

T 7/47

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 21.05.03
ENTRADA NUM. 1819

UNIVERSIDAD DE GRANADA
30 ABR. 2003
COMISION DE DOCTORADO

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

**Caracterización genética de Sistemas de Transporte de Péptidos
en *Sinorhizobium meliloti***

Memoria que presenta la Licenciada en Ciencias Biológicas

Joaquina Nogales Díaz

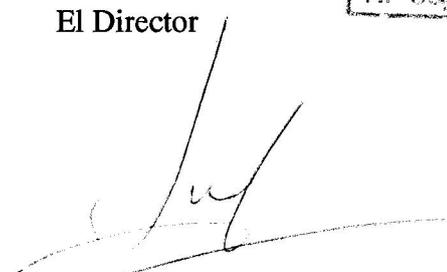
para aspirar al grado de Doctor



Fdo. Joaquina Nogales Díaz

VºBº

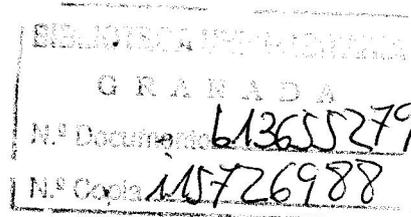
El Director



Fdo. Juan Sanjuán Pinilla

Doctor en Ciencias Biológicas

Investigador Científico del CSIC



**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN**

**UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS**

**Caracterización genética de Sistemas de Transporte de Péptidos
en *Sinorhizobium meliloti***

Joaquina Nogales Diaz

**TESIS DOCTORAL
2003**

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidin (C.S.I.C), Granada, durante los años 1998-2003.

A mis padres



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. TRANSPORTE A TRAVÉS DE LAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS	1
1.1. La membrana interna o citoplasmática	1
1.1.1. Composición química de las membranas	1
1.1.2. Permeabilidad de la membrana citoplasmática	2
1.2. Mecanismos de transporte a través de las membranas biológicas	2
1.2.1. Difusión pasiva	3
1.2.2. Difusión facilitada o mediada por un transportador	3
1.2.3. Transporte asociado al consumo de energía	4
1.2.3.1. Translocación de grupo	4
1.2.3.2. Transporte activo	5
2. TRANSPORTADORES TIPO ABC	5
2.1. Características generales de los transportadores ABC	6
2.2. Organización de los 4 dominios estructurales de los transportadores ABC	8
2.2.1. Dominios transmembranas (TMDs)	10
2.2.2. Dominios de unión a ATP (NDBs)	12
2.3. Proteínas periplásmicas de unión al sustrato	14
2.4. Especificidad de sustrato	16
2.5. Hidrólisis del ATP y acoplamiento al proceso de transporte	17
2.6. Mecanismos de acción de los transportadores ABC	19
2.6.1. Modelo de poro	20
2.6.2. Modelo de aspiradora hidrofóbica	20
2.6.3. Modelo de "flipasa"	20
2.7. Regulación de los transportadores ABC	20
2.8. Tipos de transportadores ABC	21
2.8.1. Transportadores ABC eucarióticos	22
2.8.2. Exportadores bacterianos	23

2.8.2.1. Sistemas de exportación de proteínas y péptidos	23
2.8.2.2. Sistemas de exportación de sustratos no protéicos	24
2.8.3. Importadores ABC bacterianos o permeasas periplásmicas	25
3. PÉPTIDOS Y TRANSPORTADORES ABC DE PÉPTIDOS	25
3.1. Papel fisiológico del transporte de péptidos	26
3.1.1. Captación de nutrientes	26
3.1.2. Fuente de nitrógeno y carbono	27
3.1.3. Esporulación	29
3.1.4. Competencia	29
3.1.5. Conjugación	30
3.1.6. Quimiotaxis	32
3.1.7. Virulencia	33
3.1.8. Otros procesos asociados al transporte de péptidos	34
4. INTERACCIÓN MICROORGANISMO-PLANTA	35
4.1 Interacción <i>Rhizobium</i> -leguminosa	35
4.1.1. Genes que intervienen en la interacción <i>Rhizobium</i> -leguminosa	36
4.2. Interacción microorganismo-planta: Mutualismo & Patogénesis	38
4.3. Papel de los transportadores ABC en la interacción <i>Rhizobium</i> -leguminosa	42
 MATERIAL Y MÉTODOS	
1. TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS	46
1.1. Cepas bacterianas y plásmidos	46
1.2. Medios de cultivo	49
1.3. Antibióticos	51
1.4. Preparación de péptidos	52

1.4.1. Curvas de crecimiento de péptidos	52
1.5. Conservación de cepas bacterianas	53
1.6. Cultivo de células de <i>S. meliloti</i>	53
2. TÉCNICAS ANALÍTICAS	54
2.1. Determinación de actividad β -galactosidasa	54
2.2. Determinación de proteína (Reactivo de Biorad)	55
3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	55
3.1. Obtención de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> y <i>S. meliloti</i> ("minipreps")	55
3.1.1. Método de Rusconi (método rápido)	55
3.1.2. Método de lisis alcalina	56
3.2. Obtención de ADN total	57
3.2.1. Extracción de ADN total	57
3.2.2. Extracción de ADN total por Quantum Prep® AquaPure Genomic DNA Kit	58
3.3. Determinación de la concentración de AND	59
3.4. Digestión total de ADN con endonucleasas de restricción	59
3.5. Identificación de fragmentos de restricción mediante electroforesis en geles de agarosa	60
3.5.1. Electroforesis de ADN	60
3.5.2. Revelado de geles y fotografía	60
3.5.3. Estimación del tamaño molecular de fragmentos de restricción	60
3.6. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de azarosa: QiaexII®	61
3.7. Ligación de fragmentos de restricción en vectores de clonación	61
3.8. Transformación de células de <i>E. coli</i>	62
3.8.1. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> con RbCl	62
3.8.2. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	63

3.9. Transferencia de ADN a cepas de <i>S. meliloti</i> mediante conjugación	64
3.10. Experimentos de hibridación ADN-ADN	65
3.10.1 Transferencia de ADN a filtros de Nylon (Southern blot)	65
3.10.2. Marcaje de sondas no radioactivas	66
3.10.3. Hibridación ADN-ADN con sondas no radioactivas	66
3.11. Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	68
3.12. Secuenciación de ADN	68
3.12.1 Purificación de ADN para secuenciación	68
3.12.2. Secuenciación automática de ADN de doble cadena	69
3.12.3. Análisis informático de secuencias de ADN y proteínas	70
4. INOCULACIÓN DE PLANTAS DE ALFALFA CON <i>S. meliloti</i>	70
4.1. Esterilización de semillas y germinación	70
4.2. Solución nutritiva para el cultivo de plantas	71
4.3. Cultivo de plantas	71
4.3.1. Cultivo axénico en tubos	71
4.3.2. Cultivo en jarras Leonard	72
4.3.3. Medida de la competitividad por la ocupancia de nódulos	72
4.3.4. Medida del grado de infectividad	73
CAPÍTULO I.	
Sensibilidad a péptidos antimicrobianos y eficiencia simbiótica de <i>S. meliloti</i>	75
I.1. AISLAMIENTO DE MUTANTES DE <i>S. meliloti</i> SENSIBLES A PROTAMINA	77
I.1.1. Obtención de mutantes de <i>S. meliloti</i> hipersensibles a protamina	78
I.2. CARACTERIZACIÓN DE GEENS DE <i>S. meliloti</i> IMPLICADOS EN RESISTENCIA A PROTAMINA	81
I.2.1. Genes implicados en síntesis de exopolisacárido	82
I.2.1.1. Experimento con calcofluor	84

I.2.2. Genes relacionados con producción de β -glucanos	86
I.2.2.1. Sensibilidad del mutante <i>ndvA</i> y <i>ndvB</i> a protamina	88
I.2.3. Genes implicados en el metabolismo nitrogenado	89
I.2.3.1. <i>ureF</i>	89
I.2.3.2. Gen <i>Y01361</i>	91
I.2.3.2.1. Crecimiento del mutante <i>Sap14</i> en diferentes fuentes pirimidínicas	91
I.2.3.2.2. Ruta de biosíntesis de pirimidinas	92
I.2.3.2.3. Frecuencia de reversión de la cepa <i>Sap14</i> a prototrofia	95
I.2.3.3. <i>hutU</i>	95
I.2.4. Genes relacionados con el transporte de moléculas	98
I.3. COMPORTAMIENTO SIMBIÓTICO DE LOS MUTANTES <i>Sap</i>	99
I.4. DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO I	102
CAPÍTULO II.	
Caracterización de transportadores ABC de péptidos en <i>S. meliloti</i> e implicación en simbiosis	105
II.1 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA <i>Opp</i> DE <i>S. meliloti</i>	107
II.1.1. Caracterización genética de los mutantes <i>GRQA1</i> , <i>GRQA2</i> y <i>GRQB12</i>	111
II.1.2. Construcción de mutantes <i>Opp⁻</i> con un cassette de resistencia a <i>Sm/Spc</i>	112
II.1.2.1. Crecimiento en péptidos de los mutantes <i>GR4A1SS</i> y <i>GR4B12SS</i>	113
II.1.2.2. Fenotipo en azúcares de la cepa mutante <i>GR4B12SS</i>	113
II.1.3. Perfil de expresión del sistema <i>Opp</i>	117
II.1.3.1. Construcción de una fusión transcripcional <i>oppA-lacZ</i>	118
II.1.3.2. Efecto del medio TY sobre la expresión de la fusión <i>oppA-lacZ</i>	118
II.1.3.3. Efecto de diferentes fondos genéticos TY sobre la expresión de la fusión <i>oppA-lacZ</i>	119

II.2. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN SISTEMA Dtp EN <i>S. meliloti</i>	122
II.2.1. Identificación y caracterización de un sistema Dtp en <i>S. meliloti</i>	122
II.2.2. Crecimiento en péptidos del mutante GR450	123
II.2.3. Perfil de expresión del sistema Dtp	124
II.2.3.1. Construcción de una fusión transcripcional <i>dtpA-lacZ</i>	125
II.2.3.2. Construcción de la fusión transcripcional <i>dtpB-lacZ</i>	126
II.2.3.3. Expresión de las fusiones <i>dtpA-lacZ</i> y <i>dtpB-lacZ</i> , en medio TY y en MM	127
II.3. CONSTRUCCIÓN DE DOBLES MUTANTES <i>Opp⁻-Dtp⁻</i>	128
II.3.1 Fenotipo en péptidos y bialaphos de los dobles mutantes GR4NA y GR4NB	129
II.3.2. Construcción de la cepa GR450g	130
II.3.2.1. Crecimiento del mutante GR450g en péptidos y en bialaphos	133
II.3.3. Construcción de las cepas GR4NAg y GR4NBg	134
II.3.3.1. Crecimiento de las cepas GR4NAg y GR4NBg en péptidos y bialaphos	135
II.4. IDENTIFICACIÓN DE SISTEMAS ABC ADICIONALES DE TRANSPORTE DE OLIGOPÉPTIDOS	136
II.4.1. Revertientes tipo GR4NB-R1 o NBR1	140
II.4.1.1. Crecimiento en péptidos y resistencia a bialaphos del revertiente tipo NBR1	140
II.4.2. Revertiente tipo GR4NA-R5 o NAR5	140
II.4.2.1. Crecimiento en péptidos y resistencia a bialaphos del Revertiente tipo NAR5	142
II.4.3. Caracterización de las reversiones tipo NBR1 y NAR5	143
II.4.3.1. Caracterización de la reversión producida en la cepa NBR1	143
II.4.3.1.1. Crecimiento en péptidos y resistencia a bialaphos del mutante gNBR1K50	145

II.4.3.2. Caracterización de la reversión producida en NAR5	148
II.4.3.2.1. Crecimiento en péptidos de los mutantes gNAR5K10 y gNAR5K11	149
II.4.3.3. Diferencias entre los mutantes gNBR1K50 y gNAR5K10	152
II.5. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES SIMPLES Y DOBLES EN LOS SISTEMAS Opp, Dpp, Dtp	154
II.5.1. Construcción de los mutantes <i>dppAB</i> y <i>dppB</i>	154
II.5.1.1. Crecimiento en péptidos de los mutantes GR4(<i>dppB</i>) y GR4(<i>dppAB</i>)	156
II.5.2. Construcción de un mutante gNAR5 <i>dppAB</i>	159
II.5.2.1. Crecimiento en péptidos del mutante gNAR5 <i>dppAB</i>	159
II.5.3. Construcción de las cepas GR4(<i>oppB dppB</i>), GR4(<i>oppA dppB</i>)	160
II.5.4. Construcción de una cepa GR4(<i>dtpB dppB</i>)	163
II.5.5. Construcción de un mutante gNAR5 <i>dppAB appB</i>	163
II.5.5.1. Crecimiento en péptidos del mutante gNAR5 <i>dppAB appB</i>	166
II.5.6. Perfil de expresión del sistema Dpp	169
II.5.6.1. Expresión de la fusión transcripcional <i>dppA-lacZ</i> en medio TY	170
II.6. COMPORTAMIENTO SIMBIÓTICO DE LAS CEPAS ALTERADAS EN SISTEMAS DE TRANSPORTE TIPO ABC	171
II.6.1. Fenotipo simbiótico de los mutantes simples GR4A1SS, GR4B12SS y GR450	171
II.6.2. Fenotipo simbiótico de los dobles mutantes GR4NA y GR4NB	172
II.6.3. Fenotipo simbiótico de los revertientes tipo GR4NB-R1 y GR4NA-R5	172
II.6.4. Fenotipo simbiótico de los triples mutantes gNBR1K50, gNAR5K10 y gNAR5K11	173
II.7 DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO II	177

CONCLUSIONES 183

BIBLIOGRAFÍA 185



INTRODUCCIÓN

1. TRANSPORTE A TRAVÉS DE LAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS.

La envoltura celular que rodea al citoplasma de las células bacterianas está formada por la membrana interna ó citoplasmática y por la pared celular. En las bacterias gram negativas la pared celular se compone de una membrana externa que rodea a una monocapa de peptidoglicano. La membrana interna es una membrana simétrica constituida por una bicapa fosfolipídica. Entre las membranas interna y externa de las bacteria gram negativas se localiza el espacio periplásmico, donde se localiza el peptidoglicano.

1.1. La membrana interna ó citoplasmática

La membrana citoplasmática es una fina estructura que rodea completamente a la célula. A pesar de tener sólo 8 nm de espesor, esta barrera es vital y separa el interior de la célula (citoplasma) del exterior. Si se rompe la membrana, la integridad de la célula se destruye, liberándose al medio los componentes citoplasmáticos y produciéndose la muerte. La membrana citoplasmática actúa también como una barrera selectiva, permitiendo que en el interior de la célula se concentren determinados metabolitos o se excreten al exterior las sustancias de desecho.

1.1.1. Composición química de las membranas

La membrana interna de las bacterias es similar a la membrana citoplasmática de las células eucariotas, y está formada por una bicapa lipídica, y por un gran número de proteínas, como la mayoría de las membranas biológicas. Dentro de la bicapa lipídica los fosfolípidos se disponen con los grupos hidrofóbicos dirigidos hacia el interior y los grupos hidrofílicos hacia el exterior. En cuanto a las proteínas, hay tres tipos basándonos en su localización dentro de la membrana, proteínas integrales de membrana con uno ó más segmentos transmembrana, proteínas que se anclan en la membrana a través de un dominio transmembrana y que presentan dominios que se expanden hacia el periplasma de la célula y proteínas que se asocian sólo aleatoriamente con la membrana interna (Figura I.1).

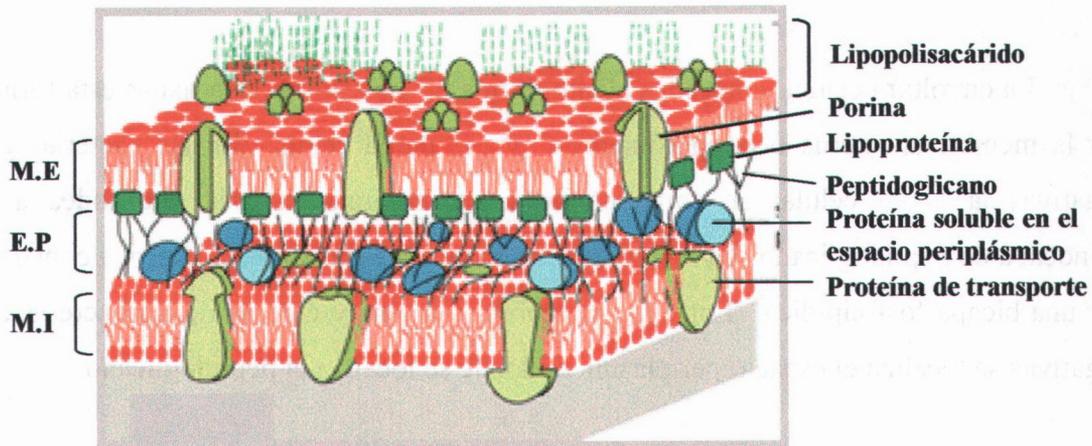


Figura.I.1. Representación esquemática de la membrana de *E. coli*. M.E, Membrana Externa; E.P, Espacio Periplásmico; M.I, Membrana Interna.

1.1.2. Permeabilidad de la membrana citoplasmática

El citoplasma celular está compuesto por una solución en fase acuosa de sales, azúcares, aminoácidos, vitaminas, coenzimas y una gran variedad de otra serie de sustancias solubles. Las características hidrofóbicas de la membrana le permiten funcionar como una barrera estricta, impidiendo así el paso libre de los compuestos polares. Algunos compuestos pequeños no polares y sustancias lipofílicas solubles en fases hidrofóbicas, son capaces de atravesar la barrera libremente gracias a su solubilidad en la fase lipídica de la membrana. Sin embargo, las moléculas cargadas como los ácidos orgánicos, aminoácidos y sales inorgánicas, de carácter hidrofílico, no pueden atravesar la membrana, por lo que deben ser transportadas de forma específica. La mayoría de las sustancias no son capaces de entrar en la célula de forma pasiva, por lo que los procesos de transporte son críticos para el buen funcionamiento de las células.

1.2. Mecanismos de transporte a través de las membranas biológicas

Las membranas biológicas permiten la interacción de las células con el medio que las rodea, controlando entre otros, la entrada de nutrientes al espacio intracelular y la excreción de productos de desecho al espacio extracelular. Asimismo, las membranas biológicas son responsables de la compartimentación de metabolitos entre los distintos

orgánulos celulares. Algunos de los procesos de transporte tienen lugar por mecanismos de difusión simple, mientras que otros están mediados por proteínas transportadoras de membrana. Puesto que los procesos de transporte suelen requerir energía, el transporte a través de las membranas es dependiente del estado energético de la célula.

1.2.1. Difusión pasiva

La difusión pasiva es el tipo más sencillo de transporte a través de las membranas, es el movimiento espontáneo de solutos a favor de un gradiente de concentración.

1.2.2. Difusión facilitada o mediada por un transportador

La difusión facilitada o difusión mediada por transportador es un segundo tipo de transporte a través de las membranas. Al igual que la difusión pasiva, la difusión facilitada tiene lugar a favor de un gradiente de concentración del soluto. Sin embargo, la difusión pasiva se produce a través de la misma membrana, mientras que la difusión facilitada depende de proteínas integrales de membrana que transportan moléculas a través de la bicapa lipídica. Se han identificado tres tipos de transportadores de membrana: los denominados uniportadores son proteínas capaces de transportar una sustancia de un lado de la membrana al otro; estas proteínas son específicas de una sola molécula o de un grupo de moléculas relacionadas. Los otros dos tipos de transportadores mueven sustancias de un lado al otro de la membrana, conjuntamente con una segunda sustancia que se requiere para el transporte de la primera, son por tanto, proteínas de co-transporte. Se denominan simportadores a las proteínas de membrana que transportan las dos sustancias en la misma dirección y antiportadores a los que transportan una de las sustancias en un sentido, mientras que la otra se transporta en sentido opuesto (Figura I.2). Los mecanismos de simporte y antiporte pueden tener lugar tanto en la difusión facilitada como en el transporte asociado al consumo de energía, un tercer tipo de transporte a través de las membranas.

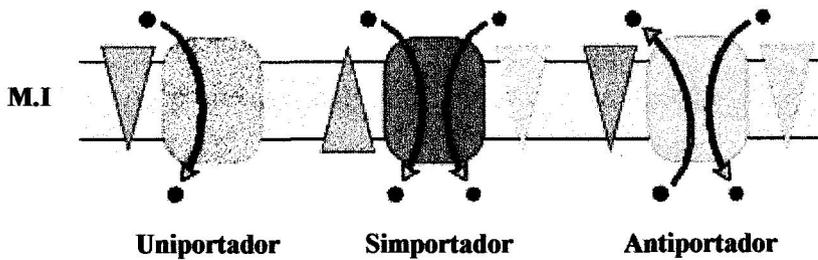


Figura I.2. Representación del proceso de difusión facilitada mediada por transportadores. En esta figura se representan los tres tipos de transportadores que intervienen en este proceso. M.I., Membrana Interna.

1.2.3. Transporte asociado al consumo de energía

El transporte asociado al consumo de energía es el transporte neto de un soluto en contra de un gradiente de concentración, que no puede producirse espontáneamente y requiere un aporte de energía. En este tipo de transporte participan proteínas transportadoras integrales de membrana. Se conocen dos tipos de transporte asociados al consumo de energía: la **translocación de grupo**, un proceso en el que se transporta una sustancia a la vez que se modifica químicamente, generalmente por fosforilación, y los **procesos de transporte activo**, en los que la sustancia transportada puede acumularse a altas concentraciones en el interior de la célula, sin sufrir ninguna modificación química, el transporte activo requiere energía que se obtiene bien a partir del ATP o de gradientes iónicos.

1.2.3.1. Translocación de grupo

Es un proceso en el que se modifica químicamente al compuesto que se transporta en su trasiego a través de la membrana. Dado que el producto que se encuentra en el interior de la célula es diferente del que se encuentra en el exterior, el transporte del producto genera un gradiente de concentración. Los ejemplos mejor conocidos de este tipo de transporte incluyen a la glucosa, manosa, fructosa, N-acetil-glucosamina, y β -glucósidos, que son fosforilados durante el transporte, mediante un sistema de fosfotransferasas. El sistema de fosfotransferasa de *Escherichia coli* está compuesto por 24 proteínas, siendo necesarias al menos 4 de ellas para el transporte de un determinado azúcar. Las proteínas que componen este sistema se fosforilan y desfosforilan

alternativamente hasta que una proteína transmembrana de transporte recibe el grupo fosfato y fosforila al azúcar, llevando a cabo su transporte. El enlace fosfato de alta energía es cedido por un intermediario metabólico, denominado fosfoenolpiruvato.

1.2.3.2. Transporte activo

El transporte activo es un proceso dependiente de energía en el que la sustancia que se transporta, se combina en el exterior con un transportador unido a la membrana, que posteriormente, se libera en el interior de la célula sin que sufra ningún tipo de modificación química.

Como en cualquier sistema de bombeo, el transporte activo requiere la realización de un trabajo. En bacterias, la energía necesaria para este transporte se obtiene a partir del ATP en el caso de algunos transportadores, mientras que en la mayoría de los casos se lleva a cabo mediante la separación de iones de hidrógeno que genera un gradiente de protones a través de la membrana, que se denomina fuerza motriz de protones. La energía generada a partir de la rotura de compuestos orgánicos o inorgánicos, o la obtenida a partir de la luz, se utiliza para conseguir la separación de protones a través de la membrana, situándose la mayor concentración de protones en el exterior y la menor en el interior. La consecuencia de este proceso es que la membrana se carga de energía. El potencial electroquímico de la fuerza motriz de protones permite la entrada de nutrientes mediante transporte activo. Los transportadores implicados en estos procesos poseen sitios específicos de unión tanto para el sustrato como para un protón. A medida que se va transportando el sustrato, va disminuyendo progresivamente el gradiente de protones.

Las sustancias que se captan mediante transporte activo no asociado a un gradiente de protones requieren gasto de energía en forma de ATP para llevar a cabo el transporte.

2. TRANSPORTADORES TIPO ABC

Son muchas las proteínas transportadoras que han sido descritas lo que ha llevado a establecer entre ellas relaciones basadas en la homología de secuencia y en el mecanismo molecular desencadenado para llevar a cabo su función. Esto ha permitido establecer diferentes grupos o familias de transportadores, siendo muy probablemente la superfamilia

ABC (“ATP Binding Cassette”) la más amplia y diversa de todas ellas, y de la que se han descrito representantes en todos los organismos estudiados. Los miembros de la superfamilia son conocidos con el nombre genérico de transportadores ABC, aunque este término sería incorrecto si se tiene en cuenta que existen unos pocos ejemplos de proteínas ABC que no se relacionan con funciones de transporte, sino que cumplen funciones alternativas. El ejemplo más obvio es la proteína UvrA, una enzima citoplasmática implicada en procesos de reparación del ADN. Esta proteína posee dos típicos dominios ABC acoplados a un clásico motivo de unión a ADN de “dedos de zinc” (Doolittle *et al.*, 1986), uniendo e hidrolizando ATP como parte de su función reparadora (Mazur y Grossman, 1991). Otro ejemplo es el factor de elongación de la traducción EF-3 de levadura, que posee un dominio ABC y claramente no es una proteína relacionada con funciones de transporte, el papel del ATP en su función es desconocido. La proteína FtsE es otra proteína ABC, necesaria en el proceso de división celular de *E. coli*, pero cuya función aún no se ha esclarecido y no se puede asegurar que sea un transportador de membrana. En conclusión, aunque la inmensa mayoría de proteínas ABC se relacionan con procesos de transporte, parece que algunas de ellas han sido “secuestradas” durante la evolución para cumplir funciones alternativas.

2.1. Características generales de los transportadores ABC

Todos los transportadores ABC se caracterizan por mediar el movimiento de moléculas a través de la membrana en contra de un gradiente de concentración, utilizando para ello la energía liberada en la hidrólisis del ATP. La superfamilia ABC está presente en organismos eucariotas y procariotas.

Los miembros de esta superfamilia se caracterizan por la presencia de unas secuencias altamente conservadas en sus dominios de unión a nucleótido o “ATP-Binding Cassette” (ABC), rasgo que da nombre a esta superfamilia de ATPasas transportadoras. Esas secuencias conservadas comprenden dos cortos motivos (los motivos Walker A y B; Walter *et al.*, 1982) presentes también en otras ATPasas. Pero en los transportadores ABC la homología se extiende más allá de estos motivos, hecho que diferencia a los miembros de esta superfamilia de cualquier otra ATPasa: una tercera secuencia, que sin lugar a dudas

identifica a las proteínas ABC, la llamada “signatura ABC”, localizada entre los motivos Walker A y B.

Los transportadores ABC son estructuralmente muy parecidos entre sí. El típico transportador está formado por 4 dominios que interaccionan con la membrana: dos de ellos son muy hidrofóbicos, los dominios transmembrana (TMD: transmembrane domain), y los otros dos son muy hidrofílicos, los dominios ABC o de unión a nucleótido (NBD: nucleotide-binding domain). Cada dominio TMD está constituido, normalmente, por 6 α -hélices transmembrana, y ambos dominios TMD forman la vía a través de la cual los solutos atraviesan la membrana (Figura I.3). Además, en gran parte, son los responsables de determinar la especificidad de sustrato del transportador. Los dominios NBD se hallan periféricamente localizados en la cara citoplasmática de la membrana, contienen los sitios de unión a ATP, y en ellos tiene lugar la hidrólisis del ATP acoplada al proceso de transporte. La secuencia de aminoácidos de estos dominios NBD se ha mantenido muy conservada a lo largo de la evolución.

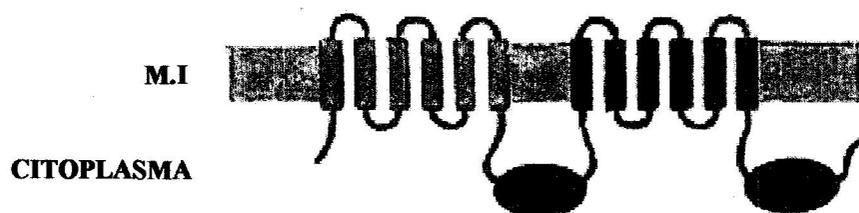


Figura I.3. Disposición de los dominios TMDs y NBDs dentro de la membrana. En esta figura se representan los 6 α -hélices transmembrana de los dominios TMDs y la localización citoplasmática de los dominios NBDs. M.I, Membrana Interna.

Una de las características de los transportadores ABC es el extraordinariamente amplio rango de compuestos que pueden transportar los diferentes miembros de la superfamilia, desde iones inorgánicos hasta grandes polipéptidos y polisacáridos. Uno de los principales retos del estudio de estas proteínas es conocer qué aspectos estructurales son los que determinan la especificidad de un transportador por un sustrato o grupo de sustratos, y cuál es la base de la variabilidad de especificidad entre los diferentes transportadores, es decir, en que se diferencia un transportador del resto que lo hace específico para un sustrato. Es importante señalar que el grado de especificidad varía de unos transportadores a otros. Por ejemplo, los transportadores bacterianos MalK y RbsA son específicos de maltosa y ribosa, respectivamente (Ehrmann *et al.*, 1998; Iida *et al.*,

1984); el transportador HisP es específico para histidina y es utilizado para transportar también lisina, arginina y ornitina con la colaboración de una proteína periplásmica diferente a la del transportador (Speiser y Ames., 1991); la proteína MDR1 o glicoproteína-P humana es capaz de transportar fuera de la célula una amplia variedad de compuestos, entre los que figuran fármacos antitumorales, péptidos, lípidos, detergentes, etc...Indistintamente del sustrato que se transporte, se asume que las características fundamentales del mecanismo de transporte se han conservado desde los organismos procariotas hasta los organismos eucariotas.

2.2. Organización de los cuatro dominios estructurales de los transportadores ABC

La estructura básica requiere 4 dominios distintos. Dos de éstos son altamente hidrofóbicos, proteínas integrales de membrana que unen el sustrato y median su paso a través de la bicapa lipídica. Los otros dos dominios acoplan la hidrólisis de ATP al transporte y están asociados con la cara citoplasmática de la membrana. Estos dominios del transportador ABC pueden ser cuatro polipéptidos diferentes o pueden ser sintetizados como dos proteínas independientes que presentan un dominio hidrofóbico que se ensambla en la membrana y un dominio hidrofílico con actividad ATPasa (Wandersman, 1998) (Figura I.4). La mayoría de los transportadores ABC de bacterias presentan dominios transmembrana codificados por uno o dos genes independientes al gen que codifica la proteína ABC:

- a) En muchos sistemas bacterianos (por ejemplo, la oligopéptido permeasa de *S. typhimurium* (Hiles *et al.*, 1987) cada dominio está codificado por genes diferentes (B, C, D, E). Estos transportadores bacterianos suelen requerir la función de una proteína periplásmica de unión al sustrato (A, OppA).
- b) En el sistema de ribosa de *E. coli* las dos subunidades de unión a ATP están fusionadas en un único polipéptido, codificado por un único gen.
- c) En el sistema p69 de *Micoplasma*, los dos dominios hidrofóbicos están fusionados en un único polipéptido.
- d) El locus "white" y "brown" de *Drosophila* y el sistema de exportación de la hemolisina HlyB de *E. coli*, consiste de un dominio hidrofóbico fusionado a un dominio de unión a ATP.

- e) En todos los sistemas eucarióticos caracterizados – incluyendo MDR, STE6 (McGrath y Varshavsky., 1989; Kuchler *et al.*, 1989) y CFTR (Riordan *et al.*, 1989) – los cuatro dominios están fusionados en un solo polipéptido. CFTR tiene un quinto dominio – el dominio R – con un posible papel regulador.

Aunque estos 4 dominios son suficientes para proporcionar la maquinaria necesaria para el proceso de transporte de solutos a través de la membrana, ciertos transportadores ABC pueden presentar dominios adicionales con otras funciones. Por ejemplo, como se ha citado anteriormente, el transportador CFTR tiene un quinto dominio, el dominio-R que no tiene equivalentes en otros transportadores ABC y cuya función es la regulación de la

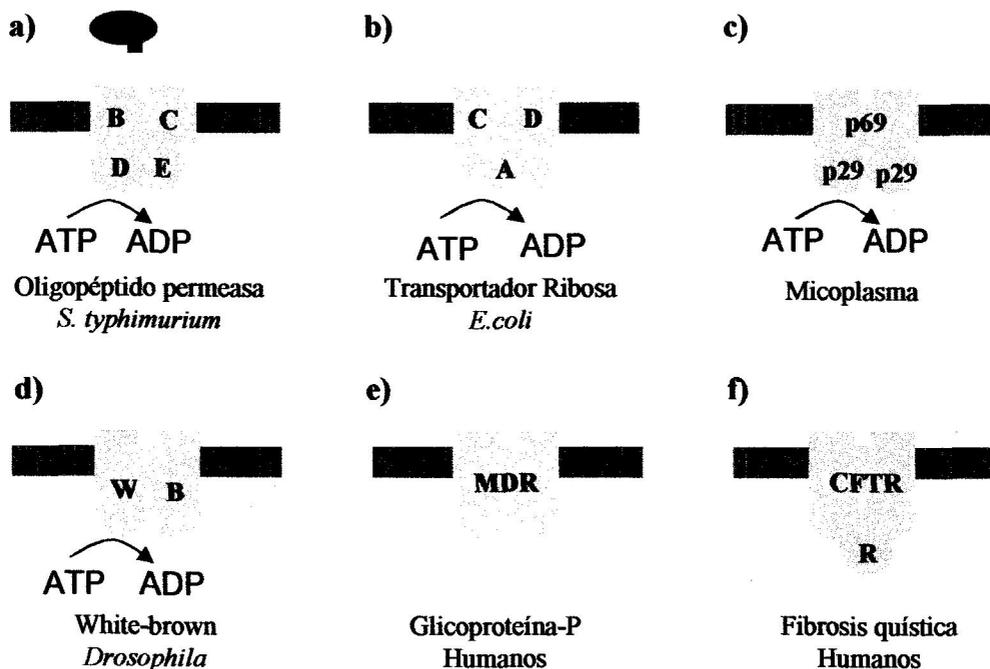


Figura I.4. Organización de los dominios de los transportadores ABC.

actividad del transportador en base a su grado de fosforilación (Cheng *et al.*, 1991). El dominio NBD del transportador de maltosa (MalK) tiene una extensión en el extremo C-terminal con función enzimática aparentemente independiente del proceso de transporte (Reidl *et al.*, 1989). Finalmente, algunos sistemas de transporte carecen de algunos dominios, por ejemplo, los transportadores de histidina y maltosa solo tienen un gen simple que codifica para un dominio de unión al ATP. La proteína HlyB y los transportadores de betaina-glicina sólo parecen tener un dominio de unión a ATP y un dominio hidrofóbico.

Un hecho importante es que todos los transportadores ABC bacterianos implicados en la entrada de solutos al citoplasma requieren de una proteína de unión al sustrato localizada en el espacio periplásmico (en bacterias gram negativas) o anclada en la cara externa de la membrana citoplasmática (en bacterias gram positivas). Este componente adicional (SBP, solute-binding protein) es esencial para la función del transportador al que se asocia, aunque en sí mismo no interviene en el proceso de transporte del sustrato a través de la membrana. Aparte, varios transportadores bacterianos poseen componentes proteicos accesorios que forman un complejo con los 4 dominios del transportador. La proteína HlyB (es el transportador ABC en sí con 4 dominios), que exporta la hemolisina HylA de *E. coli* a través de la membrana citoplasmática, se asocia con la proteína HylD que transporta la hemolisina a través de la membrana externa (Zhang *et al.*, 1993; Blight y Holland., 1990).

No se ha encontrado ningún transportador ABC que funcione con menos de 4 dominios por lo que, en ausencia de evidencias en contra, se asume que el núcleo de 4 dominios (2 TMD y 2 NBD) forma la unidad básica requerida para la translocación de solutos a través de la membrana. Se pensaba que el movimiento de los solutos era estrictamente unidireccional, sin embargo, ha sido descrito un movimiento bidireccional en tres transportadores de aminoácidos dependientes de una proteína periplásmica, la permeasa general de aminoácidos (Aap) y la permeasa de aminoácidos ramificados (Bra) de *Rhizobium leguminosarum*, y la permeasa de histidina de *Salmonella typhimurium* (Hosie *et al.*, 2001).

2.2.1. Dominios transmembrana (TMDs)

Estos dominios se disponen formando múltiples segmentos que cruzan varias veces la membrana. En la mayoría de los transportadores cada dominio TMD consta de 6 segmentos en α -hélice (un total de 12 por transportador), con los extremos N- y C-terminales localizados en la cara citoplasmática de la membrana y unidos entre sí por tres bucles extracelulares y dos intracelulares. Sin embargo, se han descrito algunos transportadores que presentan un número de segmentos transmembrana que difiere del modelo general. Por ejemplo, la proteína MalF del transportador de maltosa de *E. coli* posee los 6 segmentos transmembrana, pero tiene una extensión en el extremo N-terminal con dos segmentos adicionales, dando un total de 8. Estudios posteriores, han demostrado

que esos dos segmentos adicionales pueden ser eliminados sin que el transportador pierda su función (Ehrmann *et al.*, 1998). Otro ejemplo es el transportador de la histidina de *S. typhimurium*, cuyos dos dominios TMD, HisQ e HisM, poseen sólo 5 segmentos transmembrana en lugar de 6 (Higgins *et al.*, 1982); en *B. subtilis* se han encontrado transportadores cuyo número de segmentos transmembrana por TMD oscila entre 3 y 11 (Quentin *et al.*, 1999); en la proteína FhuB se han encontrado hasta 20 segmentos transmembrana (Köster *et al.*, 1991; Mademidis *et al.*, 1997). Esto podría demostrar que entre 6 y 10 segmentos transmembrana son la unidad mínima requerida para formar la vía de transporte a través de la membrana, y que el patrón estructural estándar de 6 hélices transmembrana por dominio TMD simplemente facilita el correcto plegamiento y orientación del transportador en la membrana.

Las comparaciones de las secuencias de aminoácidos de los dominios TMD de los diferentes transportadores ABC revelan poca o ninguna similitud (excepto en unos pocos casos específicos). Si tenemos en cuenta que los transportadores ABC han tenido un origen evolutivo común (Ames, 1986), ese bajo nivel de conservación de las secuencias implica que la estructura necesaria para el buen funcionamiento de los TMD puede construirse a partir de múltiples secuencias alternativas de aminoácidos. El único caso de conservación de secuencias entre dominios TMD de diferentes transportadores es un corto motivo común a todos los sistemas de captación de nutrientes en bacterias (Dassa y Hofnung, 1985), el motivo EAA (EAA-X(3)-G-X(9)-I-X-L/P) que siempre se localiza en un gran bucle hidrofílico orientado hacia el citoplasma y normalmente separado del extremo C-terminal por dos segmentos transmembrana. Su característica más llamativa es la presencia del triplete Glu-Ala-Ala, muy conservado en los transportadores ABC de captación de nutrientes en procariontes. Mutaciones en este motivo eliminan completamente la actividad del transportador (Dassa, 1990), y aunque aún no se ha establecido su función, parece claro que interacciona con regiones específicas de los dominios NDB. El motivo EAA no se ha encontrado en los TMD de los transportadores ABC eucariotes, ni tampoco en los transportadores ABC de exportación de moléculas en procariontes (Quentin *et al.*, 1999). Los pocos ejemplos de alta similitud de secuencia entre TMDs probablemente reflejan eventos de duplicación génica relativamente recientes. Por ejemplo, las proteínas transmembrana del sistema de captación de octopina de *Agrobacterium tumefaciens* están muy relacionadas con las del transportador de histidina de *S. typhimurium* (Valdivia *et al.*,

1991), y puesto que la naturaleza química de sus respectivos sustratos es bastante similar, es razonable pensar que ambos sistemas de transporte han divergido a partir de un proceso reciente de duplicación. Sin embargo, similitud de secuencia no significa necesariamente similares sustratos: los transportadores de maltosa y de glicerol-3-fosfato de *E. coli* tienen TMDs muy relacionados pero transportan sustratos muy diferentes (Overduin *et al.*, 1988). Otro ejemplo es el de los transportadores humanos MDR1 y MDR3 que, a pesar de su elevada similitud de secuencia, sólo el primero está implicado en el fenómeno de resistencia a múltiples fármacos (Smith *et al.*, 1994).

Los dos dominios TMD de un transportador ABC, aún en los casos en que no sean ambos el producto de un mismo gen, guardan entre sí una homología más estrecha que con los dominios TMD de cualquier otro transportador de la superfamilia. Esta alta similitud probablemente significa que los dos dominios funcionan simétricamente como un pseudodímero.

2.2.2. Dominios de unión a ATP (NDBs)

Son los dominios más característicos y conservados en los transportadores ABC. Cada NBD consta de 200-250 aminoácidos y los porcentajes de similitud de secuencia entre los NBDs de los diferentes transportadores oscilan entre el 30 y el 50% (Higgins *et al.*, 1986; Hyde *et al.*, 1990). Los NBDs son altamente hidrofílicos y se localizan en la cara citoplasmática de la membrana, asociados estrechamente con ella. Esta topología se ve apoyada por pruebas experimentales basadas en estudios de inmunolocalización y digestión con proteasas. Los NBDs en la glicoproteína-P de mamíferos sólo son accesibles al reconocimiento por anticuerpos específicos desde la cara citoplasmática de la membrana (Yoshimura *et al.*, 1989). Del mismo modo, mediante el uso de proteasas, se ha comprobado que los NBDs en los transportadores bacterianos son menos accesibles a la proteólisis desde el exterior de la célula que desde el citoplasma (Kerppola *et al.*, 1991). Esta localización es completamente consistente con la función de los NBD: la hidrólisis del ATP y su acoplamiento con el proceso de transporte.

Aunque ya no hay duda de que los NBDs son componentes periféricos de la membrana, no se puede descartar la posibilidad de que algún segmento de estos dominios pueda insertarse en la membrana e interactuar estrechamente con los TMDs, o con la proteína periplásmica de unión a sustrato típica de todos los transportadores bacterianos de

captación de nutrientes. Existen pruebas de que la proteína HisP, que es el dominio ABC del transportador de histidina de *E. coli*, se inserta profundamente en la membrana y puede interactuar con la proteína de unión a sustrato HisJ en el lado periplásmico (Baichwal *et al.*, 1993). Resultados similares se han obtenido con la proteína MalK (Schneider *et al.*, 1995).

Como se ha comentado anteriormente, los NBDs son dominios conservados que presentan una estructura característica. A nivel de estructura primaria presentan los denominados sitios Walker que parecen implicados en la unión a nucleótidos (Walter *et al.*, 1982). El sitio A de Walker se caracteriza por presentar la secuencia GXXGXGKS/T donde X pueden ser distintos tipos de aminoácidos, y el sitio B presenta la secuencia hhhhD donde h suele ser un aminoácido hidrofóbico. 15 residuos arriba del motivo Walker B se localiza un motivo altamente conservado que es único para los miembros de la familia de los transportadores ABC (Ames *et al.*, 1990; Hyde, *et al.*, 1990), el motivo "signatura ABC" (LSGGQQ/R/KQR), y a continuación el llamado "dominio helicoidal" (Ames y Lecar, 1992), que es un gran bucle constituido por al menos 4 α -hélices que se introduce en la membrana embebido en los dominios TMD (Figura I.5). La secuencia "signatura ABC" actúa como un puente que permite la transición de señales entre el pliegue de unión a nucleótido y el dominio helicoidal. El dominio helicoidal junto con el motivo LSGGQ parecen ser los responsables de la interacción de las ATPasas con los componentes de membrana, ya que ésta es inhibida por mutaciones en un residuo de lisina muy conservado (Higgins, 1992; Hyde *et al.*, 1990; Mimura *et al.*, 1991), interacción que es necesaria para que se lleve a cabo el cambio conformacional de estas subunidades de membrana que permite la translocación del compuesto como respuesta a la hidrólisis del ATP (Schneider y Hunke, 1998). Por su parte, el motivo Walker B posee un residuo de aspártico muy conservado que interviene en la unión del catión Mg^{2+} , precedido de aminoácidos apolares que crean un entorno hidrofóbico apropiado para albergar la base nitrogenada del nucleótido adenina.

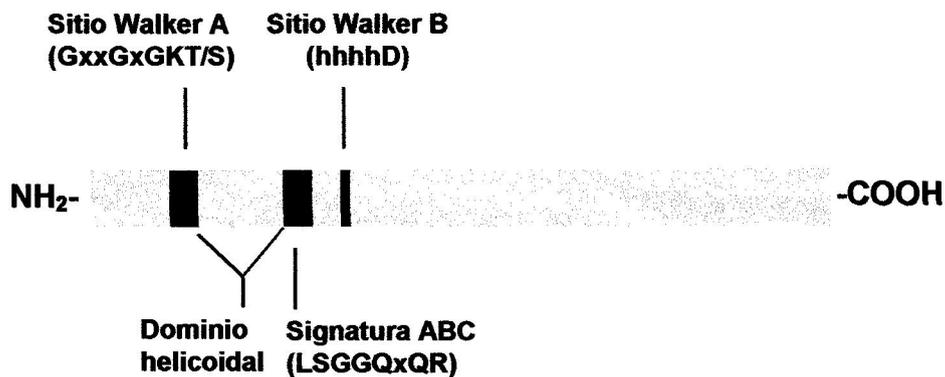


Figura I.5. Representación lineal de un dominio ABC de un transportador ABC, con asignación de los principales sitios funcionales.

Otro motivo relativamente bien conservado de los dominios ABC es el A/KENI (que se encuentra 18 residuos arriba del motivo LSGGQ) y el residuo His 211, localizado aproximadamente 25 residuos abajo del motivo Walker B. Este residuo se encuentra muy bien conservado en los dominios NDBs de los transportadores ABC de *E. coli* (Linton y Higgins, 1998) y de levaduras (Decottignies y Goffeau, 1997). Mutaciones en este residuo de histidina en muchas ATPasas ABC de procariotas anulan la actividad de transporte pero no necesariamente la actividad ATPasa, lo que sugiere que interviene de algún modo en el acoplamiento de la hidrólisis del ATP al proceso de transporte (Schneider y Hunke, 1998)

2.3. Proteínas periplásmicas de unión al sustrato

Aunque estas proteínas no son comunes a todos los miembros de la superfamilia ni en sí mismas forman parte integral de los transportadores, generalmente los sistemas de transporte tipo ABC de captación de nutrientes en procariotas utilizan receptores periplásmicos, aunque se han aislado mutantes para sistemas de captación de nutrientes que son capaces de funcionar en ausencia de receptor periplásmico (Shuman, 1982; Speiser y Ames, 1991). En cambio, no se conoce ningún sistema ABC de exportación que los requiera, ni en procariotas ni en eucariotas. Esto sugiere que las proteínas periplásmicas de unión a sustrato, lejos de ser esenciales, son componentes accesorios de los transportadores ABC que pueden suponer una adaptación específica a circunstancias particulares.

Los primeros transportadores ABC que se caracterizaron fueron los transportadores dependientes de proteínas de unión al sustrato de las bacterias gram negativas, que se distinguían de otros sistemas de transporte activo por ser sensibles al choque osmótico en frío (Berger y Heppel., 1974), lo que resultaba en la pérdida de las proteínas específicas de unión a sustrato del periplasma (el compartimento localizado entre las membrana interna y externa de bacterias gram negativas). Se ha determinado que para que se produzca la hidrólisis de ATP, es necesaria la interacción de la proteína periplásmica con los dominios de las subunidades de membrana del transportador ABC presentes en la superficie de la monocapa externa de la membrana (Ames *et al.*, 1990).

Estas proteínas periplásmicas sirven como receptores iniciales del sustrato, para posteriormente liberarlo al transportador de membrana. Se ha comprobado que la unión inicial al sustrato es la etapa limitante de todo el proceso de transporte (Millar *et al.*, 1983). El mecanismo de acción de las proteínas periplásmicas de unión al sustrato se describe por medio del modelo "The Venus flytrap" (Sack *et al.*, 1989), según el cuál existen dos conformaciones del receptor no ligado a sustrato (una abierta y vacía, y otra cerrada y llena) que se encuentran en equilibrio dinámico la una con la otra. En presencia de sustrato, éste se une a uno de los dos dominios del receptor y establece interacciones adicionales con el segundo dominio, estabilizando así la conformación cerrada, en la cual la molécula de sustrato queda atrapada en el sitio de unión entre ambos dominios. En esta conformación el receptor muestra afinidad por un transportador de membrana específico, y al unirse a él dispara una serie de cambios conformacionales que resultan en la hidrólisis del ATP (Petronilli y Ames, 1991) y el transporte de la molécula de sustrato hacia el citoplasma. Para ello, el propio receptor debe sufrir cambios conformacionales que, primero, le hagan perder la afinidad por el sustrato y provoquen la apertura del sitio de unión para que la molécula de sustrato pueda ser liberada y, segundo, que el propio receptor pierda afinidad por el complejo de transporte y pueda liberarse de nuevo al periplasma. Esto último parece ocurrir espontáneamente una vez que el sustrato ha sido liberado.

En los sistemas de transporte ABC dependientes de una proteína receptora de sustrato, es habitual que un mismo transportador de membrana interaccione con más de una proteína periplásmica, como es el caso de la permeasa de histidina de *Salmonella typhimurium*. Está compuesta por una proteína de unión a histidina, HisJ, dos proteínas de

membrana, HisQ y HisM y una proteína de unión a nucleótido, HisP. Hay una segunda proteína periplásmica de unión a lisina, arginina y ornitina (LAO), que transporta estos aminoácidos en combinación con el complejo Q/M/P. LAO también une histidina con baja afinidad (Higgins y Ames, 1981). Han sido aislados mutantes en HisP, que pueden transportar el sustrato en ausencia de las dos proteínas periplásmicas, HisJ y LAO, esenciales para el transporte de histidina a través de la membrana (Speiser y Ames, 1991). Algunos sistemas de transporte de oligopéptidos poseen tres proteínas de unión a oligopéptidos, y la mutación de las tres simultáneamente es lo que causa la pérdida de capacidad de transporte de dichos péptidos, como es el caso de *Streptococcus thermophilus* o *Streptococcus pneumoniae* (Alloing *et al.*, 1994; Garault *et al.*, 2002). El caso de la bacteria *Thermococcus litoralis* es diferente, posee un sistema de transporte de maltosa/trehalosa, que es homólogo al sistema de transporte de maltosa de *Escherichia coli*, con la diferencia de que el sistema de *T. litoralis* reconoce maltosa y trehalosa, y *E. coli* utiliza un sistema de transporte diferente para la trehalosa (Horlacher *et al.*, 1998). La gran homología encontrada entre los componentes de este sistema de transporte en arqueas y bacterias es una evidencia para la conservación evolutiva de los sistemas de transporte ABC dependientes de una proteína de unión a sustrato.

Además de transportar sustratos, las proteínas periplásmicas de los transportadores ABC han sido implicadas en otras funciones. La proteína de unión a ribosa de *E. coli* se une a la ribosa y media tanto su transporte como la quimiotaxis a este compuesto (Eym *et al.*, 1996). La proteína de unión a dipéptidos (DppA) de *E. coli* y *S. typhimurium* es requerida también para el transporte y quimiotaxis a péptidos (Abouhamad *et al.*, 1991)

2.4. Especificidad de sustrato

Se han identificado transportadores ABC para casi cualquier sustrato biológico, incluyendo azúcares, aminoácidos, oligopéptidos, iones inorgánicos, lípidos, polisacáridos y proteínas. Todos estos sustratos no sólo son muy variables en su naturaleza química, sino también en su tamaño. Aún no se conoce con detalle la base molecular que explica cómo puede transportarse tal variedad de sustratos, considerando a la superfamilia en conjunto, ya que cada transportador conserva un alto grado de especificidad por su propio sustrato,

pero ya se tienen ciertas nociones de qué aspectos estructurales de un transportador definen su especificidad.

Los sistemas ABC de captación de nutrientes en procariotas han sido intensamente estudiados en *E. coli*, y en ellos es la proteína periplásmica de unión al sustrato la que determina inicialmente la especificidad por una determinada sustancia. Esta proteína liga específicamente un determinado sustrato para después cederlo al correspondiente transportador de membrana mediante interacciones directas con él. Un modelo estructural de cómo tiene lugar todo el proceso ha sido propuesto recientemente por Ehrmann y col. (1998). Sorprendentemente, este modelo predice que el proceso podría implicar contactos directos a través de la membrana entre la proteína periplásmica y el NBD, que desencadenarían la hidrólisis del ATP y su acoplamiento al transporte del sustrato. Sin embargo, la existencia de mutantes carentes del receptor periplásmico que aún conservan su especificidad de sustrato (Petronilli y Ames, 1991) sugiere que el propio complejo transportador de membrana juega algún papel a la hora de determinar dicha especificidad. En concreto, las pruebas experimentales apuntan a los dominios TMD, más que a los NBDs, como los determinantes de la especificidad de sustrato en aquellos transportadores ABC que carecen de receptores periplásmicos. Así, se han descrito mutaciones en los TMDs que modifican la especificidad del transportador por el sustrato: por ejemplo, la delección de 4 aminoácidos de un segmento transmembrana del TMD (HisM) del transportador de histidina de *S. typhimurium*, cambia la especificidad de L-histidina a L-histidinol (Payne *et al.*, 1985). También se ha sugerido que las diferencias en la especificidad de sustrato entre transportadores ABC son debidas a sus dominios transmembrana (TMD), como es el caso de la secreción de la hemolisina- α en *E. coli* por el transportador HylB. En esta proteína se ha encontrado que los determinantes de la especificidad de sustrato están localizados en los segmentos transmembrana (Zhang *et al.*, 1993).

No hay evidencias de que los NBDs de los transportadores ABC contribuyan directamente a la especificidad de sustrato, aunque no se puede descartar esa posibilidad teniendo en cuenta, porque una parte de esos dominios (en concreto el dominio helicoidal) puede penetrar profundamente en la membrana a través del "poro" formado por los TMDs, interaccionando así con el receptor periplásmico.

Puesto que los residuos que contribuyen al reconocimiento del sustrato pueden encontrarse en diferentes segmentos transmembrana y bucles extramembranosos, y aún no se conoce detalladamente la organización estructural de tales regiones, todavía no ha sido posible predecir la especificidad de sustrato de un transportador ABC (ni siquiera la naturaleza química del sustrato) únicamente a partir de su secuencia primaria de aminoácidos de los diferentes compuestos. Solamente en aquellos casos en los que los TMDs de dos transportadores ABC están muy estrechamente relacionados, sería razonable suponer que ambos transportadores traslocan sustratos similares, pero incluso estrechas similitudes pueden resultar engañosas.

2.5. Hidrólisis del ATP y acoplamiento al proceso de transporte

La hidrólisis del ATP en los NBDs proporciona la energía necesaria para el transporte de moléculas a través de la membrana en contra de un gradiente de concentración, en contraste con otros transportadores que asocian su actividad a gradientes electroquímicos de membrana (fuerza protón-motriz). Sugerencias previas apuntaban hacia un papel del gradiente electroquímico de protones en la función de los transportadores ABC, pero nunca se ha detectado un movimiento de protones asociado al transporte del sustrato en los sistemas ABC y el uso de desacopladores excluye el papel del gradiente electroquímico en la función de dichos transportadores (Bishop *et al.*, 1989). Una excepción es la exportación de hemolisina por HylB, que requiere además de la hidrólisis del ATP, la existencia de un gradiente de protones a través de la membrana (Koronakis *et al.*, 1991). Al parecer, las proteínas que se exportan por la vía clásica de secreción requieren también del ATP y del gradiente electroquímico (Geller, 1991). El requerimiento de ATP para el transporte, en principio, no implicaba necesariamente que tuviera que ocurrir su hidrólisis para que se llevara a cabo el transporte, pero estudios posteriores demostraron sin ambigüedades que la hidrólisis del ATP ocurría concomitantemente con el proceso de transporte: cuando el ATP es sustituido por análogos no hidrolizables, el transportador es incapaz de funcionar (Ames *et al.*, 1989).

Los análisis más reveladores del mecanismo de hidrólisis del ATP proceden de estudios con las proteínas Pgp y FTR. Muchos de ellos demuestran que los dos NBDs de Pgp funcionan cooperativamente y que la inactivación de uno de los dos sitios catalíticos

anula completamente toda actividad ATPasa. La estequiometría de 2 ATPs hidrolizados por molécula de sustrato transportada apoya el hecho de que ambos NBDs son funcionalmente simétricos (Mimmark *et al.*, 1989). Se ha propuesto un modelo en el que la hidrólisis del ATP se produce alternativamente entre los dos NBDs, de tal manera que la unión del ATP en uno de los dos sitios catalíticos previene la hidrólisis en el segundo sitio (Senior *et al.*, 1995). Más recientemente se han obtenido pruebas directas de que la hidrólisis solo ocurre en un sitio cada vez, nunca simultáneamente en los dos sitios (Hrycyna *et al.*, 1998; Senior *et al.*, 1995). Además, se ha propuesto que tras la hidrólisis del ATP el sitio catalítico adopta una conformación altamente energética con el ADP+P_i aún unidos, cuya relajación se acopla al movimiento del sustrato desde un sitio de alta afinidad a otro de baja afinidad del transportador.

El modo en que los NBDs acoplan la hidrólisis del ATP al proceso de transporte aún es desconocido. No han sido detectados intermediarios fosforilados de las proteínas transportadoras, como en las ATPasas tipo-P, por lo que en general se asume que la unión y la hidrólisis del ATP inducen cambios conformacionales en los NBDs que son transmitidos por medio de interacciones dominio-dominio a los segmentos transmembrana. Del mismo modo, la unión del sustrato a los TMDs produce cambios conformacionales que disparan la actividad ATPasa de los NBDs. Estos hallazgos son consistentes con el hecho de que ambos procesos, la hidrólisis del ATP y el transporte de sustratos, son interdependientes. Por ello, debe existir algún mecanismo específico de reconocimiento mutuo entre los dominios TMD y NBD que permita la transmisión recíproca de señales entre ambos con el fin de llevar a término el proceso de transporte. Los estudios filogenéticos apoyan cada vez más esta idea a raíz de los hallazgos de grupos de NBDs implicados en el transporte de sustratos similares (Saurin *et al.*, 1999). Además, hay muy pocos ejemplos de transportadores cuyos NBD puedan sustituirse por los NBD de otro transportador diferente (incluso relacionado próximamente) sin que con ello se vea afectada la función del transportador (Ehrmann *et al.*, 1998).

Se han identificado otras regiones que podrían estar implicadas en la transducción de cambios conformacionales entre dominios. Una de ellas es el motivo EAA que, como ya comentamos, se ha encontrado en un bucle citoplasmático de los TMDs de los sistemas de importación en procariontes; mutaciones en este motivo pueden ser suprimidas por mutaciones en los NBDs (Mourez *et al.*, 1997). Curiosamente, en los TMDs de los

análogos eucariotas de estos transportadores se ha encontrado un gran bucle hidrofílico que ocupa la posición del bucle EAA procariota, y que podría tener la misma función que éste. Otra región de los transportadores ABC implicada en estas interacciones dominio-dominio es el dominio helicoidal de los NBDs. Mutaciones en él pueden desacoplar la hidrólisis del ATP del proceso de transporte, sin que con ello se vea afectada la unión del ATP o su posterior hidrólisis. Además, la proteína UvrA (que es una proteína ABC, aunque no un transportador) tiene un motivo en “dedos de zinc” inserto en el bucle correspondiente al dominio helicoidal. Esta proteína acopla la hidrólisis del ATP a su interacción con el ADN, lo que demuestra que el dominio helicoidal está implicado en la transmisión de los cambios conformacionales dependientes de la hidrólisis del ATP.

2.6. Mecanismos de acción de los transportadores ABC

Los transportadores ABC actúan como bombas que transportan sustancias a través de la membrana en contra de un gradiente de concentración, en un proceso que requiere la hidrólisis del ATP. Los diferentes modelos propuestos para explicar cómo ejercen su acción los transportadores ABC son los siguientes:

2.6.1. Modelo de poro (Jones y George., 2000)

Los segmentos transmembrana de los TMDs se orientan formando un poro o canal que atraviesa la membrana, proporcionando un microambiente hidrofílico para el paso de sustratos. La unión del sustrato al transportador desencadena en él, vía hidrólisis del ATP, un cambio conformacional que permite la translocación del sustrato a través del canal.

2.6.2. Modelo de aspiradora hidrofóbica (Gottesman y Pastan, 1993)

Los sustratos se unen al transportador desde el ambiente hidrofóbico de la bicapa lipídica, siendo eliminados de la misma en el momento en que la están atravesando por difusión pasiva. Son numerosos los datos experimentales que apoyan este modelo, válido para transportadores ABC de sustratos hidrofóbicos e incluso para algunos transportadores que tiene por sustrato sustancias hidrofílicas, como es el caso del transportador de glucosa

en bacterias: en él se ha comprobado que el sitio de unión del sustrato es accesible desde la bicapa lipídica.

2.6.3. Modelo de “flipasa” (Higgins y Gottesman, 1992)

Es una variante del modelo anterior, en la cual se propone que el sustrato interacciona con el transportador a nivel de la cara interna de la bicapa lipídica, y el transportador transloca el sustrato desde la cara interna a la externa. Este mecanismo de acción se ha descrito en las proteínas humanas MDR1 y MDR3 (van Helvoort *et al.*, 1996), y en la MRP1 (Kamp y Haest, 1998).

2.7. Regulación de los transportadores ABC

La transcripción de los genes que codifican los componentes de los sistemas de transporte dependiente de una proteína de unión está regulada normalmente por represores y en algunos casos, por activadores.

No es sorprendente que la expresión de los genes que codifican muchos transportadores ABC esté regulada, ya sea en función del tipo celular (un transportador puede ser expresado en unos tipos celulares y no en otros), o bien en respuesta a condiciones de crecimiento específicas. Por ejemplo, muchos sistemas de captación de nutrientes en bacterias sólo se expresan en presencia de su sustrato específico. La actividad de los transportadores, una vez sintetizados, también puede estar regulada: varias quinasas regulan la actividad de la proteína CFTR en función de su grado de fosforilación (Cheng *et al.*, 1991). Otro ejemplo son los transportadores ABC de azúcares secundarios, que son inhibidos por interacción directa con la enzima IIA_{Glc}, un componente del sistema de fosfotransferasa de azúcares.

Más interesante es la posibilidad de cambios en la especificidad de sustrato de los transportadores ABC. El único ejemplo conocido es el de algunos sistemas de captación de nutrientes en bacterias, cuya especificidad varía por asociación alternativa con diferentes receptores periplásmicos (como en el complejo transmembrana HisQMP). Sin embargo, se han sugerido otros posibles ejemplos: el transportador de oligopéptidos de *B. subtilis* (codificado por el locus *spoOK*) posee dos NBDs, OppD y OppF. A diferencia de su sistema equivalente en *S. typhimurium*, OppF no es necesario para el transporte de péptidos

o la esporulación, pero sí lo es para el estado de competencia, con lo que podría alterar la especificidad o alguna otra actividad del transportador (Perego *et al.*, 1991; Rudner *et al.*, 1991). El potencial de esta modulación de los transportadores ABC deberá ser esclarecido en el futuro.

2.8. Tipos de transportadores ABC

Las proteínas ABC vienen siendo objeto de un intenso estudio a raíz de sus implicaciones en diversos procesos biológicos de gran importancia, como la captación de nutrientes esenciales para las células, la protección frente a un amplio rango de compuestos nocivos, la construcción de membranas celulares, la secreción de compuestos lipídicos y péptidos o la regulación del desarrollo de microorganismos y organismos superiores. También es importante la implicación de estas proteínas en el fenómeno de resistencia a múltiples fármacos (MDR, MultiDrug Resistance), observado en bacterias patógenas, protozoos parásitos y células tumorales, y el hecho de que las mutaciones que afectan a los genes que codifican algunas de estas proteínas son la causa en el ser humano de importantes enfermedades congénitas.

Se han descrito representantes de la superfamilia a lo largo de toda la escala biológica, desde arqueobacterias hasta mamíferos. Es en procariotas, donde mejor se encuentra representada la superfamilia, siendo los sistemas de captación de nutrientes en bacterias, o también llamados sistemas de transporte dependientes de proteína de unión a sustratos, los primeros transportadores ABC que fueron descritos y caracterizados (Ames, 1986).

Dentro de la superfamilia ABC, podemos distinguir 3 subfamilias (Fath y Kolter, 1993):

- ✓ Transportadores ABC eucarióticos
- ✓ Exportadores ABC bacterianos
- ✓ Importadores ABC bacterianos ó permeasas periplásmicas

2.8.1. Transportadores ABC eucarióticos

En eucariotas, el transportador se expresa como un único polipéptido formado por dos mitades homólogas, cada mitad contiene un dominio TMD y uno NBD. De hecho, la

mayoría de estos transportadores tienen una duplicación en tándem de la estructura y no parecen requerir de otras subunidades para su función. En eucariotas, los transportadores ABC están implicados en resistencia a drogas, y en células humanas muchos de ellos están asociados con enfermedades (Quentin y Fichant., 2000). Varios de estos sistemas son de una gran importancia médica y han sido objeto de intensos estudios desde su descubrimiento. Ejemplos de estos transportadores son la proteína de resistencia a multidroga, la glicoproteína-P, que exporta drogas quimioterapéuticas de las células tumorales cuando es sobreexpresada, y el regulador transmembrana que es defectivo en pacientes con fibrosis quística. Otros exportadores ABC eucarióticos incluyen pMDR que exporta la droga antimalaria de *Plasmodium falciparum*, ó STE6 que exporta una hormona peptídica (factor-a) de *Saccharomyces cerevisiae* (Ketchum *et al.*, 2001); *S. cerevisiae* tiene dos tipos conjugativos de células: a y α . Este factor es producido por células a, e interacciona con células α , induciendo en éstas cambios en la superficie celular de modo que se asocian y se fusionan con las células a. Una vez se han asociado dos células de tipo distinto, se inicia una compleja serie de acontecimientos que conduce a su fusión así como a la de sus núcleos, dando como resultado la formación de un cigoto diploide (Michaelis y Herskowitz., 1988).

2.8.2. Exportadores bacterianos

Tanto en procariotas como en eucariotas, la mayoría de las proteínas que se exportan fuera de la célula son sintetizadas como precursores con un péptido señal en su extremo N-terminal que las dirige hacia su localización extracelular. En bacterias, la secreción de proteínas dependiente de péptido señal es mediada principalmente por las proteínas Sec (Blight y Holland, 1990), mientras que la exportación independiente de péptido señal es llevada a cabo por los sistemas de secreción tipo I y tipo III (Büttner y Bonas, 2002). El tipo I secreta toxinas, proteasas, lipasas y péptidos de la capa superficial hacia el medio extracelular, mientras que el tipo III media el paso de proteínas de virulencia hacia la célula hospedadora. Son pocas las proteínas carentes de péptido señal, y suelen cumplir funciones secundarias relacionadas con la virulencia. Generalmente los genes que las codifican forman operones junto con los genes que codifican la maquinaria requerida para su exportación. Los sistemas de secreción de tipo I existen en bacterias

gram-positivas y en bacterias gram-negativas, se les denomina también sistemas de secreción ABC. Todos los exportadores bacterianos tienen el motivo de unión a ATP conservado. El dominio que contiene este motivo puede estar en el mismo polipéptido que los dominios transmembrana (como en los exportadores ABC eucariotas) o en un polipéptido separado de los dominios hidrofóbicos (como en los importadores ABC bacterianos). Los exportadores tipo ABC de las bacterias gram negativas están asociados con una proteína de la membrana externa y con la denominada proteína de fusión que presenta un dominio N-terminal de anclaje a la membrana interna y un dominio periplásmico (Wandersman, 1998), facilitando el transporte de proteínas, péptidos, drogas ó carbohidratos a través de las dos membranas de la envoltura celular de bacterias gram-negativas (Dinh *et al.*, 1994).

Dentro de este grupo hay una subdivisión que viene dada por el producto transportado, según sea proteínas, péptidos o sustratos no protéicos.

2.8.2.1. Sistemas de exportación de proteínas y péptidos

A este grupo pertenecen los exportadores bacterianos implicados en la secreción extracelular de una familia de proteínas llamadas toxinas RTX, proteasas extracelulares, antibióticos peptídicos. El determinante hemolisina- α de *Escherichia coli* fue el primer exportador ABC identificado en procariontes. La hemolisina HlyA de *E. coli* es un polipéptido de 107 Kda sintetizado junto con la proteína requerida para su activación (HlyC), con la requerida para su paso a través de la membrana externa (HlyD) y con el transportador ABC (HlyB), el cual media el transporte de la hemolisina a través de la membrana interna (Felmlee *et al.*, 1985). Otros polipéptidos exportados por proteínas ABC en bacterias son las proteasas de *Erwinia* (Letoffe *et al.*, 1990), la ciclosina de *Bordetella pertussis* (Glaser *et al.*, 1988) y la colicina V de *E. coli*, antibiótico activo contra un gran número de bacteria gram-negativas y que actúa alterando el potencial de membrana de la célula (Wilson *et al.*, 1990). Los transportadores ABC implicados en la exportación de proteínas son relativamente específicos para su polipéptido sustrato, reconociendo en ellos motivos estructurales concretos más que secuencias de aminoácidos específicas (Stanley *et al.*, 1991). La mayoría de los péptidos secretados sufren un significativo procesamiento e inusuales modificaciones postraduccionales que dan lugar a residuos tales como la dehydroalanina y lantionina. Los péptidos que contienen lantionina se denominan

lantibióticos. Havarstein y col. identificaron una nueva familia de exportadores ABC de bacteriocinas, que contenían un dominio N-terminal proteolítico, además de los dominios integral de membrana y de unión a ATP, y que transportaban el sustrato al mismo tiempo que lo procesaban proteolíticamente (Havarstein *et al.*, 1995).

2.8.2.2. Sistemas de exportación de sustratos no protéicos

Este tipo de exportador secreta moléculas no protéicas tales como drogas lipofílicas, antibióticos y polisacáridos. Estos sistemas no poseen factores accesorios como es el caso del sistema de la hemolisina o factores de membrana externa como TolC. Un ejemplo son los genes *chvA* y *ndvA*, que codifican para un exportador ABC de β -1,2-glucanos de *A. tumefaciens* y *S. meliloti*, respectivamente. Los β -1,2-glucanos están implicados en la adhesión de la bacteria a las células de la planta. Estos genes son requeridos para la virulencia en el caso de *A. tumefaciens* (Douglas *et al.*, 1985) y para la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en la simbiosis *S. meliloti*-alfalfa (Geremia *et al.*, 1987).

2.8.3. Importadores ABC bacterianos ó permeasas periplásmicas

Estos transportadores están formados por dos proteínas hidrofílicas asociadas a membrana que contienen un dominio de unión al ATP cada una, dos proteínas hidrofóbicas integrales de membrana, y por una proteína de unión al sustrato que generalmente determina la especificidad del sistema. Se encuentra localizada en el periplasma en el caso de bacterias gram-negativas o anclada en la membrana citoplasmática en el caso de bacterias gram-positivas. Los sistemas de transporte dependientes de una proteína de unión al sustrato que median el transporte de una gran variedad de nutrientes, tales como aminoácidos, iones orgánicos, azúcares, vitaminas, péptidos, macromoléculas, etc... representan la subclase de la familia ABC mejor caracterizada. Estos sistemas están equipados con un componente proteico extracelular o periplásmico que actúa captando las moléculas sustrato, y en algunos casos también actúa como quimiorreceptor.

Los transportadores ABC en bacterias son capaces de importar muchos compuestos de bajo peso molecular, por ejemplo, histidina, maltosa, ribosa, oligopéptidos, sulfato... pero no se conocía nada sobre el importe de compuestos de alta masa molecular hasta que

en un aislado del suelo, *Sphingomonas* sp. A1, se observó que el transporte de una macromolécula, el alginato con 27KDa, era mediado por un transportador ABC dependiente de un poro. Es la primera evidencia del transporte de macromoléculas via un transportador ABC (Momma *et al.*, 2000; Mishima *et al.*, 2001).

3. PÉPTIDOS Y TRANSPORTADORES ABC DE PÉPTIDOS

Los sistemas de transporte de péptidos no sólo juegan un importante papel en la nutrición de la célula, sino que en microorganismos están también implicados en varios procesos de señalización, como en la regulación de la expresión génica en sistemas proteolíticos, en el desarrollo de la competencia, en esporulación, en la conjugación, en la quimiotaxis a compuestos, en el desarrollo de la virulencia... Más aún, en bacterias patógenas los sistemas de transporte de péptidos están implicados en la defensa frente a péptidos catiónicos antimicrobianos. El papel regulador de los transportadores de péptidos está en permitir a la bacteria sentir las condiciones ambientales que la rodean y adaptarse a ellas ajustando la expresión de genes específicos (Dunny y Leonard, 1997). En muchos de estos procesos un péptido específico funciona como molécula señal y los transportadores ABC pueden estar implicados en la internalización ó excreción de dicho péptido.

3.1. Papel fisiológico del transporte de péptidos

El papel de los péptidos en el entorno de la bacteria puede ser doble:

- 1.- Los péptidos pueden ser utilizados como fuente de nitrógeno ó energía metabólica, tras su transporte al interior de la célula.
- 2.- Los péptidos pueden informar sobre las condiciones medioambientales que rodean a la bacteria. Como respuesta a los péptidos implicados en señalización, los microorganismos han desarrollado dos estrategias diferentes: en la primera, el péptido se transporta al interior de la célula y funciona intracelularmente, mientras que en la segunda estrategia, el péptido se une a un receptor que transduce la señal a través de la membrana. El primer mecanismo utiliza transportadores ABC y a menudo una proteína de unión a péptidos

específica. El segundo mecanismo es independiente de transportadores ABC e implica a sistemas reguladores de dos componentes.

Los diferentes péptidos señalizadores se transportan fuera de la célula por caminos diferentes. En el caso donde los péptidos son producidos como precursores con una típica secuencia señal, como es el caso del factor que estimula la competencia en *E. faecalis*, (CSF) y de PhrA, es probable que las moléculas sean translocadas a través de la membrana celular via la maquinaria Sec (Kobayashi *et al.*, 2000). Los péptidos señal con la secuencia Gly-Gly en el extremo N-terminal, como el péptido que estimula la competencia en *S. pneumoniae*, son exportados por transportadores ABC con actividad proteolítica para liberar la secuencia señal. Este tipo de sistema de transporte lo utilizan las bacteriocinas (Nes *et al.*, 1996). Las feromonas en levaduras son excretadas por un transportador ABC llamado Ste6P, un homólogo de la proteína de resistencia a multidroga glicoproteína P (Chen *et al.*, 1997).

3.1.1. Captación de nutrientes

La capacidad de las bacterias para crecer y competir depende en gran medida de la eficiencia con la que son capaces de captar nutrientes del medio. Es energéticamente más económico tomar los nutrientes del medio externo que sintetizarlos intracelularmente. Por ejemplo, la síntesis de una molécula de histidina requiere 41 ATP, mientras que sólo se necesitan 1-2 ATPs para su transporte a través de la membrana desde el medio externo. No sorprende, por tanto, que las bacterias desplieguen en sus membranas una plétora de sistemas de captación de nutrientes.

En bacterias, todos los sistemas ABC de captación de nutrientes conocidos requieren un componente periplásmico de unión a sustrato, pero ningún sistema de exportación lo presenta. Esta proteína periplásmica no es esencial para la función del transportador, sino un componente accesorio que parece ser más bien una adaptación específica a circunstancias particulares. Pero ¿cuáles son esas circunstancias?. Las antiguas hipótesis en las que el receptor periplásmico contribuía a aumentar la concentración del sustrato en el periplasma, o de que incrementaba la afinidad del sistema de transporte por el sustrato con relación a otros sistemas han sido descartadas (Hengge y Boos, 1983). Se ha sugerido que la proteína periplásmica facilita el movimiento del sustrato a través del periplasma dado que se encuentra en estado de gel, lo que en condiciones de baja

concentración de sustrato, puede dificultar mucho la difusión (Brass *et al.*, 1986). Pero el descubrimiento de proteínas de unión al sustrato en *Mycoplasma* y otras especies de bacterias gram positivas, las cuales carecen de periplasma, ha hecho que esta hipótesis se ponga en duda.

La proteína de unión al sustrato parece ser sólo importante en procariotas, pues se ven obligados a sobrevivir en medios en los que los nutrientes pueden encontrarse a concentraciones extremadamente bajas, lo que obliga a desarrollar mecanismos que incrementen la eficiencia del proceso de captación de los nutrientes. En las células eucariotas, normalmente expuestas a altas concentraciones de nutrientes, el receptor de unión a sustrato se debe haber perdido a lo largo de la evolución, tal vez porque llegó a ser innecesario.

3.1.2. Fuente de nitrógeno y carbono

La función primaria de los sistemas de transporte de oligopéptidos en bacterias es el transporte de los productos de la lisis de proteínas exógenas y/o reciclaje de los péptidos de la pared celular. La oligopéptido permeasa (Opp) transporta péptidos que contienen 3-5 aminoácidos y en *E. coli* está implicada en el reciclaje de los péptidos de la pared celular. Este sistema consta de una proteína periplásmica, OppA, dos proteínas transmembrana, OppB y OppC, y dos proteínas de unión al ATP, OppD y OppE. Se ha demostrado que otra proteína de unión a sustrato llamada MppA, es esencial para el transporte del tripéptido mureína (L-Ala-D-Glu-A₂pm). Esta proteína de unión es un homólogo de OppA (46% de residuos idénticos). Para el transporte del péptido mureína, MppA utiliza los componentes de membrana del sistema Opp. Experimentos de crecimiento revelaron que MppA es necesaria para el crecimiento sobre mureína, mientras que los mutantes con un nivel MppA normal pero sin OppA fueron incapaces de crecer en tripéptidos con enlaces α (Park *et al.*, 1998). Además del transporte de péptidos, a MppA se le ha dado una función como regulador negativo de la resistencia a múltiples antibióticos (MAR) en *E. coli*, ya que en ausencia de MppA, la célula exhibe todas las propiedades asociadas con el fenotipo MAR (Hongshan y Park, 1999).

Lactococcus lactis es una bacteria auxótrofa para múltiples aminoácidos y requiere el importe de estos aminoácidos o de péptidos para su crecimiento. Para estos organismos, las proteínas exógenas tales como caseínas representan una importante fuente de nitrógeno.

En el caso de *L. lactis* se ha observado que la β -caseína es degradada a péptidos de entre 5 y 30 residuos aminoacídicos y una fracción substancial de éstos son importados hacia la célula via el sistema Opp. Se ha demostrado que la Opp de *L. lactis* acepta péptidos en el rango de 5 a 10 residuos cuando éstos son suplidos con una mezcla de péptidos derivados de la β -caseína (Kunji *et al.*, 1998). Además de Opp, *L. lactis* posee al menos otros dos sistemas de péptidos, el transportador ABC dipéptido permeasa (Dpp) y el transportador DtpT que funciona con la fuerza protón-motriz. Ambos son específicos para di- y tripéptidos, y no tienen un papel nutricional directo. Los di- y tripéptidos afectan la expresión de varios componentes del sistema proteolítico, como son la proteinasa PrtP, las peptidasas PepN y PepC, y diferentes sistemas de transporte de péptidos. Tanto para bacterias gram-negativas como gram-positivas, se ha observado que la expresión del operón Dpp está regulada por los nutrientes presentes en el medio. La expresión de la Dpp en *Bacillus subtilis* es reprimida por aminoácidos y fuentes de carbono rápidamente metabolizables como la glucosa. En condiciones de limitación de nutrientes, como ocurre en la fase estacionaria temprana y al principio de la esporulación, el sistema Dpp es expresado al máximo (Mathiopoulos *et al.*, 1991; Slack *et al.*, 1991; Slack *et al.*, 1995). El operon Dpp de *E. coli* está sujeto a una regulación por nitrógeno pero no por carbono; *dppA*, el primer gen del operon Dpp, es reprimido por la presencia de casaminoácidos (Olson *et al.*, 1991). Además, el operon Dpp muestra una expresión dependiente de fase estacionaria (Abouhamad y Manson, 1994).

El sistema Dpp de las cepas de *Streptococcus* del grupo A, está implicado en el transporte de aminoácidos esenciales y afecta a la expresión de una cisteín-proteasa (Podbielski y Leonard, 1998).

3.1.3. Esporulación

La formación de esporas en la bacteria gram-positiva *Bacillus subtilis* es un ejemplo de diferenciación unicelular que ocurre en respuesta a una limitación de nutrientes. La iniciación de la esporulación en *Bacillus subtilis* es un proceso complejo sensible al estado metabólico, al medio ambiente y al ciclo celular de un organismo que ha tomado la decisión de cesar el crecimiento vegetativo y dirigir toda su energía hacia la diferenciación. El primer indicio de la activación del desarrollo es la transcripción de genes que están bajo el control del factor de transcripción SpoOA (Hoch, 1993). Esta proteína

requiere fosforilación para ser activa y el nivel de fosforilación de SpoOA está regulado por un sistema de transducción de señales (Burbulys *et al.*, 1991). *B. subtilis* produce un factor extracelular que es requerido para una eficiente esporulación. El factor de diferenciación extracelular es resistente al calor, sensible a proteasas y dializable, lo que indica que es, al menos en parte, un oligopéptido (Grossman y Losick, 1988). Se han encontrado mutantes en un sistema de transporte tipo ABC que codifica para un oligopéptido permeasa (opp), mutantes de *Bacillus* en este sistema están bloqueados en el primer paso de la esporulación (Perego *et al.*, 1991). El defecto en esporulación de los mutantes Opp⁻ es debido a la incapacidad para transportar dicho factor.

3.1.4. Competencia

Los péptidos extracelulares son señales para la competencia de *Streptococcus pneumoniae* (Havarstein *et al.*, 1995) y *Bacillus subtilis* (Magnuson *et al.*, 1994). La competencia es la capacidad de ligar e internalizar ADN exógeno. La competencia estimulada por péptidos ha sido identificada en unos pocos organismos.

En *S. pneumoniae* la feromona proviene del producto del gen *comC*, un pre-péptido de 41 aminoácidos que contiene un sitio de procesamiento consenso Gly-Gly encontrado en bacteriocinas. El péptido es exportado por un transportador ABC especializado, codificado por los genes *comAB*. El péptido maduro tiene 17 aminoácidos y no es transportado al interior de la célula, se une a un receptor histidina kinasa (*comD*) que forma parte de un sistema regulador de dos componentes. El receptor fosforila a un regulador (*comE*) y este factor de transcripción causa la desregulación de *comCDE* y otros operones implicados en el desarrollo de la competencia (Havarsteinein *et al.*, 1995).

En *B. subtilis*, la competencia es un estado fisiológico, distinto del crecimiento vegetativo y de la esporulación, que ocurre al principio del crecimiento exponencial tardío bajo determinadas condiciones nutricionales (Turgay *et al.*, 1998). En *B. subtilis* hay dos péptidos señales que están implicados en competencia: ComX, un péptido de 9 ó 10 aminoácidos que promueve la competencia, y el factor estimulador de la competencia (CSF), un péptido pentamérico con la secuencia ERGMT y derivado de un precursor de 40 residuos aminoácidos. Además del papel en el desarrollo de la competencia, CSF también está implicado en la regulación de la esporulación. El péptido ComX interacciona con un sistema regulador de dos componentes de una forma comparable a lo descrito para

ComCDE de *S. pneumoniae*. CSF es transportado via Opp (codificado por *spoOK*) y funciona intracelularmente. CFS tiene diferentes efectos según la concentración a la que se encuentre dentro de la célula. A bajas concentraciones, CFS estimula la expresión de genes necesarios para la competencia, mientras que a altas concentraciones el efecto del péptido es doble, inhibe la expresión de los genes implicados en el desarrollo de la competencia y, al mismo tiempo, estimula la expresión de los genes implicados en la esporulación (Lazizzera *et al.*, 1997). Similar a ComX, el cual es específico para el desarrollo de la competencia, PhrA, un péptido pentamérico (ARNQT) derivado de un pre-péptido de 44 aminoácidos, está específicamente implicado en la estimulación de la esporulación. PhrA funciona dentro de la célula, como CSF, y es transportado via Opp.

3.1.5. Conjugación

En bacterias gram positivas, la conjugación es la transferencia de ciertos plásmidos desde células donadoras en respuesta a señales (feromonas sexuales) producidas y excretadas por las células receptoras. Las feromonas son péptidos hidrofóbicos pequeños, de siete u ocho aminoácidos, que son transportados hacia las células donadoras por los componentes de membrana de la Opp.

En *Enterococcus faecalis*, la transferencia conjugativa del plásmido pCF10 desde la célula donadora ocurre en respuesta a feromonas sexuales producidas por la célula receptora (Clewell, 1993). La transferencia del plásmido pCF10 resistente a tetraciclina es estimulada por unas pocas moléculas de la feromona cCF10. La exposición de las células donadoras a la feromona cCF10 lleva a la activación de las funciones de conjugación codificadas por los genes *prg* (genes de respuesta a feromonas). El gen *prgB*, que codifica para Asc10, una adhesina de superficie celular que contribuye a la formación de un complejo estable entre las células donadora y receptora (Olmsted *et al.*, 1991) es inducido después del transporte de la feromona. La expresión de las funciones de conjugación es controlada por circuitos reguladores positivos y negativos (Kao *et al.*, 1991). Los elementos de control positivo son el producto del gen *prgS* y los productos de RNA, Q_s y Q_L , transcritos desde *prgQ* y secuencias 3' no codificantes (Chung y Dunny, 1992; Cheng *et al.*, 1995). La región de pCF10 que codifica el control negativo abarca a todas las secuencias determinadas en el plásmido requeridas para la señalización (Hedberg *et al.*, 1996). PrgZ es la proteína de unión a cCF10 y muestra gran homología a OppAs (proteína

periplásmica del operón Opp) de varios géneros bacterianos (Ruhfel *et al.*, 1993). PrgZ, la proteína de unión de alta afinidad codificada por el plásmido de las células donadoras, recluta a las proteínas OppB, C, D y F para procesar la señal cCF10 a concentraciones fisiológicas de feromona. En mutantes en PrgZ, pero con un sistema Opp funcional, la señalización todavía ocurre pero son requeridas altas concentraciones de la feromona. Esto indica que OppA es capaz de unir la feromona pero con una menor afinidad que PrgZ. Otra proteína de unión a feromona, TraC, está implicada en la transferencia del plásmido conjugativo pPD1 de *E. faecalis*. La identidad media entre TraC y PgrZ es del 87%. A diferencia de PrgZ, TraC no usa Opp para el transporte de la feromona, sino que interacciona con componentes de membrana de otro transportador ABC (Figura I.6).

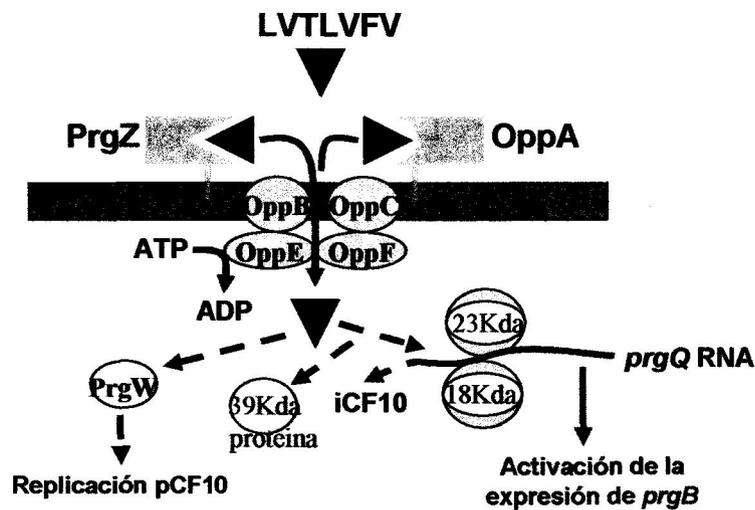


Figura I.6. Modelo del mecanismo de producción, transporte y respuesta a la feromona cCF10 en *E. faecalis*.

3.1.6. Quimiotaxis

La quimiotaxis bacteriana provee de un sistema modelo simple para estudio análogo a las complejas respuestas sensoras que ocurren en los organismos eucarióticos. El mecanismo de la quimiotaxis es bastante complejo e implica muchas proteínas diferentes. Algunas de ellas, proteínas sensoras, están en la membrana plasmática y son las que

“sienten” la presencia de compuestos atrayentes ó repelentes. Estas proteínas permiten a la célula seguir un gradiente de concentración en el tiempo y de acuerdo con ello la bacteria se moverá hacia el atrayente o huirá del repelente. Las proteínas sensoras se denominan proteínas de quimiotaxisceptoras de grupos metilos (MCPs), ó simplemente transductores. Las MCPs se unen directamente a los atrayentes o los repelentes o indirectamente a través de proteínas periplásmicas.

En *Escherichia coli*, la metilación y desmetilación de cuatro proteínas de membrana relacionadas (proteínas quimiotácticasceptoras de metilos ó MCPs), es esencial para la quimiotaxis y la transducción de señales (Hazelbauer y Harayama, 1983). Tres de estas proteínas, Tar, Tsr y Tgr tienen asignado un papel en quimiotaxis. La proteína Tar media la aproximación a atrayentes fuertes como el ácido L-aspártico y maltosa y la repulsión a Ni^{2+} y Co^{2+} (Springer *et al.*, 1977). La proteína Tsr media la aproximación a L-serina (y aminoácidos relacionados) y la repulsión a ciertos repelentes. La proteína Tgr es requerida para la aproximación a galactosa y ribosa. Entre las tres proteínas de transducción se pueden explicar las respuestas bacterianas a todos los atrayentes y repelentes conocidos que requieren un transductor de señalesceptor de grupos metilo. Existe un cuarto transductor de señales, la proteína Tap (taxis asociada a proteínas). Tap es un transductor de señales que capacita a la célula para responder quimiotácticamente a dipéptidos. La taxis a péptidos requiere la función de un componente periplásmico de la dipéptido permeasa. Esta proteína representa el primer ejemplo de quimiorreceptor periplásmico que no tiene como sustrato un azúcar (Manson *et al.*, 1986).

Para provocar una respuesta quimiotáctica, los atrayentes de aminoácidos se unen directamente a uno u otro de los transductores de señales. En cambio, los azúcares se unen primero a proteínas de unión de alta afinidad localizadas en el periplasma, la unión induce un cambio conformacional en la proteína que permite al complejo proteína de unión-sustrato interactuar con el transductor apropiado.

3.1.7. Virulencia

Los péptidos antimicrobianos catiónicos son componentes importantes de la defensa innata de animales y plantas contra infecciones bacterianas. Los péptidos pequeños pueden adoptar estructuras α -hélices anfipáticas y formar canales en las membranas celulares. El espectro de actividad de estos péptidos es amplio e incluye a bacterias gram-

positivas y gram-negativas y hongos. Los péptidos antimicrobianos son encontrados en aquellas partes del organismo que más posibilidad tienen de entrar en contacto con organismos patógenos, como las superficies epiteliales (Hancock y Scott, 2000).

Las bacterias patógenas han desarrollado mecanismos para resistir la actividad formadora de poros de estas moléculas. Un patógeno intracelular facultativo como es *S. typhimurium* puede replicarse dentro de los macrófagos y resistir la batería de péptidos catiónicos que se encuentran dentro de los gránulos lisosomales. Para identificar los determinantes de resistencia a péptidos antimicrobianos, se obtuvieron mutantes hipersensibles a dichos péptidos en *S. typhimurium*. El operon Sap (sensitivity to antimicrobial peptides) es necesario para la resistencia a protamina. Este operón está formado por cinco genes (*sapA*, *sapB*, *sapC*, *sapD* y *sapF*) y el sistema exhibe similitud con la superfamilia de transportadores ABC. La proteína de unión al sustrato SapA tiene un identidad muy alta con proteínas receptoras implicadas en el transporte de péptidos (Parra-López *et al.*, 1993). El papel del sistema *sap* en virulencia ha sido recientemente cuestionado, debido a que mutantes de *E. coli* con una incrementada capacidad para el importe de K^+ son menos sensibles a protamina independientemente de si hay un sistema *sap* operativo o no. Esto ha conducido a la hipótesis de que la protamina forma un canal a través del cuál el K^+ abandona la célula, y que el alto flujo de K^+ puede rescatar a la célula hasta que la protamina es detoxificada (Stumpe y Bakker, 1997). Además del posible papel del sistema *sap* en resistencia a péptidos antimicrobianos, han sido implicados otros mecanismos de defensa. Se ha propuesto que la resistencia a péptidos antimicrobianos implica una disminución de la adherencia de los péptidos a la membrana externa de la bacteria. Otro posible mecanismo de resistencia implica la activación de la expresión de *pgtE*, una endopeptidasa de membrana externa que rompe los péptidos neutralizando así su toxicidad (Bishop *et al.*, 2000; Guina *et al.*, 2000). La resistencia a péptidos antimicrobianos que forman canales iónicos podría depender de tres mecanismos diferentes: cambios en la membrana externa de la bacteria para prevenir la adherencia de los péptidos; expresión elevada de la endopeptidasa de membrana externa PgtE para degradar los péptidos; y el transporte de los péptidos antimicrobianos hacia la célula donde son degradados por el sistema proteolítico intracelular.

3.1.8. Otros procesos asociados al transporte de péptidos

Alternativamente al transporte de moléculas reguladoras, el proceso de transporte puede en sí mismo tener alguna función reguladora. Por ejemplo, la proteína de membrana PhoU es expresada junto con el transportador de fosfato de *E. coli* y, aunque no es esencial para el transporte del fosfato, regula el metabolismo del fosfato en la célula; se sospecha que PhoU interacciona con el transportador y, de alguna manera, actúa como un sensor que detecta el evento del transporte, iniciando su función reguladora.

La bacteria filamentosa *Streptomyces coelicolor* tiene un estilo de vida multicelular en el cuál el control de la señalización célula-célula es esencial para la formación de un tipo celular que forma esporas, llamado hifas aéreas. El operon *bldK* codifica para un grupo de genes que son requeridos para la eficiente producción de hifas aéreas en *S. coelicolor*. La secuencia de ADN del operon *bldK* muestra homología con los componentes de los transportadores transmembrana de la familia ABC. *bldK* es un importador ABC de oligopéptidos, que media el transporte de una molécula señal extracelular, probablemente un oligopéptido, producida bajo control de la bacteria, que es parte de una posible cascada de señalización que regulan la formación del micelio (Nodwell *et al.*, 1996; Nodwell y Losick, 1998).

Streptococcus pyogenes es un patógeno humano que expresa una gran variedad de factores de virulencia. SpeB es una cisteín-proteasa que juega un importante papel en promover la invasión de los tejidos. La expresión de SpeB es dependiente de un regulador positivo, Mga, y un operón Opp funcional. La disrupción del operón Opp afecta a la producción de SpeB (Podbielski *et al.*, 1996). Sobre la base de esta regulación por Mga, el gen *speB* es considerado miembro del regulón *vir*. El regulón *vir* consiste en un número de genes de virulencia corregulados por *mga*. Junto al gen *mga* se encuentra un transportador de dipéptidos, que suple a la célula con aminoácidos esenciales. La expresión del sistema Dpp está afectada por el factor de virulencia Mga. Dpp influencia positivamente la expresión de SpeB, mientras que no tiene efecto sobre la expresión de Opp. Esto indica que existe una unión entre las rutas nutricionales (metabólicas) y la expresión de factores de virulencia (Podbielski y Leonard, 1998).

4. INTERACCIÓN MICROORGANISMO-PLANTA

Las bacterias clasificadas dentro de la familia *Rhizobiaceae* tienen en común su capacidad de asociarse con plantas. En algunos casos como *Agrobacterium*, la interacción es de tipo patogénica, mientras que en el resto de géneros *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, comúnmente englobados como *Rhizobium*, la interacción es de tipo mutualista, estableciéndose simbiosis fijadoras de nitrógeno con plantas leguminosas. En estas simbiosis la bacteria proporciona a la planta una fuente de nitrógeno exclusiva, el dinitrógeno atmosférico, en tanto que la planta aporta un nicho ecológico particular para la bacteria, los nódulos de las leguminosas. La importancia de esta simbiosis viene determinada no sólo por el volumen de nitrógeno fijado que aportan a la biosfera, sino también por la importancia agronómica de las leguminosas, que constituyen una de las principales fuentes de proteínas para la alimentación humana y animal.

4.1. Interacción *Rhizobium*-leguminosa

El establecimiento de simbiosis fijadoras de nitrógeno entre plantas leguminosas y bacterias de la familia *Rhizobiaceae* es el resultado de un continuo y adecuado intercambio de señales entre planta y bacteria (Broughton *et al.*, 2000) que culmina con la formación del nódulo fijador. Se conocen al menos tres grupos de señales que son intercambiadas entre planta y bacteria durante el establecimiento simbiótico. Por un lado, los flavonoides exudados por la planta activan la expresión de un grupo de genes bacterianos (Dowling *et al.*, 1986; Gaworzewska *et al.*, 1982), los genes de la nodulación (*nod*, *nol*, *noe*), que son los encargados de la biosíntesis de los denominados factores Nod. Estos compuestos, que constituyen el segundo grupo de señales, son lipo-quitina-oligosacáridos que inducen en la raíz vegetal una serie de respuestas dirigidas a la formación del nódulo (Mylona *et al.*, 1995) y a facilitar su infección por la bacteria. Un tercer grupo de señales son los polisacáridos de superficie de la bacteria: genes *exo* para exopolisacárido, *ndv* para glucanos, *lps* para el lipopolisacárido (Leigh y Coplin, 1992; Breedveld y Miller, 1994), necesarios para el desarrollo adecuado de los canales de infección, por los que las bacterias alcanzan el córtex nodular, en donde serán endocitadas por las células vegetales. Las bacterias endocitadas no entran en contacto directo con el citoplasma vegetal, sino que son

rodeadas por una membrana vegetal, conformándose así la unidad mínima, el simbiosoma. Esta estructura básica, constituida por un microorganismo rodeado de una membrana que lo separa de la célula hospedadora, no es única de esta simbiosis, sino que está conservada estructuralmente en muchas otras endosimbiosis. Desde que el *Rhizobium* es endocitado hasta que se activa el proceso de fijación de nitrógeno, ocurren una serie de cambios morfológicos y metabólicos en ambos simbiosomas, seguramente como resultado del intercambio de nuevos grupos de señales todavía desconocidas. En el caso de las bacterias, éstas deben diferenciarse en los llamados bacteroides, caracterizados por un tamaño y morfología diferentes a los de las bacterias en vida libre. En el bacteroide se expresan otros genes simbióticos que codifican para las proteínas necesarias para la reducción del dinitrógeno por la enzima nitrogenasa (genes *nif* y *fix*; Fisher, 1994). En los simbiosomas, los bacteroides detienen los procesos de división celular, y todavía existen dudas de si estas formas celulares están diferenciadas de manera terminal y por tanto son incapaces de desdiferenciarse y retornar a un crecimiento vegetativo tras la desintegración del nódulo

4.1.1. Genes que intervienen en la interacción *Rhizobium*-leguminosa

Durante la interacción con la planta, *Rhizobium* está expuesto a tres ambientes diferentes: primero la rizosfera, después el cordón de infección y por último el compartimento simbiosomal. Se han identificado y caracterizado diversos regulones de genes que se expresan específicamente en cada uno de estos ambientes (Long, 1989; Denarié *et al.*, 1992). Los genes de nodulación (*nod*, *nol*, *noe*) están implicados en las etapas tempranas de la interacción bacteria-planta, incluyendo la producción de factores Nod. Mutaciones en estos genes impiden ó retrasan la infección de la planta por parte de la bacteria (van Rhijn y Vanderleyden, 1995; Long, 1996). También hay genes encargados de la producción de EPS, LPS y polisacáridos capsulares (*exo/exp*, *lps*, *rpk*) que son necesarios para la invasión bacteriana. Mutaciones en estos genes provocan generalmente el aborto de los cordones de infección, provocando la formación de pequeños nódulos que no contienen bacterias y que son Fix^- . Otros genes (*nif* y *fix*) se expresan en bacteroides de nódulos maduros y codifican para la nitrogenasa y otras proteínas importantes para la fijación de nitrógeno.

Se conocen otros genes bacterianos que bloquean la simbiosis entre la infección del nódulo y el comienzo de la fijación de nitrógeno. Algunos de estos genes no son específicos para la simbiosis en sí, pero son requeridos para la adaptación fisiológica de la bacteria al entorno, dentro del nódulo o bajo condiciones de vida libre. Este grupo incluye funciones tales como biosíntesis de aminoácidos y otras moléculas, metabolismo del carbono y complejos respiratorios para el crecimiento microaeróbico. Ejemplos son los mutantes *ilvC* de *S. meliloti* muestran un fenotipo Nod^- en alfalfa (Aguilar y Grasso, 1991), el gen *ilvC* codifica para una acetohidroxiácido isomeroreductasa, enzima que participa en la ruta biosintética de la isoleucina y la valina. El gen *leuA* de *S. meliloti* codifica para una α -isopropilmalato sintasa la cual cataliza el primer paso específico en la ruta biosintética de la leucina, mutantes en el gen *leuA* son incapaces de nodular alfalfa (Sanjuán-Pinilla *et al.*, 2002). Auxótrofos para purinas de *S. meliloti* forman nódulos Fix^- , en los cuáles se puede ver la curvatura del pelo radical y cordones de infección normales (Dickstein *et al.*, 1991; Swamynathan y Singh, 1992). Por otra parte, mutantes *PyrF* de *S. fredii*, deficientes en la biosíntesis de uracilo, forman pseudonódulos carentes de bacterias en su interior, en raíces de soja y algunas otras plantas hospedadoras (Ollero *et al.*, 2000), fenotipo similar al mostrado por cepas Ura^- de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (George y Robert, 1991). Mutantes *hemA* de *S. meliloti* no pueden sintetizar el grupo hemo, y las bacterias no son liberadas de los cordones de infección (Dickstein *et al.*, 1991). Los mutantes *cyc* carecen de citocromos tipo c en la cadena respiratoria y no llevan a cabo la fijación de nitrógeno (Kereszt *et al.*, 1995).

El establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas es un proceso complejo, cuyo estudio está proporcionando métodos de mejora de la eficiencia fijadora de estos sistemas, y por tanto de mejora cualitativa y cuantitativa de los cultivos de leguminosas. Los conocimientos adquiridos en estos estudios están además siendo aplicados a muchas otras interacciones, mutualistas y patogénicas, así como a investigaciones de biología del desarrollo en plantas y animales (Baker *et al.*, 1997)

4.2. Interacción microorganismo-planta: mutualismo & patogénesis

Dentro de las interacciones microorganismo-planta, existen diferencias según se trate de una interacción patogénica o de una simbiosis mutualista como la que tiene lugar entre

las bacterias conocidas como rizobios y las plantas leguminosas. Mientras en la primera la planta desarrolla una enfermedad que irá en detrimento de su crecimiento y producción, en la segunda los dos organismos que forman la simbiosis, resultan beneficiados. No obstante, cuando se analiza en detalle estas interacciones, se observa que tienen bastantes puntos en común, no sólo desde el punto de vista de la respuesta de la planta a la presencia del microorganismo (Downie y Young, 2001), sino incluso en las armas que la bacteria utiliza para llegar a establecer la interacción con la planta. *Sinorhizobium meliloti*, está siendo foco de estudio debido a la simbiosis que establece con su simbionte alfalfa, y debido que al pertenecer al grupo de las α -proteobacterias, está íntimamente relacionado con patógenos de plantas y animales como son *Agrobacterium* y *Brucella* (Galibert *et al.*, 2001). La formación del nódulo es un proceso complejo que requiere de un continuo intercambio de señales entre los dos socios. En primer lugar, los flavonoides exudados por las raíces de las leguminosas inducen la expresión de unos genes esenciales en el proceso de nodulación: los genes nod. El resultado de la expresión de estos genes es la aparición de una serie de proteínas que intervienen en la síntesis y transporte de una molécula señal: los factores Nod o Lipoquitooligosacáridos. Estos compuestos por sí solos y en una concentración muy baja son capaces de inducir una serie de respuestas en la planta, necesarias para la infección y posterior nodulación. Una de las principales características de esta interacción es su especificidad: sólo determinadas especies rizobianas pueden infectar a determinadas leguminosas. Tanto la bacteria como la planta están implicados en determinar la especificidad de hospedador: la bacteria mediante la producción de factor Nod, la planta expresando los genes necesarios para el reconocimiento de dicho factor Nod. Esta especificidad recuerda a la interacción gen-a-gen que tiene lugar en una interacción incompatible entre plantas resistentes y patógenos avirulentos. Según este modelo, una planta mostrará resistencia a un patógeno sólo cuando posea un gen de resistencia capaz de reconocer el correspondiente gen *avr* o de virulencia del teórico patógeno.

Además de la existencia de barreras físicas y químicas que se encuentran presentes antes de que ocurra la interacción con el microorganismo, las plantas han desarrollado un mecanismo de protección en respuesta al ataque por patógenos: cuando un gen incompatible de la planta reconoce el producto del correspondiente gen *avr* de un patógeno potencial, se inicia la activación de reacciones de defensa. Este mecanismo de protección, a

menudo suele estar asociado a lo que se conoce como respuesta de hipersensibilidad (HR). Esta reacción defensiva está caracterizada por una rápida muerte celular en el sitio de la infección cuya misión es la de limitar la colonización del patógeno. Como resultado de la HR, va a ocurrir la activación transcripcional a nivel localizado de genes de defensa. Entre estos genes están los que codifican enzimas de la ruta fenilpropanoide. Algunas de estas enzimas están implicadas en la biosíntesis de fitoalexinas, compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular que se acumularán en el sitio de la infección, así como en la síntesis de SA, una molécula que desempeña un papel clave en defensa. Otro de los sucesos que ocurren rápidamente tras el reconocimiento del patógeno es la activación de una NAPDH oxidasa de membrana. El resultado es la rápida producción de radical superóxido, el cual dismuta rápidamente, bien espontáneamente, bien en una reacción catalizada por un enzima, la SOD, en una especie más estable como es el peróxido de hidrógeno o agua oxigenada. La acumulación de estas especies activas de oxígeno (ROS) es lo que se conoce como explosión oxidativa, y cumple una misión importante en reacciones de defensa: tienen actividad antimicrobiana, pueden provocar insolubilización de las proteínas de la pared celular, pueden actuar como moléculas señal que intervienen en activación génica, pueden disparar la apoptosis.

En el caso de la interacción *Rhizobium*-leguminosa, se ha observado una acumulación de fitoalexinas, si bien esta acumulación es inferior a la observada en respuesta a patógenos, una expresión de genes de la ruta fenilpropanoide; una acumulación de flavonoides en exudados radicales; una activación de las actividades quitinasa y peroxidasa; modificaciones de la pared celular. Algunas de estas respuestas son especialmente intensas en mutantes alterados en la producción de EPS y LPS, componentes superficiales de la bacteria de naturaleza polisacárida que se piensa sirven para bloquear la respuesta defensiva de la planta; muerte celular característica de una respuesta de hipersensibilidad (HR), aunque *Rhizobium* es capaz de suprimir la respuesta defensiva de la planta, sólo un pequeño porcentaje de infecciones desemboca en la formación de un nódulo fijador. Eso se debe a que la planta está continuamente ejerciendo control sobre el número de nódulos que va a llegar a formar. Se ha comprobado que la infección por *Rhizobium* puede ser detenida por una reacción similar a HR y en la que los dos simbiontes sufren muerte celular; acumulación de SA; existencia de un pulso oxidativo...

Las bacterias pertenecientes al género *Rhizobium* son capaces de inducir la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en las raíces de plantas leguminosas. El desarrollo de estos nuevos órganos depende de un complejo intercambio de señales entre ambos simbios. *Rhizobium* sobrevive dentro de la planta rodeado de una membrana peribacteroidea, la cuál es derivada de la pared celular vegetal. *Rhizobium* siempre ha sido considerado desde el punto de vista de la bacteria fijadora en simbiosis mutualista con su leguminosa correspondiente. Se ha llegado a un conocimiento bastante exhaustivo tanto del microsimbionte en sí como de la interacción con su hospedador específico. Sin embargo, los diferentes estudios realizados han proporcionado datos sobre aspectos desconocidos, algunos de los cuáles tienen interesantes implicaciones en patología animal y vegetal. Como se ha visto recientemente, *Rhizobium* es capaz de deslizarse de una forma organizada por una superficie semisólida como algunos patógenos de animales o plantas, *Proteus* o *Pseudomonas*, respectivamente. Este carácter ha sido asociado en estas últimas bacterias con una mayor capacidad invasora, mejor adhesión o con la facilidad para la formación de biopelículas. Por otra parte, los estudios de genómica comparada han mostrado una gran homología en ciertas regiones del ADN entre *S. meliloti* y *Brucilla* (DelVecchio *et al.*, 2002). Dicha homología concuerda con su propia fisiología pues ambas bacterias son capaces de establecerse endocelularmente de forma semejante con independencia del origen vegetal o animal de la célula hospedadora. Un tercer aspecto a considerar es la relación que existe entre simbiosis mutualista, como la establecida entre *Rhizobium* y su leguminosa, y patogénesis. Toda planta manifiesta una respuesta defensiva, de semejante naturaleza, frente a cualquier estrés biótico o abiótico. Ante la presencia de un agente, como pueda ser *Rhizobium* y otro patógeno, la planta inicialmente no distingue, pero no tarda en responder para defenderse de este último o para poner en marcha mecanismos que permitan la infección controlada del primero.

Se han identificado en *S. meliloti* algunos componentes bacterianos implicados en patogénesis. El gen *bacA* codifica para un putativo transportador de la membrana citoplasmática identificado en *S. meliloti* y en *B. abortus*, ambas bacterias son endosimbiontes que tras sufrir una serie de cambios, establecen una infección crónica en compartimentos intracelulares, siempre separados del citoplasma eucariota. Mutantes de este gen en *S. meliloti* tiene un fenotipo Fix⁻, no hay diferenciación de bacteria en bacteroide (Oke y Long, 1999) y mutantes de *B. abortus* se ha visto que sobreviven menos

dentro de macrófagos. Los sistemas reguladores de dos componentes (proteína sensora/proteína reguladora) han sido encontrados en diferentes patógenos, como *B. abortus* (BvrS/R), *A. tumefaciens* (ChvG/I) y también en *Rhizobium* (ExoS/ChvI). Mutantes de *Brucella* muestran menor capacidad invasiva, menor supervivencia y menor capacidad replicativa dentro de la célula eucariótica, mutantes de *Agrobacterium* no inducen formación de tumores y mutantes de *S. meliloti* están alterados en la síntesis de exopolisacárido (EPS). Estos mutantes presentan alteraciones en componentes de membrana externa, lo que provoca una menor resistencia a compuestos antimicrobianos y una menor supervivencia, en general. Los genes de síntesis y transporte de β -(1,2)-glucanos han sido identificados en *S. meliloti* (*ndvAB*) y en *A. tumefaciens* (*chvAB*), mutantes *ndv*⁻ forman pseudonódulos y mutantes *chv*⁻ son avirulentos. El sistema de secreción tipo III (TTSS), es un sistema complejo de más de 20 elementos de secreción de proteínas, está presente en patógenos animales y vegetales y ha sido identificado en *Rhizobium* spp., *S. fredii* y *B. japonicum*, el funcionamiento de este sistema de secreción requiere el contacto con la célula hospedadora. El sistema de secreción tipo IV (genes *virB*) han sido identificados en el plásmido Ti de *A. tumefaciens* (mutantes *virB*⁻ son avirulentos), en el plásmido a de *R. etli* y en el pSyma de *S. meliloti*. Por último, los genes reguladores de factores de patogenicidad (*rpf*) han sido identificados en los fitopatógenos *X. campestris* y *X. fastidiosa*, en los cuáles mutantes *rpf*⁻ son menos virulentos, y en *S. meliloti* se ha identificado un gen *rpfB* (*fadD*) que desempeña un papel en nodulación y en el control de la motilidad (swarming) (Soto *et al.*, 2002).

4.3. Papel de los transportadores ABC en la interacción *Rhizobium*-leguminosa

Existen evidencias de la implicación de los sistemas de transporte tipo ABC en interacciones patógeno-hospedador. *S. tiphymurium* y *E. chrysanthemi*, patógenos animal y vegetal respectivamente, infectan a su hospedador y evitan la respuesta defensiva de éste rodeándose de una membrana mediante un proceso de endocitosis. Se ha observado que mutaciones en un determinado sistema de transporte de péptidos provoca la disminución o pérdida de la virulencia de estas bacterias.

Por otro lado, también se conoce la implicación de los transportadores ABC en diferentes procesos de morfogénesis. En *B. subtilis* el inicio de la esporulación es

producido por una señal que entra en la bacteria a través de la oligopéptido permeasa (sistema de transporte tipo ABC, que transporta péptidos nutricionales de entre 3-5 aa). La diferenciación de *Sinorhizobium meliloti* es un proceso prácticamente desconocido. La información existente es todavía parcial e inconexa, y no permite la elaboración de hipotéticos mecanismos de intercambio de señales bacteria-planta a este nivel. El estudio de los sistemas de transporte de péptidos en esta bacteria y su posible implicación en simbiosis, podría aportar algún tipo de información sobre este proceso de diferenciación.

Dentro del género *Rhizobium* existen varios transportadores que se han visto implicados en la simbiosis. Un ejemplo de esto, son los productos de los genes *nodIJ* (McKay y Djordjevic, 1993; Spaink *et al.*, 1995; Cárdenas *et al.*, 1996). Los factores Nod sintetizados en el interior de la bacteria son transportados al exterior gracias a los productos de estos genes. Las proteínas NodI y NodJ son similares a proteínas de secreción de factores Nod y en el fenotipo simbiótico, lo cual sugiere la existencia de sistemas de transporte alternativos (Spaink *et al.*, 1995). La proteína NodT está relacionada con la familia de proteínas de membrana externa que se encargan de la secreción de sustratos a través de las membranas externa e interna. Por analogía con estos sistemas de secreción, se ha sugerido que NodT puede formar parte del sistema de secreción de factores Nod, junto con NodI y NodJ. Además, NodT permite a cepas de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* nodular el cultivar Woolgenellup (Lewis-Henderson y Djordjevic, 1991), lo que sugiere que el transporte de los factores Nod también pueda tener efecto en la especificidad de hospedador. Mutantes en el sistema de transporte tipo ABC de dicarboxilatos fallan en el transporte de ácidos C₄-dicarboxílicos (fuente de carbono y energía suplida por la planta) y los bacteroides son degradados antes de la maduración (Engelke *et al.*, 1989). Los genes *prsDE* codifican un sistema de secreción tipo I que exporta diferentes proteínas (Finnie *et al.*, 1997; York y Walker, 1997). Aunque los mutantes *prsD* o *prsE* de *S. meliloti* no tienen fenotipo simbiótico (York y Walker, 1997), las células de los mutantes *prsD* de *R. leguminosarum* biovar *viciae* forman bacteroides pero no fijan nitrógeno, implicando que al menos una proteína no identificada es requerida para la maduración o la fijación de nitrógeno (Finnie *et al.*, 1997). En *Bradyrhizobium japonicum*, el gen *sipS* codifica una peptidasa señal que corta secuencias señal de proteínas durante su exportación (Müller *et al.*, 1995a). Las células del mutante *sipS* son liberadas del cordón de infección pero inducen respuestas de defensa en la planta, presumiblemente debido a la carencia del

transporte de una proteína desconocida (Müller *et al.*, 1995b). En *S. meliloti*, el gen *bacA* está implicado en la formación del bacteroide. Las células mutantes son liberadas del cordón de infección pero sufren senescencia antes del comienzo de la formación del bacteroide (Glazebrook *et al.*, 1993). El gen *bacA* codifica para un putativo transportador de membrana interna con 7 dominios transmembrana, y se ha hipotetizado que podría ser requerido para el transporte de algún componente que jugaría un papel importante en el desarrollo del bacteroide o en el mantenimiento de la integridad de la membrana (Ichige y Walker, 1997). El gen *bacA* muestra una alta homología con la proteína SmbA de *E. coli*, que está implicada en el transporte de microcina B17, microcina J25 y bleomicina (Glazebrook *et al.*, 1993). Este gen también es requerido para la supervivencia de *Brucella abortus* dentro de los tejidos hospedadores (Le Vier y Walker, 2001). En el establecimiento de infección crónica, tanto *Rhizobium* como *Brucella* son endocitados por las células hospedadoras, en donde sufren cambios adaptativos y donde viven prolongados periodos (LeVier *et al.*, 2000). En *S. meliloti* se conocen otros genes, que no son necesarios para la simbiosis pero que parecen ser críticos para la colonización de las raíces de alfalfa, tal es el caso de los sistemas de transporte para trehalosa, sacarosa y maltosa, dos transportadores que solapan en especificidad (Jensen *et al.*, 2002).



OBJETIVOS

Sinorhizobium meliloti es una bacteria Gram negativa que establece simbiosis fijadoras de nitrógeno con plantas de la familia *Leguminosae*. El establecimiento de estas simbiosis es el resultado de un continuo y adecuado intercambio de señales entre la planta y la bacteria que culmina en la formación del nódulo fijador. Dentro de las células del nódulo, las bacterias se encuentran rodeadas por una membrana de tipo vegetal, formando una estructura denominada simbiosoma. En el simbiosoma la bacteria se diferencia en su forma simbiótica, el bacteroide, que tiene como función la fijación del dinitrógeno atmosférico.

Por un lado, *Rhizobium* sufre un proceso de endocitosis, similar al que sufren bacterias como *S. typhimurium* o *Brucella*. Estas bacterias infectan a su hospedador y evitan la respuesta defensiva de éste rodeándose de una membrana mediante un proceso de endosimbiosis. Existen indicios de que en la interacción *Rhizobium*-leguminosa, la planta pone en marcha mecanismos de defensa similares a los que se desencadenan en una interacción patogénica. Por otra parte, *Rhizobium* sufre un proceso de diferenciación celular, cuyos mecanismos de control son completamente desconocidos.

El estudio de los sistemas de transporte de péptidos en *Rhizobium*, se postuló por el hecho de que estos sistemas de transporte se han visto implicados en numerosos procesos en otras bacterias, como son el desarrollo de la virulencia y de la esporulación, entre otros muchos. Se ha observado que mutaciones en un determinado sistema de transporte de péptidos provoca la disminución o pérdida de la virulencia de bacterias como *S. typhimurium* y *E. chrysanthemi*, y se sabe que en *B. subtilis* el inicio de la esporulación es inducido por una señal externa que entra en la bacteria a través de la oligopéptido permeasa.

Rhizobium es una bacteria que vive intracelularmente durante la fase de bacteroide, al igual que lo hacen *S. typhimurium* o *Brucella* con sus respectivos hospedadores. Se ha visto que la resistencia a péptidos antimicrobianos es importante para la virulencia de algunas de estas bacterias. Por otra parte, una vez en el nódulo *Rhizobium* se diferencia a su forma simbiótica, el bacteroide. *B. subtilis* también sufre un proceso de diferenciación morfológica, denominado esporulación. El proceso de esporulación se desencadena por una señal que entra a la célula a través de un transportador tipo ABC de oligopéptidos. Se ha comprobado que mutantes en este sistema no esporulan. Con estos antecedentes, los objetivos de este trabajo fueron:

OBJETIVOS

- 1.- Caracterización molecular de genes implicados en resistencia a putativos péptidos antimicrobianos de alfalfa y su papel en la simbiosis *S. meliloti*-alfalfa.
- 2.- Caracterización molecular de transportadores de oligopéptidos en *S. meliloti* y su papel en el establecimiento de la simbiosis *S. meliloti*-alfalfa.

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS.

2.1.1. Cepas bacterianas y plásmidos.

Las cepas de *Sinorhizobium meliloti* y *Escherichia coli*, así como los plásmidos utilizados en este trabajo, junto con sus características más relevantes, se indican en las tablas 2.1 y 2.2, respectivamente.

Tabla 2.1. Cepas bacterianas.

Cepa	Características relevantes	Fuente o referencia
<i>S.meliloti</i>		
GR4	Cepa silvestrel; Nod ⁺ , Fix ⁺	Casadesús y Olivares (1979)
GR4SS	Cepa derivada de GR4, resistente a Sm/Spc	Este laboratorio
GRQA1	GR4 <i>oppB</i> ::Tn5; Km ^r	Este trabajo
GR4A1Ω	GR4 <i>oppB</i> ::Ω; Sm ^r , Spc ^r	Este trabajo
GRQB12	GR4 <i>oppA</i> ::Tn5; Km ^r	Este trabajo
GR4B12Ω	GR4 <i>oppA</i> ::Ω; Sm ^r , Spc ^r	Este trabajo
GRQA2	GR4 regulador transcripcional::Tn5; Km ^r	Este trabajo
GR450	GR4 <i>dtpB</i> ::Tn5; Km ^r	Este trabajo
gGR450	GR4 <i>dtpB</i> ::Gm ^r	Este trabajo
GR4NA	GR4 <i>oppB</i> ::Ω- <i>dtpB</i> ::Tn5; Sm ^r , Spc ^r , Km ^r	Este trabajo
GR4NB	GR4 <i>oppA</i> ::Ω- <i>dtpB</i> ::Tn5; Sm ^r , Spc ^r , Km ^r	Este trabajo
GR4NA-R5	GR4 <i>oppB</i> ::Ω- <i>dtpB</i> ::Tn5; Sm ^r , Spc ^r , Km + reversión	Este trabajo
GR4NA-R5g	GR4 <i>oppB</i> ::Ω- <i>dtpB</i> ::aacC1, Sm ^r , Spc ^r , Gm ^r + reversión	Este trabajo
GR4NB-R1	GR4 <i>oppA</i> ::Ω- <i>dtpB</i> ::Tn5; Sm ^r , Spc ^r , Km ^r + reversión	Este trabajo
GR4NB-R1g	GR4 <i>oppA</i> :: Ω- <i>dtpB</i> ::aacC1; Sm ^r , Spc ^r , Gm ^r + reversión	Este trabajo
gNAR5K10	gNAR5 <i>dppB</i> ::Tn5; Sm ^r , Spc ^r , Gm ^r , Km ^r	Este trabajo
gNAR5K11	gNAR5 <i>appB</i> ::Tn5; Sm ^r , Spc ^r , Gm ^r , Km ^r	Este trabajo
gNBR1K50	gNBR1 <i>dppB</i> ::Tn5; Sm ^r , Spc ^r , Gm ^r , Km ^r	Este trabajo
GR4(<i>dppA/B</i>)	GR4 con delección en el gen <i>dppA</i> y <i>dppB</i>	Este trabajo
GR4(<i>dppB</i>)	GR4 con cassette de Km en el gen <i>dppB</i> ; Km ^r	Este trabajo
Sap2	GR4SS <i>exoT</i> ::Tn5; Sm ^r , Spc ^r , Km ^r	Este trabajo
Sap4	GR4SS <i>exoT</i> ::Tn5; Sm ^r , Spc ^r , Km ^r	Este trabajo
Sap5	GR4SS <i>ureE</i> ::Tn5; Sm ^r , Spc ^r , Km ^r	Este trabajo
Sap6	GR4SS <i>exoU</i> ::Tn5; Sm ^r , Spc ^r , Km ^r	Este trabajo

MATERIAL Y MÉTODOS

Sap12	GR4SS <i>ndvB</i> ::Tn5; Sm ^r , Spc ^r , Km ^r	Este trabajo
Sap14	GR4SS <i>Y01361</i> ::Tn5; Sm ^r , Spc ^r , Km ^r	Este trabajo
Sap21	GR4SS <i>hutU</i> ::Tn5; Sm ^r , Spc ^r , Km ^r	Este trabajo
Sap23	GR4SS <i>exoU</i> ::Tn5; Sm ^r , Spc ^r , Km ^r	Este trabajo
Sap24	GR4SS <i>Y01826</i> ::Tn5; Sm ^r , Spc ^r , Km ^r	Este trabajo
GR4(<i>oppA-lacZ</i>)	GR4 con <i>oppA-lacZ</i> ; Tc ^r	Este trabajo
GR4A1Ω(<i>oppA-lacZ</i>)	GR4A1Ω con <i>oppA-lacZ</i> ; Sm ^r , Spc ^r , Tc ^r	Este trabajo
GR4B12Ω(<i>oppA-lacZ</i>)	GR4B12Ω con <i>oppA-lacZ</i> ; Sm ^r , Spc ^r , Tc ^r	Este trabajo
GR450(<i>oppA-lacZ</i>)	GR450 con <i>oppA-lacZ</i> ; Km ^r , Tc ^r	Este trabajo
GR4(<i>dtpB-lacZ</i>)	GR4 con <i>dtpB-lacZ</i> ; Tc ^r	Este trabajo
GR4(<i>dppB-lacZ</i>)	GR4 con <i>dppB-lacZ</i> ; Tc ^r	Este trabajo
gNBR1(<i>dppB-lacZ</i>)	GR4NB-R1g con <i>dppB-lacZ</i> ; Tc ^r	Este trabajo
1021	Derivado de 2011, cepa silvestre; Sm ^r	Meade <i>et al.</i> , (1982)
1021A1Ω	1021 <i>oppB</i> ::Ω; Sm ^r , Spc ^r	Este trabajo
1021B12Ω	1021 <i>oppA</i> ::Ω; Sm ^r , Spc ^r	Este trabajo
<i>E. coli</i>		
S17.1	<i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>recA</i> , <i>hsdR</i> , <i>hsdM</i> , RP4Tc::Mu, Km::Tn7; Tp ^r , Sm ^r , Spc ^r	Simon <i>et al.</i> , (1983)
DH5α	<i>supE44</i> , <i>ΔlacU169</i> , <i>f80</i> , <i>lacZΔM</i> , <i>5hsdR171</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi1</i> , <i>relA1</i>	BRL®

Tabla 2.2. Plásmidos.

Plásmidos	Características relevantes	Fuente o referencia
pUC18	Vector de clonación; Ap ^r	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , (1985)
pBSKS(+)	Vector de clonación; Ap ^r , <i>lacZ</i> , <i>oriFl</i>	Stratagene®
pSUP202	Vector de clonación pBR325:: <i>mob</i> , <i>oriT</i> de RP4; Tc ^r , Cm ^r , Ap ^r	Simon <i>et al.</i> , (1983)
pSUP2021	Vector derivado de pSUP202 que contiene Tn5; Km ^r , Cm ^r , Ap ^r	Simon <i>et al.</i> , (1983)
pMP220	Vector IncP para fusiones <i>lacZ</i> Tc ^r	Spaink <i>et al.</i> , (1987)
pHP45Ω	Cassette Sm/Spc; Sm ^r , Spc ^r , Ap ^r	Prentki y Krisch. (1984)

pHP45Ω-Km	Cassette Km; Km ^r , Ap ^r	Prentki y Krisch, (1984)
pK18mobsac	pK18 derivado, casete de sensibilidad a sacarosa (<i>sacB</i>), Km ^r	Schäfer <i>et al.</i> , (1994)
pGUS3	Derivado de pBI101 (CLONTECH) conteniendo la fusión transcripcional <i>nfeD</i> ::GUS, Km ^r	García Rodríguez, (1998)
pMS255	Vector que contiene el gen <i>aacC1</i> (Gm ^r); Ap ^r , Gm ^r	Becker <i>et al.</i> , (1995)
pGemT	Vector de clonación con extremos <i>EcoRV</i> y terminal 3' con cola de poli T; Ap ^r	Promega
pGRQA1	pUC18 con fragmento <i>EcoRI</i> que contiene inserción Tn5 del mutante GRQA1; Ap ^r , Km ^r	Este trabajo
pGRQA1Ω	pGRQA1 con un cassette Sm/Spc; Ap ^r , Sm ^r , Spc ^r	Este trabajo
p202-A1Ω	pSUP202 con fragmento <i>EcoRI</i> de pGRQA1Ω Ap ^r , Sm ^r , Spc ^r , Tc ^r	Este trabajo
pGRQB12	pUC18 con fragmento <i>EcoRI</i> que contiene inserción Tn5 del mutante GRQB12; Ap ^r , Km ^r	Este trabajo
pGRQB12Ω	pGRQB12 con un cassette Sm/Spc ^r ; Ap ^r , Sm ^r , Spc ^r	Este trabajo
p202-B12Ω	pSUP202 con fragmento <i>EcoRI</i> de pGRQB12Ω Ap ^r , Sm ^r , Spc ^r , Tc ^r	Este trabajo
pGRQA2	pUC18 con fragmento <i>EcoRI</i> que contiene inserción Tn5 del mutante GRQA2; Ap ^r , Km ^r	Este trabajo
pGRQA2Ω	pGRQA2 con un casete Sm/Spc ^r ; Ap ^r , Sm ^r , Spc ^r	Este trabajo
p202A2Ω	pSUP202 con fragmento <i>EcoRI</i> de pGRQA2Ω; Ap ^r , Sm ^r , Spc ^r , Tc ^r	Este trabajo
pGR450	pUC18 con fragmento <i>EcoRI</i> que contiene inserción del mutante GR450; Ap ^r , Km ^r	Este trabajo
pGR450g	pGR450 con cassette de Gm; Ap ^r , Gm ^r	Este trabajo
p202GR450g	pSUP202 con fragmento <i>EcoRI</i> de pGR450gm; Ap ^r , Gm ^r , Tc ^r	Este trabajo
pSap2	pUC18 con Fragmento <i>EcoRI</i> que contiene inserción del mutante Sap2; Ap ^r , Km ^r	Este trabajo
pSap4	pUC18 con Fragmento <i>EcoRI</i> que contiene inserción del mutante Sap4; Ap ^r , Km ^r	Este trabajo
pSap5	pUC18 con Fragmento <i>EcoRI</i> que contiene inserción del mutante Sap5; Ap ^r , Km ^r	Este trabajo
pSap6	pUC18 con Fragmento <i>EcoRI</i> que contiene inserción del mutante Sap6; Ap ^r , Km ^r	Este trabajo

pSap12	pUC18 con Fragmento <i>EcoRI</i> que contiene inserción del mutante Sap12; Ap ^r , Km ^r	Este trabajo
pSap14	pUC18 con Fragmento <i>EcoRI</i> que contiene inserción del mutante Sap14; Ap ^r , Km ^r	Este trabajo
	inserción del mutante Sap19; Ap ^r , Km ^r	Este trabajo
pSap21	pUC18 con Fragmento <i>EcoRI</i> que contiene inserción del mutante Sap21; Ap ^r , Km ^r	Este trabajo
pSap23	pUC18 con Fragmento <i>EcoRI</i> que contiene inserción del mutante Sap23; Ap ^r , Km ^r	Este trabajo
pSap24	pUC18 con Fragmento <i>EcoRI</i> que contiene inserción del mutante Sap24; Ap ^r , Km ^r	Este trabajo
pK18-K50 <i>XhoI</i>	delección del gen <i>dppA</i> , clonado en pK18; Km ^r	Este trabajo
pK18-K11 <i>NotI</i>	delección del gen <i>appB</i> , clonado en pK18; Km ^r	Este trabajo
pK50	pUC18 con fragmento <i>EcoRI</i> del mutante con Tn5 gNBR1K50; Ap ^r , Km ^r	Este trabajo
pK50Km	pK50 con un cassette Km; Ap ^r , Km ^r	Este trabajo
p202K50Km	pSUP202 con fragmento <i>EcoRI</i> de pK50Km; Ap ^r , Km ^r , Tc ^r	Este trabajo

2.1.2. Medios de cultivo

Las cepas de *E. coli* se cultivaron de forma rutinaria en medio de Luria-Bertani (LB, Miller, 1972):

NaCl.....	5 g
Triptona.....	10 g
Extracto de levadura.....	5 g
Agar (para medio sólido).....	15 g
Agua desionizada.....	1000 ml

Como medio mínimo para *E. coli* se ha empleado el medio M9 (Miller, 1972):

MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0'15 g
Na ₂ PO ₄	6 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl.....	0'5 g
CINH ₄	1 g
Biotina.....	0'0002 g
Pantotenato cálcico.....	0'0001 g
Agua desionizada.....	1000 ml

Se añaden 10 ml de una solución de CaCl₂ 0.01M, 10 ml de una solución al 20% de glucosa después de autoclavar. Ambos medios se prepararon ajustando el pH a 6'8-7'2, y se esterilizaron en autoclave a 120°C durante 20 minutos. El cultivo de células de *E. coli* se realizó a 37°C.

Alternativamente, cuando se ha querido seleccionar *R. meliloti* frente a *E. coli*, se ha empleado ENDO AGAR, un medio selectivo para coliformes y donde *R. meliloti* no crece. Su preparación se realizó siguiendo las recomendaciones de la casa comercial DIFCO: se resuspendieron 41'5 gramos del preparado en 1 litro de agua (desionizada) y se hirvió hasta su completa disolución. Se esterilizó a 120°C durante 15 minutos. Este medio se preparó siempre previamente a su utilización.

Las cepas de *Rhizobium meliloti* fueron crecidas rutinariamente a 28°C en medio TY (Beringer, 1974):

Triptona.....	5 g
Extracto de levadura.....	3 g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0'9 g
Agar (medio sólido).....	15 g
Agua desionizada.....	1000 ml

Como medio mínimo (MM) para *Sinorhizobium meliloti* se ha empleado el medio Robertsens *et al.*, (1981) modificado:

K ₂ HPO ₄	0,3 g
KH ₂ PO ₄	0,3 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,15 g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0,05 g
FeCl ₃	0,006 g
NaCl.....	0,05 g
Glutamato sódico.....	1,1 g
Manitol.....	10 g
Solución de vitaminas.....	1 ml
Agar purificado (medio sólido).....	13 g
Agua desionizada.....	1000 ml

Se ajustó a un pH de 6'8-7'2, y se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 minutos. Se emplea para sembrar las conjugaciones.

Medio mínimo sin glutamato:

Se prepara de la misma forma que el medio mínimo anterior, pero sin adicionar glutamato sódico. El medio se ajustó a un pH de 7'2. Se emplea para determinar la fuente de nitrógeno que puede utilizar *S.meliloti* y derivados mutantes en su crecimiento.

Solución concentrada de vitaminas (1000x):

Biotina.....	0'2 g
HCl de tiamina.....	0'1g
Pantotenato sódico.....	0'1'g
Agua desionizada.....	1000 ml

Esterilizar por filtración. Después de autoclavar se adicionó 1 ml/litro al medio mínimo y medio mínimo sin glutamato.

2.1.3. Antibióticos

La adición de antibióticos a los medios de cultivo se realizó a partir de soluciones concentradas de los mismos en agua desionizada y posterior esterilización con unidades de filtración Minisart® NML (Sartorius) de 0,2µm de tamaño de poro. En el caso de las soluciones de tetraciclina y de cloramfenicol no fue necesaria la esterilización por filtración ya que se empleó alcohol o una mezcla hidroalcohólica para disolverlos. La concentración final de los distintos antibióticos fue la que se indica en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Antibióticos

Antibiótico	Concentración(µg/ml)		
	<i>S.meliloti</i> GR4	<i>S.meliloti</i> 1021	<i>E.coli</i>
Espectinomicina (Spc)	150	150	25
Sulfato de estreptomicina (Sm)	150	150	25
Tetraciclina* (Tc)	10	10	10
Sulfato de kanamicina (Km)	200	200	25
Ampicilina (Ap)	-	-	200
Cloramfenicol** (Cm)	-	-	50
Gentamicina (Gm)	30	20	10

-* La solución concentrada de Tc se preparó en metanol:agua (1:1) o metanol dependiendo de la concentración de la misma (1 ó 10 mg/ml, respectivamente)

-** Para la solución concentrada de Cm se utilizó etanol.

2.1.4. Preparación de péptidos.

Todos los péptidos fueron adicionados al MM a partir de soluciones concentradas. Las soluciones se prepararon a una concentración de 20mM en agua desionizada y se esterilizaron con unidades de filtración Minisart® NML (Sartorius) de 0,2µm de tamaño de poro, conservándolas a 4°C. Se utilizaron a una concentración final de 200µM.

