfri</i> clonado en pCPP30	Este trabajo
pCFHUApr	<i>fhuA</i> bajo control del promotor de Hsero_2348 clonado en pCPP30	Este trabajo
pCCIRApr	<i>cirA</i> bajo control del promotor de Hsero_2348 clonado en pCPP30	Este trabajo
pRK2013	ColE1 con genes RK ₂ <i>tra</i> genes. Km ^R . Vector de movilización	[60]

Para obtener construcciones que expresen los genes *fhuA* y *cirA* a partir de la región promotora del Hsero_2348 se amplificó la región intergénica entre este gen y el *pvdE* con los cebadores 2348sense y 2348anti. El producto obtenido se digirió con BglII y se clonó en el sitio BamHI del pBSK obteniéndose el pB2348pr. El sentido de inserción se analizó mediante PCR utilizando los pares de cebadores 2348sense-M13 2348anti-M13. Dicho plásmido se digirió con HindIII-XbaI y se clonó en los mismos sitios del pCFHUA obteniéndose el pCFHUApr. El pB2348pr se digirió con EcoRI-XbaI y se clonó en los mismos sitios del plásmido pCCIRA-, obteniéndose el pCCIRApr. Las diferentes construcciones pCx se introdujeron en las distintas cepas mediante conjugación triparental como se explicó anteriormente, seleccionando las cepas portadoras de plásmido en medio TY Tc¹⁰ NaI⁵.

Resultados

Identificación de dos posibles receptores para serobactinas mediante análisis in silico

En la figura 8A se muestra el contexto genómico del gen de la NRP-Sintetasa (rojo) responsable de la biosíntesis de las serobactinas. En la tabla 1 del artículo presentado en el capítulo 4 se describen las características principales de los genes de esta región. Dos ORFs homólogos a receptores TonB-dependientes (verde), anotados como *cirA* (Hsero_2337) y *fhuA* (Hsero_2345), están presentes en dicho contexto. El análisis de los dominios Pfam [66] de los productos de ambos genes se muestra en la figura 8B. Como se observa en la figura, ambos productos presentan los dominios Pfam 07715 (dominio corcho) y 00593 (receptores TonB) característicos de todos los receptores TonB-dependientes. Adicionalmente, el producto deducido de *cirA* presenta un dominio Pfam 07660 (STN) característico de los transductores TonB-dependientes ausente en el producto de *fhuA*. El alineamiento por MUSCLE de ambas proteínas (Fig. 9) indica que ambos productos comparten un 63% de identidad y que CirA posee un extremo terminal mucho más largo, otra característica de los transductores TonB-dependientes [115]. Concomitantemente, corriente abajo del gen *cirA*, se encuentra un ORF anotado como *pfri* (Fig. 8A, azul) homólogo a factores σ ECF. Sin embargo no existe ningún gen que codifique para un factor anti- σ en esta región del genoma. Un análisis manual de las regiones intergénicas en dicha región mostró la presencia de secuencias IS canónicas (TAAAT-N₁₆-CGT) 65 pb antes de los codones de inicio de traducción de los genes *pvdE* y Hsero_2339 (Fig. 8A).

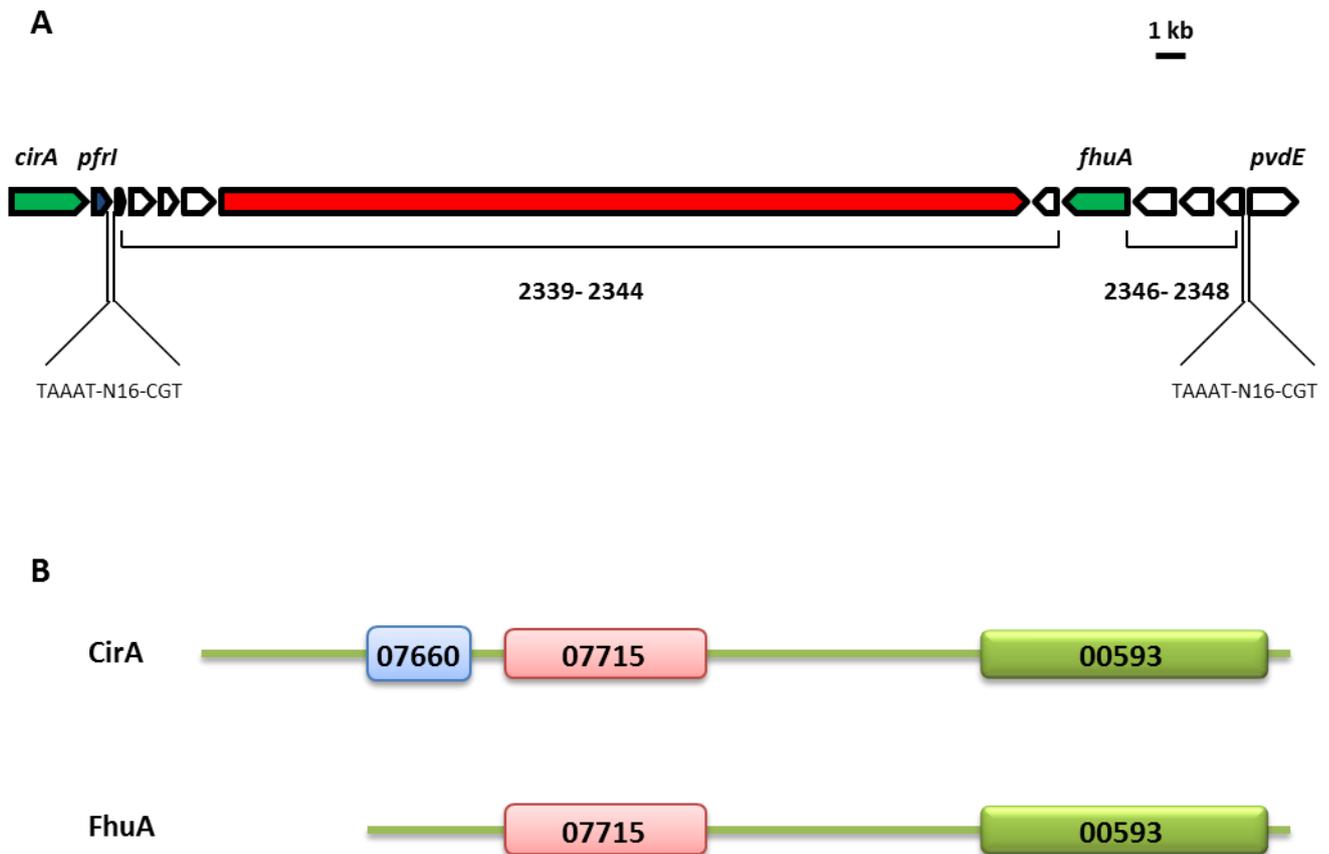


Figura 8: Análisis del contexto genómico de la NRP-Sintetasa responsable de la biosíntesis de las serobactinas y de los dominios Pfam de dos receptores TonB-dependientes presentes en el mismo. A) Casete genómico representado en la figura 2 del capítulo 2 con el gen que codifica para la NRP-Sintetasa (rojo), dos ORFs anotados como *cirA* y *fhuA* con homología a receptores TonB-dependientes (verde) y un ORF con homología a factores ECF (azul). Corriente arriba de los genes *Hsero_2339* y *pvdE* existe una secuencia idéntica a las secuencias IS reconocidas por los factores ECF PvdS y OrbS. B) Análisis de dominios Pfam de los productos de los genes *cirA* y *fhuA*. *CirA* posee en su extremo N-terminal el dominio 07660 característico de los transductores TonB-dependientes.

FhuA actúa como receptor de las serobactinas

El primer acercamiento realizado para identificar el receptor específico de las serobactinas fue mediante técnicas de proteómica. La cepa *H. seropedicae* Z67 se creció en medio rico TY [18] con el agregado de FeCl_3 37 μM (medio rico en hierro) o con el agregado del quelante del ión férrico EDDHA 200 μM (medio con baja disponibilidad de hierro). Se obtuvieron fracciones enriquecidas en proteínas de membrana externa (PME) a partir de ambos cultivos y la composición de las

mismas se analizó por SDS-PAGE (Fig 10). Mediante MALDI TOF se identificaron las tres bandas que se expresaban diferencialmente en medios con baja disponibilidad de hierro, siendo una de ellas el producto del gen *fhuA*. Las otras dos bandas identificadas correspondieron a los productos de los genes Hsero_0107 y Hsero_3255, anotados respectivamente como *cirA* y *fju*. El primero de ellos (Hsero_0107) si bien está anotado en el genoma como homólogo al gen *cirA* presenta homología con receptores TonB-dependientes específicos de compuestos hemínicos. Previamente, mediante bioensayos se demostró que *H. seropedicae* puede utilizar hemina y hemoglobina como fuentes nutricionales de hierro (dato no mostrado).

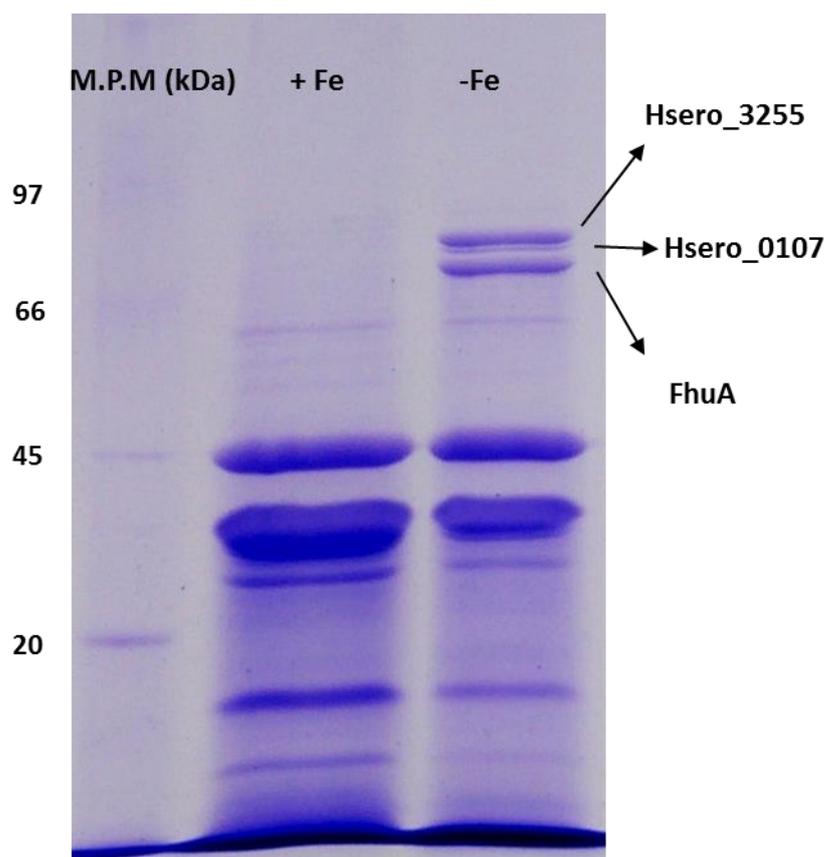


Figura 10: Perfil de PME de la cepa *H. seropedicae* Z67. La cepa se creció en medio TY con el agregado de FeCl_3 37 μM (+Fe) o con el quelante DP 200 μM (-Fe). Las bandas expresadas diferencialmente en el medio con baja disponibilidad de hierro fueron identificadas por espectrometría MALDI-TOF.

El producto del gen Hsero_2337 (también homólogo al gen *cirA*) no fue identificado en este ensayo, debido quizás a que el mismo no se esté expresando en el medio rico TY o porque se expresa en cantidades no detectables por este método. Para descartar la primera hipótesis se decidió realizar otra extracción de PME de la cepa crecida ahora en medio mínimo NfbHP-GG con

FeCl₃ 37 μM o con el agregado de DP 50 μM. Asimismo, se extrajeron las PME de las mutantes 44.46 y 4.3 con la hipótesis de que dichas mutantes comprometidas en la adquisición de hierro produjeran una mayor cantidad de receptor. Las extracciones provenientes de las cepas crecidas en las dos condiciones fueron analizadas por SDS-PAGE. En la figura 11 se muestra el gel señalándose la banda diferencialmente expresada identificada por MALDI TOF correspondiente al producto del gen *fhuA*. No hubo diferencias observables entre el perfil de la cepa salvaje y el de las mutantes.

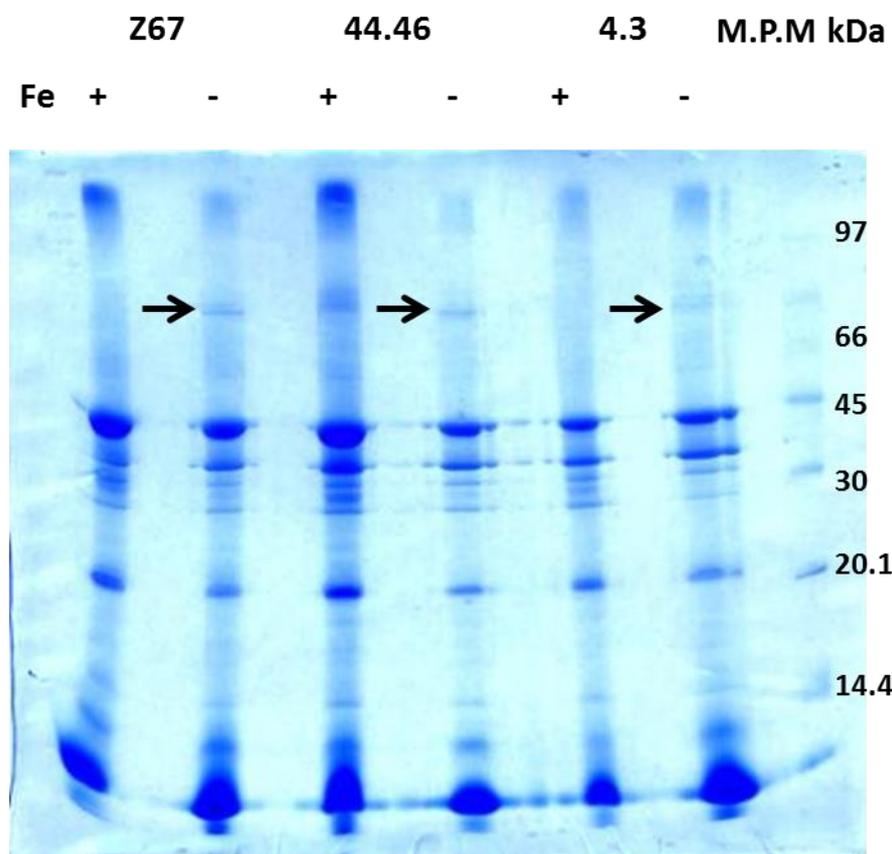


Figura 11: Perfil de PME de la cepa salvaje *H. seropedicae* Z67 y de las mutantes 44.46 (*exbD::mTn5*) y 4.3 (*Hsero_2343::mTn5*). Las cepas se crecieron en medio NfbHP-GG con el agregado de FeCl₃ 37 μM (+) o con el quelante DP 50 μM (-). La banda correspondiente a FhuA, expresada diferencialmente (flechas) en los medios con baja disponibilidad de hierro fue identificada por espectrometría MALDI-TOF.

Para determinar si efectivamente FhuA participaba en el transporte de serobactinas se construyeron dos mutantes en el gen *fhuA*, la primera de ellas, *Z67-fhuA::lacZ*, contenía una inserción del cassette *lacZaacC1* en el gen [17] y la otra mutante *Z67-ΔfhuA* se obtuvo por delección de un fragmento interno del gen. El fenotipo de producción de serobactinas en medio CAS evidencia claramente la sobreacumulación de sideróforos en ambas mutantes (Fig. 12). Sin

embargo, la mutante Z67-*fhuA::lacZ* presenta un menor halo en CAS que el de la cepa Z67- Δ *fhuA*. Al ser la primera de estas mutantes obtenida por inserción en el gen, esta menor producción de sideróforo podría deberse a un efecto polar sobre el gen Hsero_2344, el cual codifica para una probable lipasa (Tabla 1, artículo de capítulo 4), quizás involucrada en la obtención de los ácidos grasos de la serobactina a partir de triacilglicéridos. Sin embargo, las serobactinas producidas por esta mutante identificadas por espectrometría de masas, poseen estructuras similares a las producidas por la cepa salvaje (datos no mostrados), por lo que de poseer esta probable lipasa la función predicha existirían genes con funciones redundantes en el genoma de *H. seropedicae*.

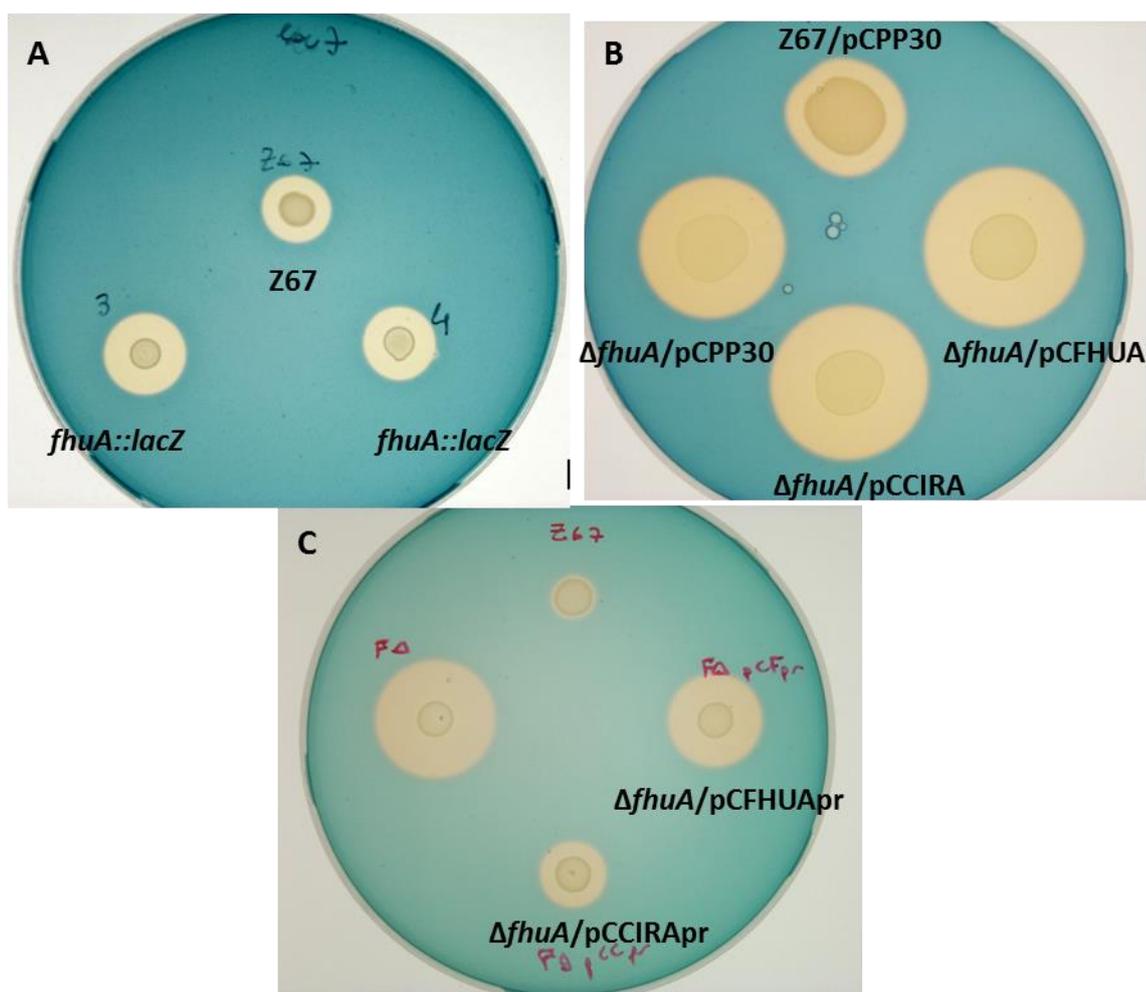


Figura 12: Fenotipo en medio CAS de la cepa salvaje *H. seropedicae* Z67 y de mutantes en el gen *fhuA*. A) Cepa salvaje y dos mutantes Z67-*fhuA::lacZ* obtenidas independientemente, B) la cepa salvaje conteniendo el pCPP30 y la mutante Z67- Δ *fhuA* conteniendo los plásmidos pCPP30, pCFHUA y pCCIRA, y C) la cepa salvaje conteniendo el pCPP30 y la mutante Z67- Δ *fhuA* conteniendo los plásmidos pCPP30, pCFHUApr y pCCIRApr. Diez microlitros de cultivos primarios en fase exponencial tardía conteniendo aprox. 1×10^6 u.f.c. de cada cepa se colocaron como gota en las placas, dejaron secar y se crecieron durante 24 hs a 30 °C.

Para los ensayos de complementación, se clonó un fragmento de 2402 pb conteniendo todo el marco de lectura del gen *fhuA* en el mismo sentido que el promotor *plac* del plásmido pCPP30 utilizado como vector [90]. Dicha construcción no fue capaz de complementar a la mutante Z67- Δ *fhuA* (Fig. 12B). Esto puede deberse a que el gen no se exprese de manera suficiente bajo control del *plac* presente en el pCPP30. Teniendo en cuenta que las regiones intergénicas presentes entre los genes Hsero_2344 y Hsero_2348 son muy pequeñas se puede suponer que estos genes forman parte de un solo operón. Pensando en esta posibilidad, se amplificó la región intergénica presente entre los genes Hsero_2348 y *pvdE* y se clonó en el plásmido pCFHUA generando el pCFHUApr de forma que el gen *fhuA* clonado se encuentre bajo la acción de su propio promotor. Esta construcción complementó parcialmente el fenotipo de la mutante Z67- Δ *fhuA* en CAS (Fig. 12C). Además del fenotipo en medio CAS, se evaluó si la mutación en el gen *fhuA* afectaba el crecimiento en medio líquido de la cepa mutante. Para ello se realizaron curvas de crecimiento de la cepa salvaje, de la mutante Z67- Δ *fhuA* y de la mutante complementada con el plásmido pCFHUApr crecidas en medio NfbHP-malato con alta y baja disponibilidad de hierro (Fig. 13). Como se muestra en la figura, la mutante presentó claramente comprometido su crecimiento cuando la disponibilidad de hierro era baja, mientras que la presencia de más copias del gen *fhuA in trans* complementó dicho fenotipo en forma parcial.

Cuando se evaluó el fenotipo de crecimiento en medio sólido mediante la realización de bioensayos se observó que el mutante Z67- Δ *fhuA* no revierte el fenotipo de formación de halo cuando se le agregan serobactinas como fuente de hierro, lo cual era de esperar si este receptor estaba involucrado en el transporte de serobactinas (Fig. 14). Teniendo en cuenta que la anotación FhuA hace referencia a los receptores específicos para el sideróforo ferricromo [24] se evaluó la participación de *fhuA* en la utilización de ferricromo férrico. Como se muestra en la figura 14 el crecimiento de la mutante fue similar al de la salvaje, por lo que *H. seropedicae* utilizaría otros receptores en vez o además de FhuA para la utilización del ferricromo como fuente de hierro. En suma el conjunto de estos resultados permite concluir que FhuA actúa como receptor para el transporte de serobactinas.

CirA puede participar del transporte de serobactinas cuando se encuentra en alto número de copias

De los resultados obtenidos en los ensayos con PME puede concluirse que el gen *cirA* no se encuentra activamente expresado en las condiciones estudiadas. Dada la alta similitud de CirA con FhuA, se evaluó si el gen *cirA* era capaz de complementar *in trans* a la mutación Δ *fhuA*. Para ello se

clonó un fragmento de 2793 pb conteniendo el gen *cirA* en el pCPP30. La mutante Z67 $\Delta fhuA$ conteniendo dicha construcción, el pCCIRApr, no fue capaz de revertir al fenotipo salvaje en medio CAS (Fig. 12B). Sin embargo, la cepa mutante complementada con el plásmido pCCIRApr, que posee el gen *cirA* bajo el control de la misma región promotora utilizada en el pCFHUApr, revierte parcialmente al fenotipo salvaje tanto en medio CAS como con respecto al crecimiento en medio líquido. Incluso, tanto el crecimiento como la internalización de sideróforos evidenciada según el fenotipo en medio CAS es mayor en la cepa Z67- $\Delta fhuA$ que contiene el pCCIRApr que en aquella que contiene el pCFHUApr (Figs. 12C y 13).

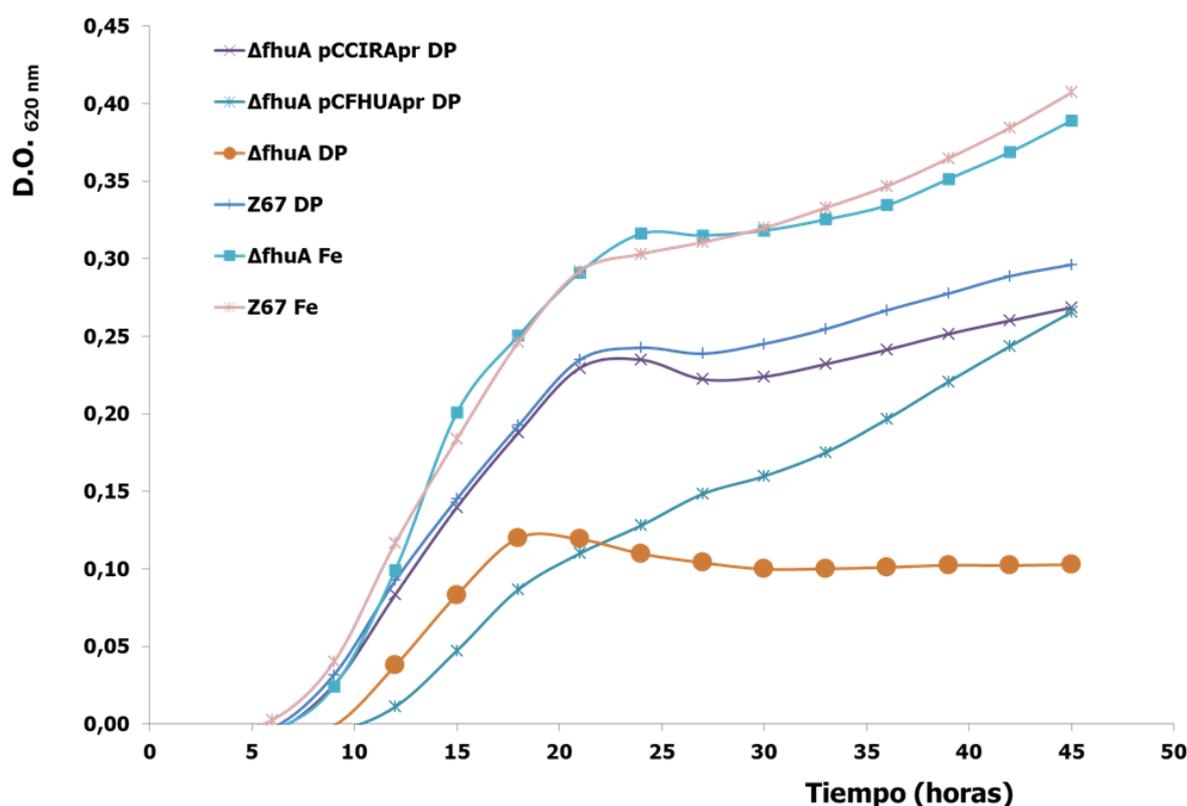


Figura 13: Fenotipo de crecimiento de la cepa *H. seropedicae* Z67 y de la mutante Z67- $\Delta fhuA$. La cepa salvaje con el plásmido pCPP30 y la mutante Z67- $\Delta fhuA$ con los plásmidos pCPP30, pCFHUApr y pCCIRApr se crecieron en medio NfbHP-GG con FeCl_3 37 μM (Fe) y DP 25 μM (DP). El crecimiento de la cepa Z67- $\Delta fhuA$ conteniendo los plásmidos pCFHUApr y pCCIRApr en medios con FeCl_3 37 μM fue similar que el correspondiente a la cepa salvaje y a la mutante con el plásmido pCPP30 (no se muestra en la figura). Los diferentes medios se inocularon con células crecidas en medio NfbHP-GG suplementado con FeCl_3 37 μM en fase exponencial tardía a una densidad celular inicial de aprox. 1×10^5 unidades formadoras de colonia (UFC)/ml.

Estos resultados muestran que CirA podría funcionar como transportador de serobactinas, sin embargo, en las condiciones estudiadas, dicho transporte no sería efectivo debido a una baja o nula expresión del gen.

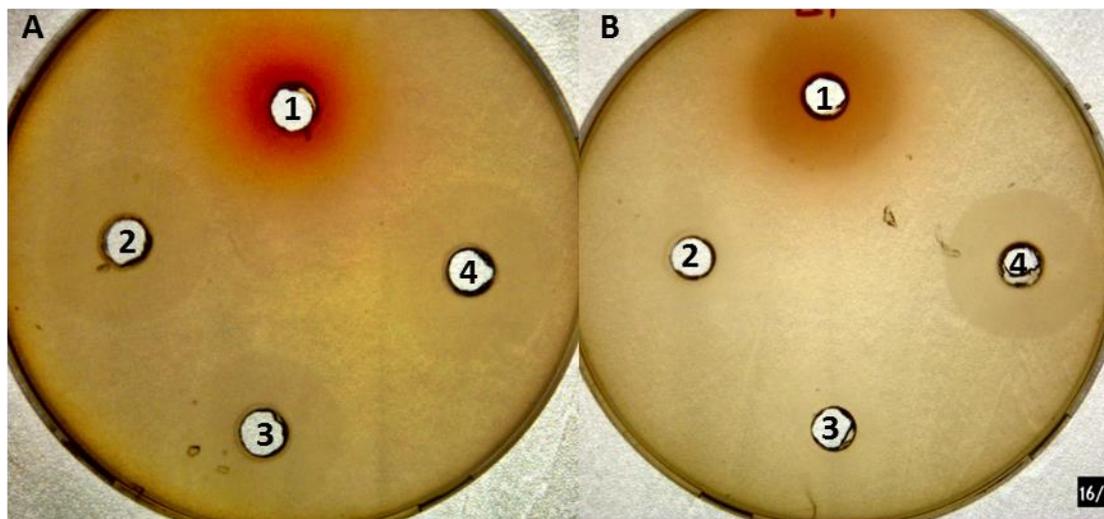


Figura 14: Utilización de diferentes fuentes de Fe^{3+} evaluadas mediante bioensayos. A) *H. seropedicae* Z67 y B) la mutante Z67- $\Delta fhuA$. Se inocularon de manera incorporada 10^8 células de las cepas a estudiar en placas de TY-agar EDDHA 500 μM , previamente crecidas durante 24 horas en 5 ml de TY. Una vez solidificado el medio, se realizaron pocillos de 5 mm en la placa y se agregaron en los mismos 10 μl de las siguientes fuentes nutricionales de hierro: 1) FeCl_3 37 μM ; 2 y 3) Fe^{3+} -serobactina aprox. 300 μM ; y 4) Fe^{3+} -ferricromo 300 μM . Las placas se crecieron durante 24 h a 30 °C.

Pfri es esencial para la producción de serobactinas

La presencia de un factor ECF en la región genómica implicada en la biosíntesis y transporte de serobactinas sugiere que dicho factor podría poseer un papel en la expresión estos genes. Para comprobar esta hipótesis, se construyó una mutante por inserción del casete *lacZaacC1* en el gen *pfri*. Dicha mutante, Z67-*pfri::lacZ*, no fue capaz de producir sideróforos en cantidades detectables en medio CAS (Fig. 15). Este fenotipo pudo ser revertido al salvaje al complementar *in trans* la cepa mutante con un fragmento de 992 pb que contiene el gen *pfri* y 82 pb de la región intergénica de dicho gen con *cirA* (plásmido pCPFRI). Este resultado indica que no existe un efecto polar debido a la inserción del casete *lacZaacC1* sobre los genes corriente abajo de *pfri*.

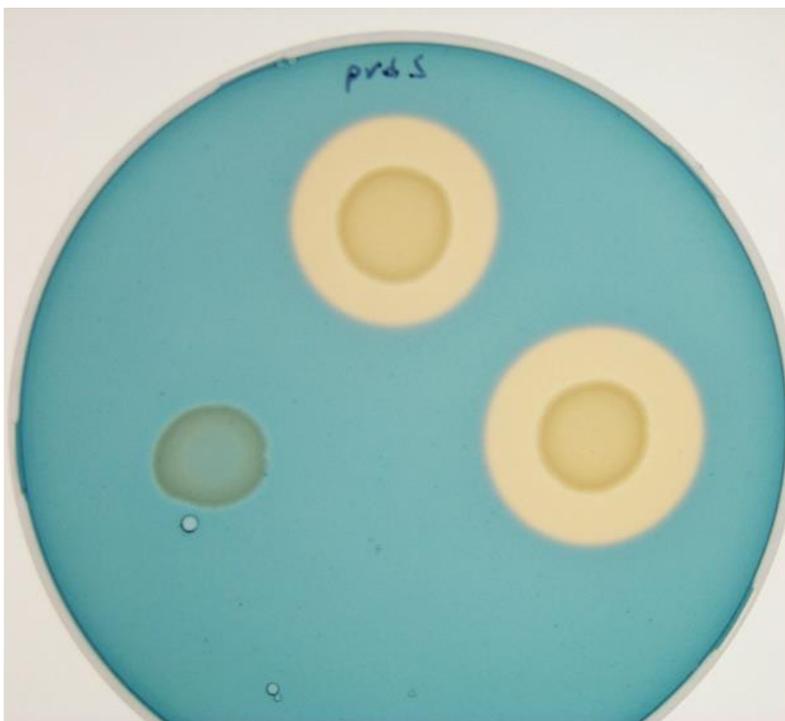


Figura 15: Fenotipo en medio CAS de la cepa salvaje *H. seropedicae* Z67 y de la mutante Z67-*pfri::lacZ*. La cepa salvaje contiene el plásmido pCPP30 y la mutante Z67-*pfri::lacZ* contiene los plásmidos pCPP30 o pCPFRI. Diez microlitros de cultivos primarios en fase exponencial tardía conteniendo aprox. 1×10^6 u.f.c. de cada cepa se colocaron como gota en las placas, dejaron secar y se crecieron durante 48 h a 30 °C.

CirA actúa como un transductor TonB-dependiente

A pesar de no existir evidencia de alguna posible función del producto del gen *cirA*, se construyó una mutante no polar por delección en el mismo. Sorprendentemente, el fenotipo de esta mutante Z67- Δ *cirA* fue de menor producción de serobactinas en medio CAS, observándose un halo aproximadamente tres veces menor que el de la cepa salvaje (Fig. 16). Este fenotipo pudo ser revertido al complementar la mutante con el plásmido pCCIRA+. En este plásmido, el gen *cirA* estaría bajo control del *plac* del pCPP30. El hecho de que la mutante sea no polar y la reversión del fenotipo en la cepa complementante descartan un posible efecto de la mutación sobre la expresión del gen contiguo *pfri* que afectase la producción de serobactinas.

Se ha descrito en otras bacterias que mutantes en transductores TonB-dependientes son complementados si se sobreexpresa el factor ECF asociado a la transducción de señal [116]. Para comprobar si éste era el caso, se complementó la mutante Z67- Δ *cirA* con el plásmido pCPFRI. Como se muestra en la figura 16, efectivamente en la mutante Z67- Δ *cirA* conteniendo el plásmido pCPFRI la producción de halo en medio CAS fue similar al de la cepa salvaje.

Los resultados obtenidos indican que, aunque producido en bajas cantidades CirA actuaría como un transductor de alguna señal, probablemente detectando la presencia del complejo Fe^{3+} -serobactina, activando o liberando una parte de la población intracelular de PfrI, interactuando con algún factor anti- σ desconocido no presente en el contexto genómico analizado.

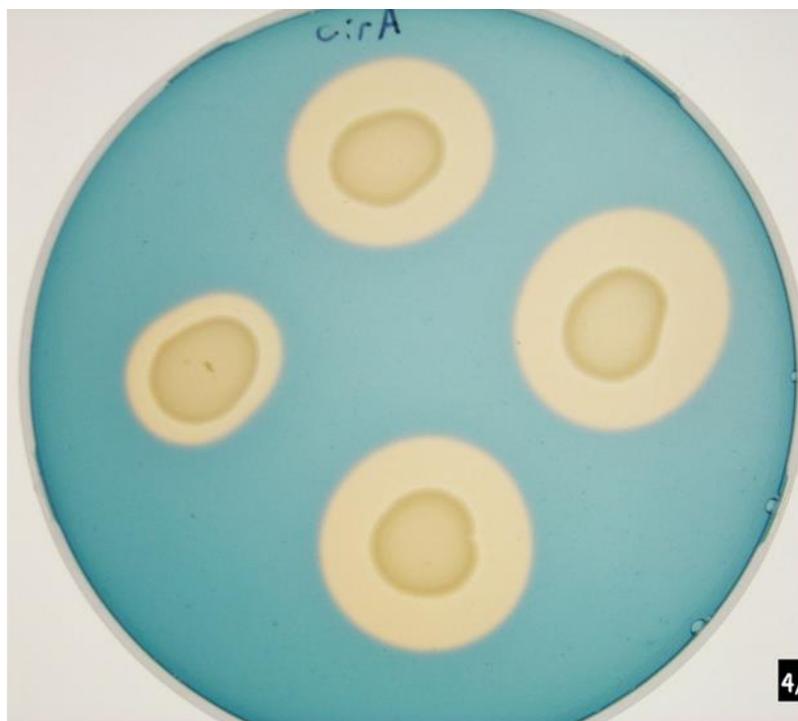


Figura 16: Fenotipo en medio CAS de la cepa salvaje *H. seropedicae* Z67 y la mutante Z67- Δ *cirA*. La cepa salvaje contiene el pCPP30 y la mutante Z67- Δ *cirA* conteniendo los plásmidos pCPP30, pCCIRA o pCPFRI. Diez microlitros de cultivos primarios en fase exponencial tardía conteniendo aprox. 1×10^6 u.f.c. de cada cepa se colocaron como gota en las placas, dejaron secar y se crecieron durante 48 h a 30 °C.

Discusión

En la figura 17 se muestra el modelo propuesto para el transporte y regulación de la producción de serobactinas en base a los resultados de los experimentos realizados, los análisis genómicos y lo descrito para otras bacterias emparentadas o con sistemas similares. Es probable que al igual que en todas las β -Proteobacterias estudiadas, el regulador global de la homeostasis de hierro en *H. seropedicae* sea la proteína FUR. En su genoma existen dos copias de genes anotados como *fur*, el Hsero_0608 y Hsero_4298. Cuando la cepa se encuentra en ambientes con baja disponibilidad de hierro se desreprimiría la expresión de los genes *pfri* y *fhuA*. PfrI activaría la expresión de los genes

de biosíntesis y de *pvdE*. Por su parte, *cirA* se expresaría en forma constitutiva pero basalmente. La presencia de serobactina-Fe³⁺ en el ambiente sería reconocida por CirA liberando una subpoblación de PfrI y permitiría que la producción de serobactinas alcance su máximo. Para consolidar el modelo propuesto, se plantea realizar estudios de la expresión de los genes *cirA*, Hsero_2340, Hsero_2348 y *pvdE* en el contexto de la cepa salvaje y de las mutantes Z67-*pfri*::*lacZ*, Z67- Δ *cirA* y una doble mutante Z67- Δ *cirA* *pfri*::*lacZ*, tanto en presencia como en ausencia de Fe³⁺-serobactina.

Aunque no fue objeto de estudio en esta tesis, la presencia de genes como *pvdE*, Hsero_2348, y la ausencia de genes que codifiquen para un transportador del tipo ABC, sugieren que las serobactinas son secretadas al periplasma a través de PvdE, una vez internalizado el complejo Fe³⁺-serobactina nuevamente al periplasma el producto del gen Hsero_2348, homólogo a reductasas férricas, liberaría el metal por reducción. El Fe²⁺ podría entonces ser internalizado al citoplasma a través de por ejemplo el gen Hsero_0051, anotado como *feoB*, homólogo a transportadores de ion ferroso en otras bacterias [36, 144]. Aunque no existen genes homólogos a *pvdRTompQ* en el contexto genómico estudiado, existen en otras partes del genoma de *H. seropedicae* un total de 8 sistemas homólogos de secreción a PvdRTompQ, por lo que es posible que una vez liberado el metal, las serobactinas sean recicladas al medio extracelular como en el caso de las pioverdinas en *Pseudomonas* spp.

Como lo demuestran los ensayos de complementación con el plásmido pCCIRApr, en un mayor número de copias, la proteína CirA podría actuar como una proteína transportadora. Incluso, la cepa Z67- Δ *fhuA* conteniendo el pCCIRApr posee un mayor crecimiento en medios limitados en hierro y un menor halo (mayor internalización) en medio CAS que la misma mutante conteniendo el pCFHUApr. Dicha diferencia podría explicarse por diferencias en la estabilidad de los mensajeros producidos en las construcciones. Sin embargo, no puede descartarse que CirA sea un receptor más efectivo que FhuA. Como perspectiva de este ensayo, se planea realizar extracción de PMEs esperando identificar a CirA en las cepas que contengan el pCCIRApr.

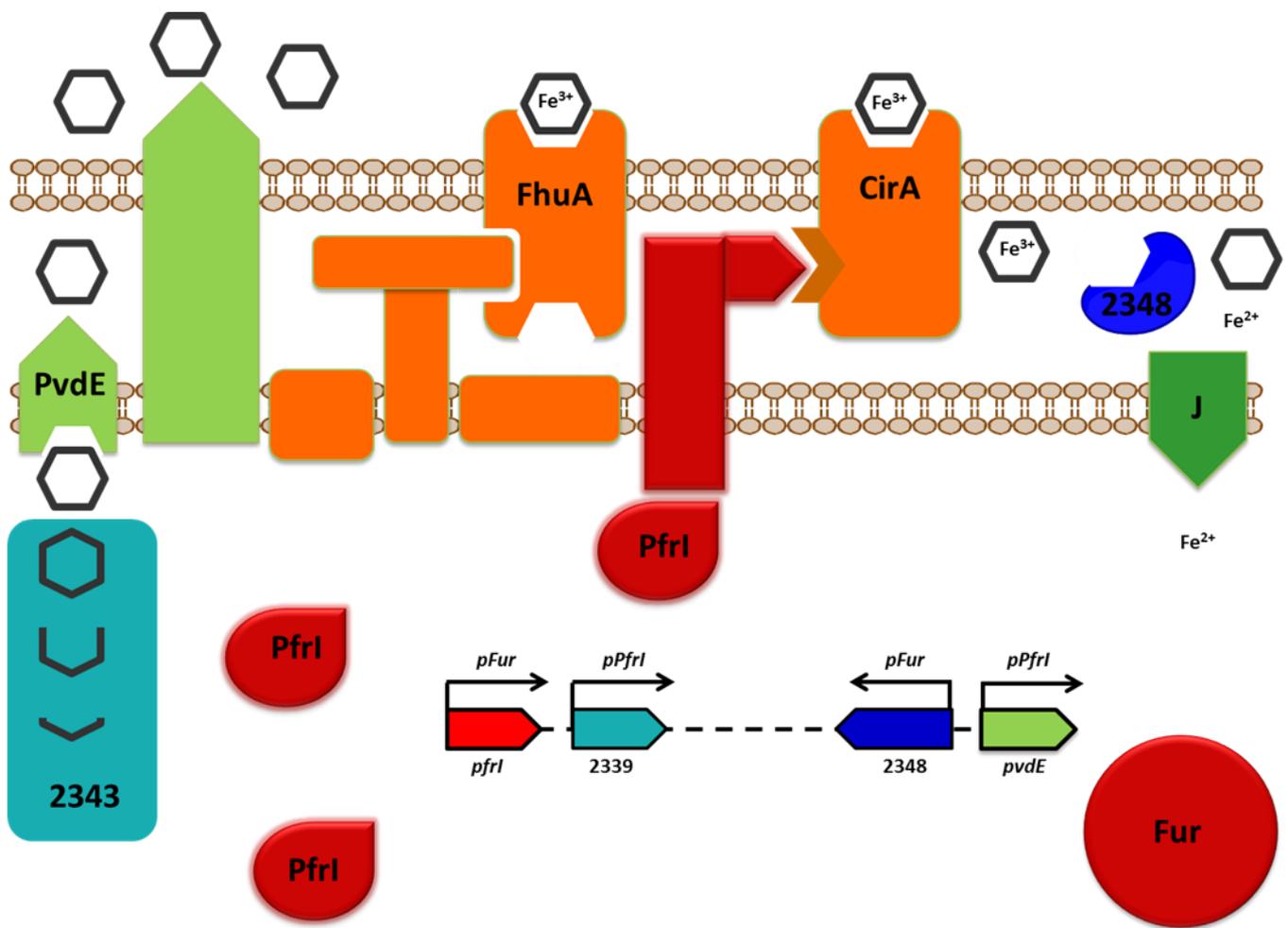


Figura 17: Sistemas de adquisición de hierro mediados por serobactinas en *H. seropedicae*. En condiciones limitantes en hierro, probablemente el regulador global Fur desreprimiría los promotores de los genes *pfrl* y Hsero_2348. Probablemente el gen *fhuA* forme parte del mismo operón que este último. Una parte de la población producida de PfrI se mantendría inactiva asociada a la membrana por un factor anti- σ no identificado. La presencia de Fe³⁺-serobactina en el medio extracelular desencadenaría la activación de esta subpoblación de PfrI mediante el reconocimiento y la transducción de señal del transductor TonB-dependiente CirA, el cuál es expresado en bajo número. La producción de las serobactinas llegaría a su máximo, mediante la acción de la NRP-sintetasa codificada por Hsero_2343 y proteínas accesorias. A su vez, también a través de PfrI, se activaría al máximo la expresión del gen *pvdE*, estando su producto probablemente involucrado en la secreción al periplasma de las serobactinas. El receptor FhuA internaliza el complejo Fe³⁺-serobactina al periplasma mediante interacción con el complejo TonB. La ausencia de un sistema de transporte ABC en el casete genómico de producción de serobactinas podría indicar que el hierro sea obtenido a través de reducción en el periplasma, probablemente mediante acción del producto del gen Hsero_2348.

CAPÍTULO 6: DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

Herbaspirillum seropedicae es uno de los endófitos bacterianos verdaderos del cual se posee un mayor conocimiento a nivel genómico, fisiológico y de interacción con sus hospederos. Es de destacar que inclusive las cepas tipo o de referencia para esta especie son promotoras del crecimiento vegetal, y nuevos aislamientos realizados pertenecientes a este género mostraron ser capaces de promover el crecimiento de diversas gramíneas [128]. En Uruguay, la empresa Lage & Cía comercializa el producto Endorice®, el cual está formulado en base a un aislamiento del género *Herbaspirillum* obtenido de plantíos de arroz en Uruguay [151]. Se ha propuesto también que su capacidad de invasor efectivo de diversas plantas pueda ser explotada utilizando cepas modificadas genéticamente que producen moléculas biocontroladoras [62]. Recientemente se publicó el genoma de la cepa *H. seropedicae* Os45, aislada junto con otras cuatro cepas de *H. seropedicae*, las cuales se describieron como patógenas del cultivar de arroz C2 en China [214]. En vez de ser un desincentivo, estos descubrimientos hacen de la especie *H. seropedicae* un excelente modelo a nivel genómico y funcional, para el estudio de los mecanismos de regulación de las interacciones bacteria-planta, beneficiosas y/o patógenas. Estos estudios podrían comprobar el modelo del balance de antagonismos propuesto para estas interacciones y permitir un mejor manejo de los endófitos con aplicaciones biotecnológicas [174]. Por consiguiente hay gran interés tanto en el ámbito académico como tecnológico para profundizar en el conocimiento de este grupo de bacterias.

Análisis funcional de genes en *H. seropedicae*

Otra ventaja de las bacterias pertenecientes a este género es que son fáciles de manipular genéticamente en el laboratorio empleando herramientas clásicas de biología molecular, lo cual facilita la realización de estudios de genómica funcional y fisiología. Por ejemplo, el uso exitoso de un minitransposón para la construcción de una librería de mutantes fue el paso inicial de este proyecto, permitiendo el desarrollo del mismo. En particular en este trabajo se seleccionaron para su estudio aquellos mutantes que poseían una relación directa con los sistemas de adquisición de hierro. Sin embargo y en forma tangencial a los objetivos específicos propuestos en esta tesis se identificaron también otros mutantes con fenotipos interesantes que ciertamente ameritan una caracterización posterior. Por otra parte, la colección de mutantes generada está almacenada en glicerol 25% a -80°C, por lo que se encuentra disponible para comenzar nuevos estudios. Como ejemplo, existe la perspectiva de estudiar los sistemas de adquisición de citrato férrico en esta

cepa. Partiendo de dicha librería se pueden buscar aquellos mutantes que no crezcan en citrato férrico como fuente nutricional de hierro o aquellos genes que su expresión sea activada por la presencia del compuesto.

Un problema con el cual nos enfrentamos en este trabajo durante los ensayos de mutagénesis dirigida de esta cepa, fue la alta ocurrencia de aparición de mutantes resistentes espontáneos a antibióticos del tipo aminoglucósidos, como la kanamicina y la gentamicina. Primeramente la estrategia de construcción de mutantes se había diseñado en base al vector suicida pK18*mobsac* [166] el cual posee resistencia a kanamicina. Al obtenerse una frecuencia muy elevada de aparición de mutantes espontáneos resistentes al antibiótico se decidió cambiar de estrategia y emplear el vector suicida pWS233 el cual confiere resistencia a tetraciclina lográndose así obtener las mutantes deseadas y estableciendo un protocolo efectivo de mutación para esta cepa. Un proyecto actual del laboratorio consiste en la implementación de los vectores pSEVA [178] como plataforma generalizada para realizar mutagénesis, estudios de regulación transcripcional y post-transcripcional, ensayos de complementación y otros en diferentes bacterias de diversos grupos. Una de las perspectivas es adaptar estos versátiles plásmidos para estudios funcionales en *H. seropedicae*.

La disponibilidad de hierro afecta la fijación de nitrógeno en *H. seropedicae*

En este trabajo de tesis se demostró el efecto de la disponibilidad de hierro sobre la actividad y la expresión de los genes estructurales de la nitrogenasa en *H. seropedicae* Z67. Luego de obtenidos y publicados estos resultados surgió el interés en profundizar en el estudio de los mecanismos implicados en dicha regulación. Basándose en trabajos previos [183] y en la estructura propuesta de la proteína NifA [55, 68, 141, 213] se planteó la siguiente hipótesis: probablemente NifA posea un clúster Fe-S coordinado por cuatro cisteínas esenciales para su función. Al crecer la bacteria en medios con baja disponibilidad de hierro se comprometería la formación de dicho clúster provocando una proteína NifA inactiva. Esto podría explicar la total reducción de la expresión de los genes estructurales de la nitrogenasa en medios con bajo hierro y la disminución parcial de la expresión del propio gen *nifA* de una manera similar a como ocurre en presencia de oxígeno [205]. Para comprobar esta hipótesis se intentó estudiar *in vitro* el efecto de quelantes de metales sobre la actividad de la proteína NifA, mediante ensayos de retardo en gel y de formación de complejo abierto (datos no mostrados). Para ello se utilizó una construcción que sobreexpresa a la proteína NifA truncada en su extremo N-terminal, ya que no se ha conseguido expresar la proteína en su forma nativa [131]. Sin embargo se han logrado obtener pequeñas cantidades de esta proteína

truncada de forma soluble al ser expresada en *E. coli*. A su vez, para obtener la proteína en su forma activa es necesario trabajar en ausencia de O₂ dificultando aún más el trabajo en condiciones de laboratorio. Luego de realizar varios intentos en la mejora de expresión, en las etapas de purificación y ensayos de actividad en condiciones de anaerobiosis no nos fue posible obtener una fracción activa de la proteína. Es curioso notar que a pesar de la importancia e interés de este regulador ningún laboratorio especializado en regulación de la FBN ha publicado trabajos *in vitro* empleando las proteínas NifA sensibles al O₂, concentrándose los trabajos en la realización de ensayos *in vivo*. A pesar del gran interés en dilucidar el mecanismo por el cual la actividad de la proteína NifA se ve afectada por la falta de hierro, teniendo en cuenta las dificultades metodológicas encontradas para responder esta interrogante, se tomó la decisión entonces de no continuar con esta línea y enfocarse en la caracterización de los sistemas de adquisición de hierro.

Los sideróforos producidos por *H. seropedicae* son lipopéptidos fotorreactivos

Siendo la utilización de sideróforos la estrategia más utilizada para la adquisición de hierro en bacterias, dada la importancia demostrada de los mecanismos de adquisición del metal en el proceso de FBN y tomando en cuenta los antecedentes que sugieren la importancia que tienen estos sistemas para los endófitos [114, 177], nos propusimos caracterizar la estructura química de los sideróforos producidos por esta bacteria. De esta manera se identificaron las serobactinas, moléculas no previamente descritas en otras bacterias. Igualmente, la estructura de las serobactinas presentan características compartidas con otros sideróforos producidos por bacterias marinas y un número aún bajo pero creciente de bacterias terrestres [72]: la anfifilicidad y la fotorreactividad del complejo sideróforo-Fe³⁺. Para el caso de las bacterias marinas, se ha sugerido que la característica de anfifilicidad le otorga a los sideróforos la capacidad de generar un gradiente de difusión en el ambiente acuoso en que se encuentran, mientras que no es claro si la fotorreactividad posee algún papel de importancia biológica. En el caso de las bacterias terrestres, se han propuesto dos funciones para la presencia de un ácido graso en la estructura: la primera de ellas sugiere que estas moléculas con propiedades surfactantes ayudarían en el tipo de movimiento “swarming” de las bacterias [135]. En este trabajo no se logró poner a punto un medio en el cual *H. seropedicae* desarrolle un tipo de movimiento “swarming” por lo que esta hipótesis no pudo ser demostrada en esta cepa. Sin embargo, no se detectaron propiedades surfactantes en muestras concentradas de serobactinas, ya que se obtuvo un resultado negativo en el ensayo de colapso de gota usado habitualmente para demostrar las propiedades surfactantes de las moléculas (datos no mostrados) [30]. La segunda función propuesta para la

presencia de colas lipídicas en sideróforos proviene del ejemplo de las pioverdinas. La biosíntesis de estos sideróforos comienza en el citoplasma con un precursor, la ferribactina, el cual posee un ácido graso anclado en la membrana, cumpliendo la función de restringir y localizar la producción de sideróforos, quizás para evitar una libre difusión de las moléculas en el citoplasma y evitar desbalances en la homeostasis del metal [169].

Las cepas de *Herbaspirillum* han demostrado tener un estilo de vida endófito y epífito, por lo que, de producirse las serobactinas en la superficie de la hoja o dentro del tallo, el complejo Fe^{3+} -serobactina sería alcanzado por la irradiación solar. De esta manera, la adquisición de hierro podría darse a través de FhuA, el receptor de las serobactinas, o mediante sistemas de adquisición específicos para el Fe^{2+} . Sin embargo, la reducción del hierro no parecería ser una estrategia muy competitiva frente a otras bacterias, ya que el Fe^{2+} es soluble y por lo tanto altamente disponible para todas las células presentes. Otra explicación es que la fotorreactividad no sea una característica seleccionada evolutivamente si no que lo sean los grupos α -hidroxicarboxilatos, debido quizás a que son más efectivos en rangos de pH ácidos.

Han sido reportados casos donde los sideróforos cumplen más funciones biológicas además de la captación de hierro, por ejemplo en la captación de otros metales o en la tolerancia a metales pesados [108, 171]. Asimismo, se ha demostrado la función de los sideróforos como señales que alteran la expresión génica y el desarrollo morfológico de especies competidoras [194]. Sería interesante estudiar la capacidad de las serobactinas en la adquisición de otros metales, por ejemplo el molibdeno, esencial para la FBN.

Las NRP-Sintetasas son foco de intensas investigaciones realizadas por diferentes laboratorios, debido sobre todo a que son responsables de la biosíntesis de compuestos de interés médico e industrial. Más aún, su lógica de biosíntesis ha impulsado investigaciones donde se manipulan las secuencias u órdenes en los módulos de las líneas de ensamblado de NRPs con el fin de diseñar nuevas moléculas de actividades diferentes o reforzadas [3, 150]. Conociendo únicamente la secuencia aminoacídica de una NRP-Sintetasa se pueden predecir los sustratos que forman parte de la molécula producida, las modificaciones que pueden tener dichos residuos, la configuración estereoquímica de los mismos, y según la naturaleza de los residuos que la componen, su función biológica. Debido a su dependencia en las bases de datos existentes, todos los programas de predicción se vuelven más robustos con los trabajos que caractericen estructuralmente los productos sintetizados por NRP-Sintetasas desconocidas. Además de realizar este aporte a las bases de datos, en este trabajo se demostró que el último dominio C de la NRP-Sintetasa de *H.*

seropedicae, correspondiente al subtipo ^DC_L según la predicción filogenética, no actuaría como tal, quizás debido a la ausencia de un dominio de epimerización asociado al mismo.

Genes homólogos a Hsero_2339, Hsero_2340 y Hsero_2341 están casi siempre presentes y muy cercanos a NRP-Sintetasas responsables de la biosíntesis de compuestos con diferentes actividades. Por otro lado, la producción de sideróforos es muy sencilla de evidenciar en medio CAS. Basados en estas dos características, Charlop-Powers y colaboradores [48] diseñaron una estrategia para enriquecer bibliotecas metagenómicas en clones que contengan NRP-Sintetasas de muestras ambientales. Dicha estrategia consistió en mutar los homólogos al gen Hsero_2340 en *E. coli* y *P. aeruginosa*. Dichas mutantes, incapaces de crecer en un medio limitado en hierro y que no producen un halo característico en medio CAS, fueron utilizadas como hospedadores para una biblioteca metagenómica, seleccionando aquellos clones que revirtieran el fenotipo de crecimiento o el fenotipo en CAS. De esta manera, cuando se empleó la cepa de *E. coli* como hospedadora, el 46 % de los clones de la biblioteca poseían genes homólogos a NRP-Sintetasas, cuando se empleó *P. aeruginosa* se obtuvo un 12 % de clones portadores de NRP-Sintetasas, mientras que por el método clásico sólo el 1 % de los clones obtenidos poseía un gen de este tipo. Podrían entonces utilizarse mutantes de *H. seropedicae* en algunos de estos tres genes como hospedadores de bibliotecas metagenómicas enfocadas a la búsqueda de nuevas NRP-Sintetasas. Para ello deberían desarrollarse vectores del tipo de los fósmidos o cósmidos capaces de replicarse en *H. seropedicae*. Por lo general, las regiones genómicas responsables en la biosíntesis de NRPS son muy grandes, y por lo tanto muy difíciles de pescar enteras en una biblioteca de fósmidos o cósmidos. Igualmente, se están desarrollando técnicas que permitirían re-pescar las secuencias presentes en el ADN genómico o metagenómico para clonarlo en su totalidad en vectores con mayor capacidad de carga [101].

El transporte y la transducción de señal de las serobactinas son realizadas por proteínas diferentes

En este trabajo se demostró que el gen Hsero_2345, anotado como *fhuA*, es el responsable del transporte de las serobactinas, mientras que el gen Hsero_2337, anotado como *cirA*, estaría poco expresado y cumpliría con la función de transducción de señales. Los genomas secuenciados de tres cepas fitopatógenas de *P. syringae* presentan también duplicado el gen *fpvA* que codifica para el receptor de las pioverdinas, y al igual que en *H. seropedicae*, uno de ellos es transductor TonB-dependiente y el otro no, pero ambos genes son contiguos y no separados en distintos operones como en esta cepa [41, 208].

¿Cuál es la razón o ventaja de poseer este sistema modulado de transporte y regulación? Una primera hipótesis es considerar a CirA como una proteína centinela que despertaría la biosíntesis de serobactinas ante la posibilidad de enfrentar condiciones limitantes en hierro. Los diferentes nichos ecológicos donde sobrevive *H. seropedicae* o cualquier endófito, e. g., el suelo inundado o no, la rizósfera, los tejidos internos de las plantas, el aerénquima en el caso del arroz, los tejidos vasculares, la superficie de las hojas, presentan gran variabilidad en la disponibilidad de hierro y competencia por el metal y por lo tanto, las bacterias deben ajustar la homeostasis de hierro mediante diferentes adaptaciones metabólicas. Además, el estilo de vida endófito parecería ser un poco más errante que el de por ejemplo los endosimbiontes de leguminosas. Estos últimos están adaptados para colonizar un huésped específico en un órgano específico, el nódulo, el cual colonizan y se desarrollan hasta la senescencia del mismo para luego reiniciar un ciclo de infección. Los endófitos parecerían dispersarse constantemente entre raíces, tallos, hojas, semillas, suelo, rizósfera sin establecerse definitivamente por mucho tiempo en algunos de esos sitios. En este contexto dinámico, y en un ambiente rico en hierro, *H. seropedicae* mantendría un nivel basal y equivalente de producción de CirA y de PfrI, el cual se mantendría inactivo. La aparición en dicho ambiente de Fe^{3+} -serobactina sería una señal de que, espacial o temporalmente, la disponibilidad de hierro se verá reducida. De esta manera, PfrI unido a CirA se activaría y comenzaría en bajo número, la expresión de los genes de biosíntesis de las serobactinas, dejando a la célula en un estado de alerta, en el cuál la respuesta total frente a una disminución en la disponibilidad del metal, es decir la expresión máxima de los genes de biosíntesis, sea más rápida.

Una segunda hipótesis es considerar al sistema CirA-PfrI como un mecanismo de balance entre la adquisición de hierro y el gasto energético. En medios con baja disponibilidad de hierro se activaría la producción del receptor FhuA y de PfrI, y mediante este factor ECF, la de los genes de biosíntesis de serobactinas. Igualmente la producción de sideróforos no alcanzaría su máximo, debido a que las moléculas de PfrI se encuentran unidas a CirA. Únicamente cuando la célula detecta a través de CirA, la presencia de Fe^{3+} -serobactina, o sea cuando la estrategia de producción de serobactinas es efectiva, la biosíntesis de los sideróforos alcanzaría su máximo.

La acción de CirA como transductor de señales y de PfrI como factor ECF todavía no está completamente demostrada. Para fortalecer el modelo propuesto sería necesario realizar ensayos de expresión de los genes probablemente regulados por PfrI en el contexto de la cepa salvaje y de la mutante, y en presencia o ausencia de Fe^{3+} -serobactina. El fenotipo de la mutante Z67- $\Delta cirA$ también debe ser confirmado mediante ensayos de expresión de los mismos genes. Para realizar

estos experimentos se intentará utilizar aquellos plásmidos de la colección pSEVA anteriormente nombrada, diseñados especialmente para estudios de expresión transcripcional, o (aunque más costosos) realizar ensayos de PCR cuantitativo.

Propuestas y perspectivas

En esta tesis se identificaron nuevas moléculas con actividad de sideróforos las cuales se denominaron serobactinas. Asimismo, se caracterizó funcionalmente la enzima responsable de su biosíntesis, su transportador, un posible transductor y un factor ECF que activa la transcripción de los genes de síntesis. Estas cuatro proteínas son los productos de los genes Hsero_2343, *fhuA*, *cirA* y *pfri*. Demostrada su función y posiblemente su nula o poca participación en otros sistemas de adquisición de hierro diferentes que el mediado por serobactinas, se propone re-annotar estos genes respectivamente como *srbI* (NRP-Sintetasa), *srbA* (receptor), *srbT* (transductor) y *srbS* (factor ECF).

Una vez claramente identificado el sistema de adquisición por hierro mediado por sideróforos en este endófito, la perspectiva inmediata que surge es evaluar la importancia que las serobactinas puedan tener en los mecanismos de colonización, sobrevivencia o competencia de *H. seropedicae* en el interior de las plantas hospederas. Para lograr este objetivo se prevé usar los diferentes mutantes construidos en este trabajo y utilizar cepas marcadas con proteínas fluorescentes para realizar estudios de microscopía de plantas infectadas.

Referencias bibliográficas

1. Abdo, A., Caboche, S., Leclere, V., Jacques, P., y Pupin, M., *A new fingerprint to predict nonribosomal peptides activity*. J Comput Aided Mol Des, 2012. **26**(10): p. 1187-94.
2. Agnoli, K., Lowe, C.A., Farmer, K.L., Husnain, S.I., y Thomas, M.S., *The ornibactin biosynthesis and transport genes of Burkholderia cenocepacia are regulated by an extracytoplasmic function sigma factor which is a part of the Fur regulon*. J Bacteriol, 2006. **188**(10): p. 3631-44.
3. Alexander, D.C., Rock, J., He, X., Brian, P., Miao, V., y Baltz, R.H., *Development of a genetic system for combinatorial biosynthesis of lipopeptides in Streptomyces fradiae and heterologous expression of the A54145 biosynthesis gene cluster*. Appl Environ Microbiol, 2010. **76**(20): p. 6877-87.
4. Amarelle, V., Koziol, U., Rosconi, F., Noya, F., O'Brian, M.R., y Fabiano, E., *A new small regulatory protein, HmuP, modulates haemin acquisition in Sinorhizobium meliloti*. Microbiology, 2010. **156**(Pt 6): p. 1873-82.
5. Andrews, S.C., Robinson, A.K., y Rodriguez-Quinones, F., *Bacterial iron homeostasis*. FEMS Microbiol Rev, 2003. **27**(2-3): p. 215-37.
6. Ansari, M.Z., Yadav, G., Gokhale, R.S., y Mohanty, D., *NRPS-PKS: a knowledge-based resource for analysis of NRPS/PKS megasynthases*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Web Server issue): p. W405-13.
7. Bachmann, B.O. y Ravel, J., *Chapter 8. Methods for in silico prediction of microbial polyketide and nonribosomal peptide biosynthetic pathways from DNA sequence data*. Methods Enzymol, 2009. **458**: p. 181-217.
8. Baldani, J., Baldani, V.L.D., Seldin, L & Döbereiner, J. , *Characterization of Herbaspirillum seropedicae gen. Nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium*. . Int. J. Syst. Bacteriol., 1986 **36**: p. 86-93.
9. Baldani, J.I. y Baldani, V.L.D., *History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience*. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 2005. **77**: p. 549-579.
10. Baldani, V.L.D., Baldani, J.I., y Dobereiner, J., *Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs Herbaspirillum seropedicae and Burkholderia spp.* . Biol. Fertil. Soils. , 2000. . **30**: p. 485-491.
11. Balsanelli, E., Serrato, R.V., de Baura, V.A., Sasaki, G., Yates, M.G., Rigo, L.U., Pedrosa, F.O., de Souza, E.M., y Monteiro, R.A., *Herbaspirillum seropedicae rfbB and rfbC genes are required for maize colonization*. Environ Microbiol, 2010. **12**(8): p. 2233-44.
12. Baltz, R., *Function of MbtH homologs in nonribosomal peptide biosynthesis and applications in secondary metabolite discovery*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2011. **38**(11): p. 1747-1760.
13. Baltz, R.H., Miao, V., y Wrigley, S.K., *Natural products to drugs: daptomycin and related lipopeptide antibiotics*. Nat Prod Rep, 2005. **22**(6): p. 717-41.
14. Barbeau, K., Rue, E.L., Bruland, K.W., y Butler, A., *Photochemical cycling of iron in the surface ocean mediated by microbial iron(III)-binding ligands*. Nature, 2001. **413**(6854): p. 409-13.
15. Barry, S.M. y Challis, G.L., *Recent advances in siderophore biosynthesis*. Curr Opin Chem Biol, 2009. **13**(2): p. 205-15.
16. Bashyam, M.D. y Hasnain, S.E., *The extracytoplasmic function sigma factors: role in bacterial pathogenesis*. Infection, Genetics and Evolution, 2004. **4**(4): p. 301-308.

17. Becker, A., Schmidt, M., Jager, W., y Puhler, A., *New gentamicin-resistance and lacZ promoter-probe cassettes suitable for insertion mutagenesis and generation of transcriptional fusions*. Gene, 1995. **162**(1): p. 37-9.
18. Beringer, J.E., *R factor transfer in Rhizobium leguminosarum*. J Gen Microbiol, 1974. **84**(1): p. 188-98.
19. Bertalan, M., Albano, R., de Padua, V., Rouws, L., Rojas, C., Hemerly, A., Teixeira, K., Schwab, S., Araujo, J., Oliveira, A., Franca, L., Magalhaes, V., Alqueres, S., Cardoso, A., Almeida, W., Loureiro, M.M., Nogueira, E., Cidade, D., Oliveira, D., Simao, T., Macedo, J., Valadao, A., Dreschsel, M., Freitas, F., Vidal, M., Guedes, H., Rodrigues, E., Meneses, C., Brioso, P., Pozzer, L., Figueiredo, D., Montano, H., Junior, J., de Souza Filho, G., Martin Quintana Flores, V., Ferreira, B., Branco, A., Gonzalez, P., Guillobel, H., Lemos, M., Seibel, L., Alves-Ferreira, M., Sachetto-Martins, G., Coelho, A., Santos, E., Amaral, G., Neves, A., Pacheco, A.B., Carvalho, D., Lery, L., Bisch, P., Rossle, S.C., Urményi, T., Rael Pereira, A., Silva, R., Rondinelli, E., von Kruger, W., Martins, O., Baldani, J.I., y Ferreira, P.C., *Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte Gluconacetobacter diazotrophicus Pal5*. BMC Genomics, 2009. **10**: p. 450.
20. Bertani, G., *Studies on lysogeny. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli*. J Bacteriol, 1951. **62**(3): p. 293-300.
21. Berti, A.D., Greve, N.J., Christensen, Q.H., y Thomas, M.G., *Identification of a biosynthetic gene cluster and the six associated lipopeptides involved in swarming motility of Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000*. J Bacteriol, 2007. **189**(17): p. 6312-23.
22. Bhattacharjee, R., Singh, A., y Mukhopadhyay, S.N., *Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008. **80**(2): p. 199-209.
23. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
24. Braun, V. y Endriss, F., *Energy-coupled outer membrane transport proteins and regulatory proteins*. Biometals, 2007. **20**(3-4): p. 219-31.
25. Braun, V., Mahren, S., y Sauter, A., *Gene Regulation by Transmembrane Signaling*. Biometals, 2005. **18**(5): p. 507-517.
26. Brooks, B.E. y Buchanan, S.K., *Signaling mechanisms for activation of extracytoplasmic function (ECF) sigma factors*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2008. **1778**(9): p. 1930-1945.
27. Brusamarello-Santos, L.C.C., Pacheco, F., Aljanabi, S.M.M., Monteiro, R.A., Cruz, L.M., Baura, V.A., Pedrosa, F.O., Souza, E.M., y Wassem, R., *Differential gene expression of rice roots inoculated with the diazotroph Herbaspirillum seropedicae*. Plant and Soil, 2012. **356**(1-2): p. 113-125.
28. Budzikiewicz, H., *Siderophores from Bacteria and from Fungi*, en *Iron Uptake and Homeostasis in Microorganisms*, P. Cornelis y S.C. Andrews, Editors. 2010, Caister Academic Press. p. 1-16.
29. Bumpus, S.B. y Kelleher, N.L., *Accessing natural product biosynthetic processes by mass spectrometry*. Current Opinion in Chemical Biology, 2008. **12**(5): p. 475-482.
30. Burch, A.Y., Browne, P.J., Dunlap, C.A., Price, N.P., y Lindow, S.E., *Comparison of biosurfactant detection methods reveals hydrophobic surfactants and contact-regulated production*. Environ Microbiol, 2011. **13**(10): p. 2681-91.
31. Butler, A. y Theisen, R.M., *Iron(III)-siderophore coordination chemistry: Reactivity of marine siderophores*. Coord Chem Rev, 2010. **254**(3-4): p. 288-296.
32. Buttner, D. y He, S.Y., *Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria*. Plant Physiol, 2009. **150**(4): p. 1656-64.

33. Caboche, S., Leclere, V., Pupin, M., Kucherov, G., y Jacques, P., *Diversity of monomers in nonribosomal peptides: towards the prediction of origin and biological activity*. J Bacteriol, 2010. **192**(19): p. 5143-50.
34. Caboche, S., Pupin, M., Leclere, V., Fontaine, A., Jacques, P., y Kucherov, G., *NORINE: a database of nonribosomal peptides*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(Database issue): p. D326-31.
35. Caboche, S., Pupin, M., Leclere, V., Jacques, P., y Kucherov, G., *Structural pattern matching of nonribosomal peptides*. BMC Struct Biol, 2009. **9**: p. 15.
36. Cartron, M.L., Maddocks, S., Gillingham, P., Craven, C.J., y Andrews, S.C., *Feo--transport of ferrous iron into bacteria*. Biometals, 2006. **19**(2): p. 143-57.
37. Catalán, A.I., Ferreira, F., Gill, P.R., y Batista, S., *Production of polyhydroxyalkanoates by Herbaspirillum seropedicae grown with different sole carbon sources and on lactose when engineered to express the lacZlacY genes*. Enzyme and Microbial Technology, 2007. **40**(5): p. 1352-1357.
38. Cavalcante, J.J., Vargas, C., Nogueira, E.M., Vinagre, F., Schwarcz, K., Baldani, J.I., Ferreira, P.C., y Hemerly, A.S., *Members of the ethylene signalling pathway are regulated in sugarcane during the association with nitrogen-fixing endophytic bacteria*. J Exp Bot, 2007. **58**(3): p. 673-86.
39. Compant, S., Clément, C., y Sessitsch, A., *Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization*. Soil Biology and Biochemistry, 2010. **42**(5): p. 669-678.
40. Conn, V.M. y Franco, C.M., *Effect of microbial inoculants on the indigenous actinobacterial endophyte population in the roots of wheat as determined by terminal restriction fragment length polymorphism*. Appl Environ Microbiol, 2004. **70**(11): p. 6407-13.
41. Cornelis, P., *Iron uptake and metabolism in pseudomonads*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010. **86**(6): p. 1637-45.
42. Cornelis, P. y Andrews, S.C., *Iron Uptake and Homeostasis in Microorganisms*. 2010: Caister Academic Press.
43. Cornelis, P., Matthijs, S., y Van Oeffelen, L., *Iron uptake regulation in Pseudomonas aeruginosa*. Biometals, 2009. **22**(1): p. 15-22.
44. Crosa, J.H., Mey, A.R., y Payne, S.M., *Iron Transport in Bacteria*. 2004: ASM Press.
45. Challis, G.L., *A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases*. Chembiochem, 2005. **6**(4): p. 601-11.
46. Challis, G.L., *Mining microbial genomes for new natural products and biosynthetic pathways*. Microbiology, 2008. **154**(Pt 6): p. 1555-69.
47. Challis, G.L., Ravel, J., y Townsend, C.A., *Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains*. Chem Biol, 2000. **7**(3): p. 211-24.
48. Charlop-Powers, Z., Banik, J.J., Owen, J.G., Craig, J.W., y Brady, S.F., *Selective enrichment of environmental DNA libraries for genes encoding nonribosomal peptides and polyketides by phosphopantetheine transferase-dependent complementation of siderophore biosynthesis*. ACS Chem Biol, 2013. **8**(1): p. 138-43.
49. Chatfield, C.H., Mulhern, B.J., Viswanathan, V.K., y Cianciotto, N.P., *The major facilitator superfamily-type protein LbtC promotes the utilization of the legiobactin siderophore by Legionella pneumophila*. Microbiology, 2012. **158**(Pt 3): p. 721-35.
50. Chaves, D.F., de Souza, E.M., Monteiro, R.A., y de Oliveira Pedrosa, F., *A two-dimensional electrophoretic profile of the proteins secreted by Herbaspirillum seropedicae strain Z78*. J Proteomics, 2009. **73**(1): p. 50-6.

51. Chaves, D.F., Ferrer, P.P., de Souza, E.M., Gruz, L.M., Monteiro, R.A., y de Oliveira Pedrosa, F., *A two-dimensional proteome reference map of Herbaspirillum seropedicae proteins*. Proteomics, 2007. **7**(20): p. 3759-63.
52. Chimento, D.P., Kadner, R.J., y Wiener, M.C., *Comparative structural analysis of TonB-dependent outer membrane transporters: implications for the transport cycle*. Proteins, 2005. **59**(2): p. 240-51.
53. Chooi, Y.H. y Tang, Y., *Adding the lipo to lipopeptides: do more with less*. Chem Biol, 2010. **17**(8): p. 791-3.
54. Chu, B.C., Garcia-Herrero, A., Johanson, T.H., Krewulak, K.D., Lau, C.K., Peacock, R.S., Slavinskaya, Z., y Vogel, H.J., *Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view*. Biometals, 2010. **23**(4): p. 601-11.
55. Chubatsu, L., Monteiro, R., Souza, E., Oliveira, M., Yates, M., Wassem, R., Bonatto, A., Huergo, L., Steffens, M., Rigo, L., y Pedrosa, F.d., *Nitrogen fixation control in Herbaspirillum seropedicae*. Plant and Soil, 2012. **356**(1-2): p. 197-207.
56. Delany, I., Rappuoli, R., y Scarlato, V., *Fur functions as an activator and as a repressor of putative virulence genes in Neisseria meningitidis*. Mol Microbiol, 2004. **52**(4): p. 1081-90.
57. Delany, I., Spohn, G., Rappuoli, R., y Scarlato, V., *The Fur repressor controls transcription of iron-activated and -repressed genes in Helicobacter pylori*. Mol Microbiol, 2001. **42**(5): p. 1297-309.
58. Delany, I., Spohn, G., Rappuoli, R., y Scarlato, V., *An anti-repression Fur operator upstream of the promoter is required for iron-mediated transcriptional autoregulation in Helicobacter pylori*. Mol Microbiol, 2003. **50**(4): p. 1329-38.
59. Dilworth, M.J., *Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from Clostridium pasteurianum*. . Biochim Biophys Acta 1966. . **127**: p. 285-94.
60. Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D., y Helinski, D.R., *Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of Rhizobium meliloti*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(12): p. 7347-51.
61. Dixon, R. y Kahn, D., *Genetic regulation of biological nitrogen fixation*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(8): p. 621-31.
62. Downing, K.J., Leslie, G., y Thomson, J.A., *Biocontrol of the sugarcane borer Eldana saccharina by expression of the Bacillus thuringiensis cry1Ac7 and Serratia marcescens chiA genes in sugarcane-associated bacteria*. Appl Environ Microbiol, 2000. **66**(7): p. 2804-10.
63. Edgar, R.C., *MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput*. Nucleic acids research, 2004. **32**(5): p. 1792-1797.
64. Elbeltagy, A., Nishioka, K., Sato, T., Suzuki, H., Ye, B., Hamada, T., Isawa, T., Mitsui, H., y Minamisawa, K., *Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a Herbaspirillum sp. isolated from wild rice species*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(11): p. 5285-93.
65. Ferrando, L., Fernandez Manay, J., y Fernandez Scavino, A., *Molecular and culture-dependent analyses revealed similarities in the endophytic bacterial community composition of leaves from three rice (Oryza sativa) varieties*. FEMS Microbiol Ecol, 2012. **80**(3): p. 696-708.
66. Finn, R.D., Mistry, J., Tate, J., Coggill, P., Heger, A., Pollington, J.E., Gavin, O.L., Gunasekaran, P., Ceric, G., Forslund, K., Holm, L., Sonnhammer, E.L., Eddy, S.R., y Bateman, A., *The Pfam protein families database*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(Database issue): p. D211-22.
67. Fischer, H.M., *Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia*. Microbiol Rev, 1994. **58**(3): p. 352-86.

68. Fischer, H.M., Bruderer, T., y Hennecke, H., *Essential and non-essential domains in the Bradyrhizobium japonicum NifA protein: identification of indispensable cysteine residues potentially involved in redox reactivity and/or metal binding*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(5): p. 2207-24.
69. Franche, C., Lindström, K., y Elmerich, C., *Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants*. Plant and Soil, 2009. **321**(1-2): p. 35-59.
70. Franza, T. y Expert, D., *Iron Uptake in Soft Rot Erwinia*, en *Iron Uptake and Homeostasis in Microorganisms*, P. Cornelis y S.C. Andrews, Editors. 2010, Caister Academic Press. p. 101-115.
71. Gatsos, X., Perry, A.J., Anwari, K., Dolezal, P., Wolynec, P.P., Likić, V.A., Purcell, A.W., Buchanan, S.K., y Lithgow, T., *Protein secretion and outer membrane assembly in Alphaproteobacteria*. FEMS Microbiology Reviews, 2008. **32**(6): p. 995-1009.
72. Gauglitz, J.M. y Butler, A., *Amino acid variability in the peptide composition of a suite of amphiphilic peptide siderophores from an open ocean Vibrio species*. J Biol Inorg Chem, 2013.
73. Glick, B.R., *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications*. Scientifica, 2012. **2012**: p. 15.
74. Goss, T.J., Perez-Matos, A., y Bender, R.A., *Roles of glutamate synthase, gltBD, and gltF in nitrogen metabolism of Escherichia coli and Klebsiella aerogenes*. J Bacteriol, 2001. **183**(22): p. 6607-19.
75. Gruber, N. y Galloway, J.N., *An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle*. Nature, 2008. **451**(7176): p. 293-6.
76. Grunewald, J. y Marahiel, M.A., *Chemoenzymatic and template-directed synthesis of bioactive macrocyclic peptides*. Microbiol Mol Biol Rev, 2006. **70**(1): p. 121-46.
77. Gyaneshwar, P., James, E.K., Reddy, P.M., y Ladha, J.K., *Herbaspirillum colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties*. New Phytologist, 2002. **154**(1): p. 131-145.
78. Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F., and Kloepper, J.W., *Bacterial endophytes in agricultural crops*. Can. J. Microbiol., 1997. **43**: p. 895-914.
79. Hannauer, M., Braud, A., Hoegy, F., Ronot, P., Boos, A., y Schalk, I.J., *The PvdRT-OpmQ efflux pump controls the metal selectivity of the iron uptake pathway mediated by the siderophore pyoverdine in Pseudomonas aeruginosa*. Environ Microbiol, 2012. **14**(7): p. 1696-708.
80. Hardoim, P.R., van Overbeek, L.S., y Elsas, J.D., *Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth*. Trends Microbiol, 2008. **16**(10): p. 463-71.
81. Hayes, F., *Transposon-based strategies for microbial functional genomics and proteomics*. Annu Rev Genet, 2003. **37**: p. 3-29.
82. Hennig, K. y Villforth, F., *Experimentelle untersuchungen zur frage der bakterien- symbiose in höheren pflanzen und ihrer beeinflussung durch leitelemente*. Biochem. Z., 1940. **305**: p. 299-309.
83. Herrero, M., de Lorenzo, V., y Timmis, K.N., *Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria*. J Bacteriol, 1990. **172**(11): p. 6557-67.
84. Hibbing, M.E., Fuqua, C., Parsek, M.R., y Peterson, S.B., *Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle*. Nat Rev Microbiol, 2010. **8**(1): p. 15-25.
85. Hider, R.C. y Kong, X., *Chemistry and biology of siderophores*. Nat Prod Rep, 2010. **27**(5): p. 637-57.

86. Higgs, P.I., Larsen, R.A., y Postle, K., *Quantification of known components of the Escherichia coli TonB energy transduction system: TonB, ExbB, ExbD and FepA*. *Molecular Microbiology*, 2002. **44**(1): p. 271-281.
87. Ho, T.D. y Ellermeier, C.D., *Extra cytoplasmic function sigma factor activation*. *Curr Opin Microbiol*, 2012. **15**(2): p. 182-8.
88. Homann, V.V., Sandy, M., Tincu, J.A., Templeton, A.S., Tebo, B.M., y Butler, A., *Loihichelins A-F, a suite of amphiphilic siderophores produced by the marine bacterium Halomonas LOB-5*. *J Nat Prod*, 2009. **72**(5): p. 884-8.
89. Hu, Y. y Ribbe, M.W., *Nitrogenase assembly*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, (0).
90. Huang, H.C., He, S.Y., Bauer, D.W., y Collmer, A., *The Pseudomonas syringae pv. syringae 61 hrpH product, an envelope protein required for elicitation of the hypersensitive response in plants*. *J Bacteriol*, 1992. **174**(21): p. 6878-85.
91. Inceoğlu, Ö., Al-Soud, W.A., Salles, J.F., Semenov, A.V., y van Elsas, J.D., *Comparative Analysis of Bacterial Communities in a Potato Field as Determined by Pyrosequencing*. *PLoS One*, 2011. **6**(8): p. e23321.
92. James, E.K., *Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis*. *Field Crops Research*, 2000. **65**(2-3): p. 197-209.
93. James, E.K., Gyaneshwar, P., Mathan, N., Barraquio, W.L., Reddy, P.M., Iannetta, P.P., Olivares, F.L., y Ladha, J.K., *Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium Herbaspirillum seropedicae Z67*. *Mol Plant Microbe Interact*, 2002. **15**(9): p. 894-906.
94. James, E.K. y Olivares, F., *Infection and Colonization of Sugar Cane and Other Gramineous Plants by Endophytic Diazotrophs*. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1998. **17**(1): p. 77-119.
95. James, E.K., Olivares, F.L., Baldani, J.I., y Döbereiner, J., *Herbaspirillum, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue 3Sorghum bicolor L. Moench*. *Journal of Experimental Botany*, 1997. **48**(3): p. 785-798.
96. James, E.K., P. Gyaneshwar, N. Mathan, W. L. Barraquio, P. M. Reddy, P. P. Iannetta, F. L. Olivares, and J. K. Ladha. , *Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium Herbaspirillum seropedicae Z67*. . *Mol Plant Microbe Interact* 2002 **15**: p. 894-906.
97. Jenke-Kodama, H. y Dittmann, E., *Bioinformatic perspectives on NRPS/PKS megasynthases: advances and challenges*. *Nat Prod Rep*, 2009. **26**(7): p. 874-83.
98. Jones, A.M. y Wildermuth, M.C., *The phytopathogen Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 has three high-affinity iron-scavenging systems functional under iron limitation conditions but dispensable for pathogenesis*. *J Bacteriol*, 2011. **193**(11): p. 2767-75.
99. Joyner, D.C. y Lindow, S.E., *Heterogeneity of iron bioavailability on plants assessed with a whole-cell GFP-based bacterial biosensor*. *Microbiology*, 2000. **146 (Pt 10)**: p. 2435-45.
100. Kazmierczak, M.J., Wiedmann, M., y Boor, K.J., *Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2005. **69**(4): p. 527-43.
101. Kim, J.H., Feng, Z., Bauer, J.D., Kallifidas, D., Calle, P.Y., y Brady, S.F., *Cloning large natural product gene clusters from the environment: piecing environmental DNA gene clusters back together with TAR*. *Biopolymers*, 2010. **93**(9): p. 833-44.
102. Klassen G, Pedrosa FO, Souza EM, S, F., y LU, R., *Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in Herbaspirillum seropedicae SMR1*. *Can J Microbiol*, 1997. **43**: p. 887-891.
103. Klassen, G., de Oliveira Pedrosa, F., de Souza, E.M., Yates, M.G., y Rigo, L.U., *Nitrogenase activity of Herbaspirillum seropedicae grown under low iron levels requires the products of nifXorf1 genes*. *FEMS Microbiol Lett*, 2003. **224**(2): p. 255-9.

104. Klassen, G., Pedrosa, F.O., Souza, E.M., Yates, M.G., y Rigo, L.U., *Sequencing and functional analysis of the nifENXorf1orf2 gene cluster of Herbaspirillum seropedicae*. FEMS Microbiol Lett, 1999. **181**(1): p. 165-70.
105. Koebnik, R., *TonB-dependent trans-envelope signalling: the exception or the rule?* Trends in Microbiology, 2005. **13**(8): p. 343-347.
106. Kopp, F., Grunewald, J., Mahlert, C., y Marahiel, M.A., *Chemoenzymatic design of acidic lipopeptide hybrids: new insights into the structure-activity relationship of daptomycin and A54145*. Biochemistry, 2006. **45**(35): p. 10474-81.
107. Koziol, U., Hannibal, L., Rodriguez, M.C., Fabiano, E., Kahn, M.L., y Noya, F., *Deletion of citrate synthase restores growth of Sinorhizobium meliloti 1021 aconitase mutants*. J Bacteriol, 2009. **191**(24): p. 7581-6.
108. Kraepiel, A.M., Bellenger, J.P., Wichard, T., y Morel, F.M., *Multiple roles of siderophores in free-living nitrogen-fixing bacteria*. Biometals, 2009. **22**(4): p. 573-81.
109. Kreutzer, M.F., Kage, H., y Nett, M., *Structure and Biosynthetic Assembly of Cupriachelin, a Photoreactive Siderophore from the Bioplastic Producer Cupriavidus necator H16*. J Am Chem Soc, 2012.
110. Kreutzer, M.F. y Nett, M., *Genomics-driven discovery of taiwachelin, a lipopeptide siderophore from Cupriavidus taiwanensis*. Org Biomol Chem, 2012. **10**(47): p. 9338-43.
111. Krewulak, K.D. y Vogel, H.J., *TonB or not TonB: is that the question?* Biochem Cell Biol, 2011. **89**(2): p. 87-97.
112. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
113. Leoni, L., Orsi, N., de Lorenzo, V., y Visca, P., *Functional analysis of PvdS, an iron starvation sigma factor of Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol, 2000. **182**(6): p. 1481-91.
114. Loaces, I., Ferrando, L., y Scavino, A.F., *Dynamics, diversity and function of endophytic siderophore-producing bacteria in rice*. Microb Ecol, 2011. **61**(3): p. 606-18.
115. Llamas, M.A. y Bitter, W., *Iron gate: the translocation system*. J Bacteriol, 2006. **188**(9): p. 3172-4.
116. Llamas, M.A., Mooij, M.J., Sparrius, M., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Ratledge, C., y Bitter, W., *Characterization of five novel Pseudomonas aeruginosa cell-surface signalling systems*. Mol Microbiol, 2008. **67**(2): p. 458-72.
117. Mano, H. y Morisaki, H., *Endophytic bacteria in the rice plant*. Microbes Environ, 2008. **23**(2): p. 109-17.
118. Marin, A.M., Souza, E.M., Pedrosa, F.O., Souza, L.M., Sasaki, G.L., Baura, V.A., Yates, M.G., Wasseem, R., y Monteiro, R.A., *Naringenin degradation by the endophytic diazotroph Herbaspirillum seropedicae SmR1*. Microbiology, 2013. **159**(Pt 1): p. 167-75.
119. Markowitz, V.M., Chen, I.M., Palaniappan, K., Chu, K., Szeto, E., Grechkin, Y., Ratner, A., Anderson, I., Lykidis, A., Mavromatis, K., Ivanova, N.N., y Kyrpides, N.C., *The integrated microbial genomes system: an expanding comparative analysis resource*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(Database issue): p. D382-90.
120. Martinez, J.S., Zhang, G.P., Holt, P.D., Jung, H.T., Carrano, C.J., Haygood, M.G., y Butler, A., *Self-assembling amphiphilic siderophores from marine bacteria*. Science, 2000. **287**(5456): p. 1245-7.
121. Masse, E. y Arguin, M., *Ironing out the problem: new mechanisms of iron homeostasis*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(8): p. 462-8.
122. Matthijs, S., Budzikiewicz, H., Schafer, M., Wathélet, B., y Cornelis, P., *Ornicorrugatin, a new siderophore from Pseudomonas fluorescens AF76*. Z Naturforsch C, 2008. **63**(1-2): p. 8-12.

123. Merrick, M.J., *Regulation of Nitrogen Fixation in Free-Living Diazotrophs*, en *Genetics and Regulation of Nitrogen Fixation in Free-Living Bacteria*, W. Klipp, et al., Editors. 2005, Springer Netherlands. p. 197-223.
124. Miethke, M., *Molecular strategies of microbial iron assimilation: from high-affinity complexes to cofactor assembly systems*. *Metallomics*, 2013. **5**(1): p. 15-28.
125. Miethke, M. y Marahiel, M.A., *Siderophore-based iron acquisition and pathogen control*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2007. **71**(3): p. 413-51.
126. Miller, K.I., Qing, C., Sze, D.M., y Neilan, B.A., *Investigation of the biosynthetic potential of endophytes in traditional Chinese anticancer herbs*. *PLoS One*, 2012. **7**(5): p. e35953.
127. Miller, K.I., Qing, C., Sze, D.M., Roufogalis, B.D., y Neilan, B.A., *Culturable endophytes of medicinal plants and the genetic basis for their bioactivity*. *Microb Ecol*, 2012. **64**(2): p. 431-49.
128. Monteiro, R., Balsanelli, E., Wassem, R., Marin, A., Brusamarello-Santos, L.C., Schmidt, M., Tadra-Sfeir, M., Pankiewicz, V.S., Cruz, L., Chubatsu, L., Pedrosa, F., y Souza, E., *Herbaspirillum-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects*. *Plant and Soil*, 2012. **356**(1-2): p. 175-196.
129. Monteiro, R.A., de Souza, E.M., Yates, M.G., Pedrosa, F.O., y Chubatsu, L.S., *Fnr is involved in oxygen control of Herbaspirillum seropedicae N-truncated NifA protein activity in Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2003. **69**(3): p. 1527-31.
130. Monteiro, R.A., Schmidt, M.A., Baura, V.A.d., Balsanelli, E., Wassem, R., Yates, M.G., Randi, M.A.F., Pedrosa, F.O., y Souza, E.M.d., *Early colonization pattern of maize (Zea mays L. Poales, Poaceae) roots by Herbaspirillum seropedicae (Burkholderiales, Oxalobacteraceae)*. *Genetics and Molecular Biology*, 2008. **31**: p. 932-937.
131. Monteiro, R.A., Souza, E.M., Funayama, S., Yates, M.G., Pedrosa, F.O., y Chubatsu, L.S., *Expression and functional analysis of an N-truncated NifA protein of Herbaspirillum seropedicae*. *FEBS Lett*, 1999. **447**(2-3): p. 283-6.
132. Monteiro, R.A., Souza, E.M., Geoffrey Yates, M., Steffens, M.B., Pedrosa, F.O., y Chubatsu, L.S., *Expression, purification, and functional analysis of the C-terminal domain of Herbaspirillum seropedicae NifA protein*. *Protein Expr Purif*, 2003. **27**(2): p. 313-8.
133. Mulley, G., White, J.P., Karunakaran, R., Prell, J., Bourdes, A., Bunnewell, S., Hill, L., y Poole, P.S., *Mutation of GOGAT prevents pea bacteroid formation and N₂ fixation by globally downregulating transport of organic nitrogen sources*. *Mol Microbiol*, 2011. **80**(1): p. 149-67.
134. Nikolouli, K. y Mossialos, D., *Bioactive compounds synthesized by non-ribosomal peptide synthetases and type-I polyketide synthases discovered through genome-mining and metagenomics*. *Biotechnol Lett*, 2012.
135. Nogales, J., Dominguez-Ferreras, A., Amaya-Gomez, C.V., van Dillewijn, P., Cuellar, V., Sanjuan, J., Olivares, J., y Soto, M.J., *Transcriptome profiling of a Sinorhizobium meliloti fadD mutant reveals the role of rhizobactin 1021 biosynthesis and regulation genes in the control of swarming*. *BMC Genomics*, 2010. **11**: p. 157.
136. Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T.J., y Buchanan, S.K., *TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function*. *Annu Rev Microbiol*, 2010. **64**: p. 43-60.
137. Noindorf, L., Bonatto, A.C., Monteiro, R.A., Souza, E.M., Rigo, L.U., Pedrosa, F.O., Steffens, M.B., y Chubatsu, L.S., *Role of PII proteins in nitrogen fixation control of Herbaspirillum seropedicae strain SmR1*. *BMC Microbiol*, 2011. **11**: p. 8.
138. Noindorf, L., Rego, F.G., Baura, V.A., Monteiro, R.A., Wassem, R., Cruz, L.M., Rigo, L.U., Souza, E.M., Steffens, M.B., Pedrosa, F.O., y Chubatsu, L.S., *Characterization of the orf1glnKamtB operon of Herbaspirillum seropedicae*. *Arch Microbiol*, 2006. **185**(1): p. 55-62.

139. Noya, F., Arias, A., y Fabiano, E., *Heme compounds as iron sources for nonpathogenic Rhizobium bacteria*. J Bacteriol, 1997. **179**(9): p. 3076-8.
140. O'Brian, M.R. y Fabiano, E.R., *Mechanisms and Regulation of Iron Homeostasis in the Rhizobia*, en *Iron Uptake and Homeostasis in Microorganisms*, P. Cornelis y S.C. Andrews, Editors. 2010, Caister Academic Press. p. 37-63.
141. Oliveira, M.A., Baura, V.A., Aquino, B., Huergo, L.F., Kadowaki, M.A., Chubatsu, L.S., Souza, E.M., Dixon, R., Pedrosa, F.O., Wassem, R., y Monteiro, R.A., *Role of conserved cysteine residues in Herbaspirillum seropedicae NifA activity*. Res Microbiol, 2009. **160**(6): p. 389-95.
142. Page, W.J., Kwon, E., Cornish, A.S., y Tindale, A.E., *The csbX gene of Azotobacter vinelandii encodes an MFS efflux pump required for catecholate siderophore export*. FEMS Microbiol Lett, 2003. **228**(2): p. 211-6.
143. Paget, M.S. y Helmann, J.D., *The sigma70 family of sigma factors*. Genome Biol, 2003. **4**(1): p. 203.
144. Pandey, A. y Sonti, R.V., *Role of the FeoB protein and siderophore in promoting virulence of Xanthomonas oryzae pv. oryzae on rice*. J Bacteriol, 2010. **192**(12): p. 3187-203.
145. Payne, S.M. y Mey, A.R., *Iron uptake in Shigella and Escherichia coli*, en *Iron Uptake and Homeostasis in Microorganisms*, P. Cornelis y S.C. Andrews, Editors. 2010, Caister Academic Press. p. 87-100.
146. Pedrosa, F.O., Monteiro, R.A., Wassem, R., Cruz, L.M., Ayub, R.A., Colauto, N.B., Fernandez, M.A., Fungaro, M.H., Grisard, E.C., Hungria, M., Madeira, H.M., Nodari, R.O., Osaku, C.A., Petzl-Erler, M.L., Terenzi, H., Vieira, L.G., Steffens, M.B., Weiss, V.A., Pereira, L.F., Almeida, M.I., Alves, L.R., Marin, A., Araujo, L.M., Balsanelli, E., Baura, V.A., Chubatsu, L.S., Faoro, H., Favetti, A., Friedemann, G., Glienke, C., Karp, S., Kava-Cordeiro, V., Raittz, R.T., Ramos, H.J., Ribeiro, E.M., Rigo, L.U., Rocha, S.N., Schwab, S., Silva, A.G., Souza, E.M., Tadra-Sfeir, M.Z., Torres, R.A., Dabul, A.N., Soares, M.A., Gasques, L.S., Gimenes, C.C., Valle, J.S., Ciferri, R.R., Correa, L.C., Murace, N.K., Pamphile, J.A., Patussi, E.V., Prioli, A.J., Prioli, S.M., Rocha, C.L., Arantes, O.M., Furlaneto, M.C., Godoy, L.P., Oliveira, C.E., Satori, D., Vilas-Boas, L.A., Watanabe, M.A., Dambros, B.P., Guerra, M.P., Mathioni, S.M., Santos, K.L., Steindel, M., Vernal, J., Barcellos, F.G., Campo, R.J., Chueire, L.M., Nicolas, M.F., Pereira-Ferrari, L., Silva, J.L., Gioppo, N.M., Margarido, V.P., Menck-Soares, M.A., Pinto, F.G., Simao Rde, C., Takahashi, E.K., y Yates, M.G., *Genome of Herbaspirillum seropedicae strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses*. PLoS Genet, 2011. **7**(5): p. e1002064.
147. Perotti, R., *On the limits of biological enquiry in soil science*. Proc. Int. Soc. Soil Sci., 1926. **2**: p. 146-161.
148. Platero, R., Peixoto, L., O'Brian, M.R., y Fabiano, E., *Fur is involved in manganese-dependent regulation of mntA (sitA) expression in Sinorhizobium meliloti*. Appl Environ Microbiol, 2004. **70**(7): p. 4349-55.
149. Potvin, E., Sanschagrin, F., y Levesque, R.C., *Sigma factors in Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiology Reviews, 2008. **32**(1): p. 38-55.
150. Powell, A., Borg, M., Amir-Heidari, B., Neary, J.M., Thirlway, J., Wilkinson, B., Smith, C.P., y Micklefield, J., *Engineered biosynthesis of nonribosomal lipopeptides with modified fatty acid side chains*. J Am Chem Soc, 2007. **129**(49): p. 15182-91.
151. Punschke, K. y Mayans, M., *Selección de cepas de Herbaspirillum spp. promotoras del crecimiento de arroz*. Agrociencia Uruguay, 2011. **15**: p. 19-26.
152. Raaijmakers, J.M., De Bruijn, I., Nybroe, O., y Ongena, M., *Natural functions of lipopeptides from Bacillus and Pseudomonas: more than surfactants and antibiotics*. FEMS Microbiol Rev, 2010. **34**(6): p. 1037-62.

153. Rausch, C., Hoof, I., Weber, T., Wohlleben, W., y Huson, D.H., *Phylogenetic analysis of condensation domains in NRPS sheds light on their functional evolution*. BMC Evol Biol, 2007. **7**: p. 78.
154. Rausch, C., Weber, T., Kohlbacher, O., Wohlleben, W., y Huson, D.H., *Specificity prediction of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases (NRPS) using transductive support vector machines (TSVMs)*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(18): p. 5799-808.
155. Ravel, J. y Cornelis, P., *Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in pseudomonads*. Trends Microbiol, 2003. **11**(5): p. 195-200.
156. Reinhold-Hurek, B. y Hurek, T., *Life in grasses: diazotrophic endophytes*. Trends Microbiol, 1998. **6**(4): p. 139-44.
157. Reinhold-Hurek, B. y Hurek, T., *Living inside plants: bacterial endophytes*. Curr Opin Plant Biol, 2011. **14**(4): p. 435-43.
158. Roncato-Maccari, L.D., Ramos, H.J., Pedrosa, F.O., Alquini, Y., Chubatsu, L.S., Yates, M.G., Rigo, L.U., Steffens, M.B., y Souza, E.M., *Endophytic Herbaspirillum seropedicae expresses nif genes in gramineous plants*. FEMS Microbiol Ecol, 2003. **45**(1): p. 39-47.
159. Roongsawang, N., Washio, K., y Morikawa, M., *Diversity of nonribosomal Peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants*. Int J Mol Sci, 2010. **12**(1): p. 141-72.
160. Rosenblueth, M. y Martinez-Romero, E., *Bacterial endophytes and their interactions with hosts*. Mol Plant Microbe Interact, 2006. **19**(8): p. 827-37.
161. Rottig, M., Medema, M.H., Blin, K., Weber, T., Rausch, C., y Kohlbacher, O., *NRSPredictor2--a web server for predicting NRPS adenylation domain specificity*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(Web Server issue): p. W362-7.
162. Ryan, R.P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D.J., y Dowling, D.N., *Bacterial endophytes: recent developments and applications*. FEMS Microbiol Lett, 2008. **278**(1): p. 1-9.
163. Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T., *Molecular cloning*. Vol. 2. 1989: Cold spring harbor laboratory press New York.
164. Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T., *Molecular cloning, a laboratory manual*, . Second ed. Vol. 1. 1989: Cold Spring Harbor Laboratory.
165. Sandy, M. y Butler, A., *Microbial iron acquisition: marine and terrestrial siderophores*. Chem Rev, 2009. **109**(10): p. 4580-95.
166. Schafer, A., Tauch, A., Jager, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., y Puhler, A., *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, 1994. **145**(1): p. 69-73.
167. Schalk, I., Lamont, I., y Cobessi, D., *Structure-function relationships in the bifunctional ferrisiderophore FpvA receptor from Pseudomonas aeruginosa*. Biometals, 2009. **22**(4): p. 671-678.
168. Schalk, I.J., *Metal trafficking via siderophores in Gram-negative bacteria: Specificities and characteristics of the pyoverdine pathway*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2008. **102**(5-6): p. 1159-1169.
169. Schalk, I.J. y Guillon, L., *Pyoverdine biosynthesis and secretion in Pseudomonas aeruginosa: implications for metal homeostasis*. Environ Microbiol, 2012.
170. Schalk, I.J. y Guillon, L., *Fate of ferrisiderophores after import across bacterial outer membranes: different iron release strategies are observed in the cytoplasm or periplasm depending on the siderophore pathways*. Amino Acids, 2013. **44**(5): p. 1267-77.
171. Schalk, I.J., Hannauer, M., y Braud, A., *New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance*. Environ Microbiol, 2011. **13**(11): p. 2844-54.

172. Schmid, M., Baldani, J., y Hartmann, A., *The Genus Herbaspirillum*, en *The Prokaryotes*, M. Dworkin, et al., Editors. 2006, Springer New York. p. 141-150.
173. Schollhorn, R. y Burris, R.H., *Acetylene as a competitive inhibitor of N-2 fixation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1967. **58**(1): p. 213-6.
174. Schulz, B. y Boyle, C., *What are Endophytes?*, en *Microbial Root Endophytes*, B.E. Schulz, C.C. Boyle, y T. Sieber, Editors. 2006, Springer Berlin Heidelberg. p. 1-13.
175. Schwyn, B. y Neilands, J.B., *Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores*. Anal Biochem, 1987. **160**(1): p. 47-56.
176. Selbitschka, W., Niemann, S., y Pühler, A., *Construction of gene replacement vectors for Gram- bacteria using a genetically modified sacRB gene as a positive selection marker*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1993. **38**(5): p. 615-618.
177. Sessitsch, A., Hardoim, P., Doring, J., Weilharter, A., Krause, A., Woyke, T., Mitter, B., Hauberg-Lotte, L., Friedrich, F., Rahalkar, M., Hurek, T., Sarkar, A., Bodrossy, L., van Overbeek, L., Brar, D., van Elsas, J.D., y Reinhold-Hurek, B., *Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis*. Mol Plant Microbe Interact, 2012. **25**(1): p. 28-36.
178. Silva-Rocha, R., Martinez-Garcia, E., Calles, B., Chavarria, M., Arce-Rodriguez, A., de Las Heras, A., Paez-Espino, A.D., Durante-Rodriguez, G., Kim, J., Nickel, P.I., Platero, R., y de Lorenzo, V., *The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(Database issue): p. D666-75.
179. Smith, M.J., Shoolery, J.N., Schwyn, B., Holden, I., y Neilands, J.B., *Rhizobactin, a structurally novel siderophore from Rhizobium meliloti*. Journal of the American Chemical Society, 1985. **107**(6): p. 1739-1743.
180. Sonawane, A.M. y Röhm, K.H., *A functional gltB gene is essential for utilization of acidic amino acids and expression of periplasmic glutaminase/asparaginase (PGA) by Pseudomonas putida KT2440*. Molecular Genetics and Genomics, 2004. **271**(1): p. 33-39.
181. Souza, A.L., Invitti, A.L., Rego, F.G., Monteiro, R.A., Klassen, G., Souza, E.M., Chubatsu, L.S., Pedrosa, F.O., y Rigo, L.U., *The involvement of the nif-associated ferredoxin-like genes fdxA and fdxN of Herbaspirillum seropedicae in nitrogen fixation*. J Microbiol, 2010. **48**(1): p. 77-83.
182. Souza, E.M., Funayama, S., Rigo, L.U., y Pedrosa, F.O., *Cloning and characterization of the nifA gene from Herbaspirillum seropedicae strain Z78*. Can J Microbiol, 1991. **37**(6): p. 425-9.
183. Souza, E.M., Pedrosa, F.O., Drummond, M., Rigo, L.U., y Yates, M.G., *Control of Herbaspirillum seropedicae NifA activity by ammonium ions and oxygen*. J Bacteriol, 1999. **181**(2): p. 681-4.
184. Stachelhaus, T., Mootz, H.D., y Marahiel, M.A., *The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases*. Chem Biol, 1999. **6**(8): p. 493-505.
185. Stephan, H., Freund, S., Beck, W., Jung, G., Meyer, J.M., y Winkelmann, G., *Ornibactins--a new family of siderophores from Pseudomonas*. Biometals, 1993. **6**(2): p. 93-100.
186. Strieker, M. y Marahiel, M.A., *The structural diversity of acidic lipopeptide antibiotics*. ChemBiochem, 2009. **10**(4): p. 607-16.
187. Strieker, M., Tanovic, A., y Marahiel, M.A., *Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics*. Curr Opin Struct Biol, 2010. **20**(2): p. 234-40.
188. Sun, L., Qiu, F., Zhang, X., Dai, X., Dong, X., y Song, W., *Endophytic bacterial diversity in rice (Oryza sativa L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis*. Microb Ecol, 2008. **55**(3): p. 415-24.

189. Tadra-Sfeir, M.Z., Souza, E.M., Faoro, H., Muller-Santos, M., Baura, V.A., Tuleski, T.R., Rigo, L.U., Yates, M.G., Wassem, R., Pedrosa, F.O., y Monteiro, R.A., *Naringenin regulates expression of genes involved in cell wall synthesis in Herbaspirillum seropedicae*. Appl Environ Microbiol, 2011. **77**(6): p. 2180-3.
190. Tang, Y. y Guest, J.R., *Direct evidence for mRNA binding and post-transcriptional regulation by Escherichia coli aconitases*. Microbiology, 1999. **145** (Pt 11): p. 3069-79.
191. Taulé, C., Mareque, C., Barlocco, C., Hackembruch, F., Reis, V., Sicardi, M., y Battistoni, F., *The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (Saccharum officinarum L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community*. Plant and Soil, 2012. **356**(1-2): p. 35-49.
192. Thomas, M.S., *Iron acquisition mechanisms of the Burkholderia cepacia complex*. Biometals, 2007. **20**(3-4): p. 431-52.
193. Tiburzi, F., Imperi, F., y Visca, P., *Intracellular levels and activity of PvdS, the major iron starvation sigma factor of Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol, 2008. **67**(1): p. 213-27.
194. Traxler, M.F., Seyedsayamdost, M.R., Clardy, J., y Kolter, R., *Interspecies modulation of bacterial development through iron competition and siderophore piracy*. Mol Microbiol, 2012.
195. Van Overbeek, L. y Van Elsas, J.D., *Effects of plant genotype and growth stage on the structure of bacterial communities associated with potato (Solanum tuberosum L.)*. FEMS Microbiology Ecology, 2008. **64**(2): p. 283-296.
196. Van Wees, S.C., Van der Ent, S., y Pieterse, C.M., *Plant immune responses triggered by beneficial microbes*. Curr Opin Plant Biol, 2008. **11**(4): p. 443-8.
197. Verhage, A., van Wees, S.C., y Pieterse, C.M., *Plant immunity: it's the hormones talking, but what do they say?* Plant Physiol, 2010. **154**(2): p. 536-40.
198. Vessey, J.K., *Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers*. Plant and Soil, 2003. **255**(2): p. 571-586.
199. Vinagre, F., Vargas, C., Schwarcz, K., Cavalcante, J., Nogueira, E.M., Baldani, J.I., Ferreira, P.C., y Hemerly, A.S., *SHR5: a novel plant receptor kinase involved in plant-N2-fixing endophytic bacteria association*. J Exp Bot, 2006. **57**(3): p. 559-69.
200. Visca, P., Imperi, F., y Lamont, I.L., *Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance*. Trends Microbiol, 2007. **15**(1): p. 22-30.
201. Vraspir, J.M. y Butler, A., *Chemistry of marine ligands and siderophores*. Ann Rev Mar Sci, 2009. **1**: p. 43-63.
202. Vraspir, J.M., Holt, P.D., y Butler, A., *Identification of new members within suites of amphiphilic marine siderophores*. Biometals, 2011. **24**(1): p. 85-92.
203. Walsh, C.T. y Marshall, C.G., *Siderophore biosynthesis in bacteria*, en *Iron Transport in Bacteria*, J.H. Crosa, A.R. Mey, y S.M. Payne, Editors. 2004, ASM Press. p. 18-37.
204. Wassem, R., De Souza, E.M., Yates, M.G., Pedrosa, F.D., y Buck, M., *Two roles for integration host factor at an enhancer-dependent nifA promoter*. Mol Microbiol, 2000. **35**(4): p. 756-64.
205. Wassem, R., Pedrosa, F.O., Yates, M.G., Rego, F.G., Chubatsu, L.S., Rigo, L.U., y Souza, E.M., *Control of autogenous activation of Herbaspirillum seropedicae nifA promoter by the IHF protein*. FEMS Microbiol Lett, 2002. **212**(2): p. 177-82.
206. Weinberg, E.D., *Iron availability and infection*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2009. **1790**(7): p. 600-605.
207. Wilson, M.J., McMorran, B.J., y Lamont, I.L., *Analysis of promoters recognized by PvdS, an extracytoplasmic-function sigma factor protein from Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol, 2001. **183**(6): p. 2151-5.

208. Winsor, G.L., Lam, D.K., Fleming, L., Lo, R., Whiteside, M.D., Yu, N.Y., Hancock, R.E., y Brinkman, F.S., *Pseudomonas Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for Pseudomonas genomes*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(Database issue): p. D596-600.
209. Winter, J.M., Behnken, S., y Hertweck, C., *Genomics-inspired discovery of natural products*. Curr Opin Chem Biol, 2011. **15**(1): p. 22-31.
210. Xi C., Lambrecht M., Vanderleyden J., y J., M., *Bi-functional gfp- and gusA-containing mini-Tn5 transposon derivatives for combined gene expression and bacterial localization studies*. J Microbiol Methods, 1999. **35**: p. 85-92.
211. Yeterian, E., Martin, L.W., Guillon, L., Journet, L., Lamont, I.L., y Schalk, I.J., *Synthesis of the siderophore pyoverdine in Pseudomonas aeruginosa involves a periplasmic maturation*. Amino Acids, 2010. **38**(5): p. 1447-59.
212. Zamioudis, C. y Pieterse, C.M., *Modulation of host immunity by beneficial microbes*. Mol Plant Microbe Interact, 2012. **25**(2): p. 139-50.
213. Zhang, Y., Wolfe, D.M., Pohlmann, E.L., Conrad, M.C., y Roberts, G.P., *Effect of AmtB homologues on the post-translational regulation of nitrogenase activity in response to ammonium and energy signals in Rhodospirillum rubrum*. Microbiology, 2006. **152**(Pt 7): p. 2075-89.
214. Zhu, B., Ye, S., Chang, S., Chen, M., Sun, L., y An, Q., *Genome Sequence of the Pathogenic Herbaspirillum seropedicae Strain Os45, Isolated from Rice Roots*. J Bacteriol, 2012. **194**(24): p. 6995-6.
215. Zucko, J., Starcevic, A., Diminic, J., Elbekali, M., Lisfi, M., Long, P.F., Cullum, J., y Hranueli, D., *From DNA sequences to chemical structures - methods for mining microbial genomic and metagenomic data sets for new natural products*. Food Technology and Biotechnology, 2010. **48**(2): p. 234-242.

ANEXOS

Anexo I: Medio CAS

Preparación para 10-15 placas de Petri:

Solución salina	25 ml
H ₂ O ultrapura	187 ml
PIPES(en la forma de ácido)	7,56 gr
NaOH 50% (p/v)	Volumen necesario hasta ajustar el pH a 6.7 (aprox. 2 ml)
Extracto de levadura 5 % (p/v) desferrado con Chelex	5 ml
MgCl ₂ 1M	0,25 ml
CaCl ₂ 0,1M	0,25 ml
Agar	3,75 gr

Esterilizar por autoclave

Luego de autoclavado, agregar soluciones estériles de:

glucosa 20%	2,5 ml
biotina 0,01%	1,25 ml
glutamato 10%	1,25 ml

La mezcla de la solución I y II (Fe³⁺-CAS-HDTMA)

Solución Fe³⁺-CAS-HDTMA

Solución I: 15,12 mg CAS en 12,5 ml H₂O. Agregar 0,25 ml de una solución de FeCl₃ (135 mg FeCl₃.6H₂O en 50 ml H₂O, HCl 0,01 M)

Solución II: 18,22 mg HDTMA en 10 ml H₂O. Disolver en microondas unos segundos a baja potencia.

Agregar lentamente y en agitación la solución I a la II. – Autoclavar (La temperatura no debe exceder los 121°C)

Soluciones

1-. NaOH 50% (p/p): 25 g de NaOH en 40 ml H₂O

2-. MgCl₂ 1M: 4,76 g en 50 ml H₂O

3-. CaCl₂ 0,1M: 0,55 g en 50 ml H₂O

4-. Solución salina:

KH₂PO₄ 0,3 g

NaCl 0,5 g

NH₄Cl 1 g

H₂O c.s.p. 100 ml

Anexo II: Programas de ciclado

FHUA_{sense}-FHUA_{anti}

1-. 5 min 95 °C

2-. 30 s 95 °C

3-. 30 s 60 °C

4-. 2 min 30 s 72 °C

30 ciclos de 2 a 4

5-. 5 min 72 °C

CIRAsense-CIRAanti

1-. 5 min 95 °C

2-. 30 s 95 °C

3-. 1 min 57 °C

4-. 2 min 30 s 72 °C

30 ciclos de 2 a 4

5-. 5 min 72 °C

InvCIRAsense-InvCIRAanti

1-. 5 min 95 °C

2-. 30 s 95 °C

3-. 30 s	55 °C
4-. 4 min 30 s	72 °C
30 ciclos de 2 a 4	
5-. 5 min	72 °C

PFRI sense-PFRI anti

1-. 5 min	95 °C
2-. 30 s	95 °C
3-. 1 min	60 °C
4-. 2 min	72 °C
30 ciclos de 2 a 4	
5-. 5 min	72°C

2348 sense-2348 anti

1-. 5 min	95°C
2-. 30 s	95°C
3-. 30 s	59°C
4-. 2 min 30 s	72°C
30 ciclos de 2 a 4	
5-. 5 min	72°C

2348 sense-M13 rev

1-. 5 min	95°C
2-. 30 s	95°C
3-. 30 s	59°C
4-. 2 min 30 s	72°C
30 ciclos de 2 a 4	
5-. 5 min	72°C

M13 rev-2348 anti

1-. 5 min	95°C
2-. 30 s	95°C
3-. 30 s	59°C

- 4-. 2 min 30 s 72°C
- 30 ciclos de 2 a 4
- 5-. 5 min 72°C

Anexo III: Mapas de los plásmidos utilizados

