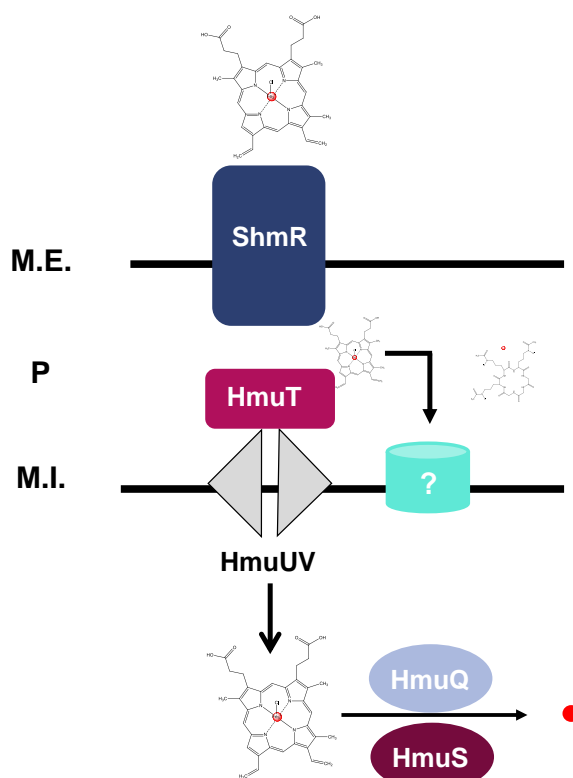


“Elucidación de los sistemas implicados en la captación y utilización de hemina como fuente de hierro nutricional en *Sinorhizobium meliloti* 1021”



Vanessa Amarelle Larrosa

Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, PEDECIBA Biología

Orientadora: Dra. Elena Fabiano; Co-orientador: Dr. Francisco Noya

Tribunal: Dr. Jorge Monza, Dra. Beatriz Garat, Dra. Silvia Batista

Abril 2016

FINANCIACIÓN



AGENCIA NACIONAL
DE INVESTIGACIÓN
E INNOVACIÓN

AGRADECIMIENTOS



University at Buffalo
The State University of New York



Institut Pasteur

I B R



CONICET

U N R

Agradecimientos

Esta tesis significó muchas cosas para mí. Todo el camino recorrido fue un gran aprendizaje y fue extremadamente gratificante poder trabajar en un tema apasionante junto con personas increíbles. Poner por escrito el trabajo de tantos años fue un enorme desafío del cual no fui plenamente consciente hasta que empezó (y por suerte terminó). En todas y cada una de las etapas de este trabajo hubo mucha gente que me enseñó pacientemente, que invirtió tiempo y energía en mi formación. También hubo mucha gente que entendió mis ausencias, mis horarios insólitos y que me acompañó desde otro lugar en este viaje que es “hacer” ciencia. Esta tesis salió finalmente gracias a todas estas personas fundamentales en mi vida y por lo tanto el único comienzo posible es agradeciéndoles infinitamente a cada uno de ellos.

Gracias Elena por dejarme formar parte de esta “familia de hierro” que forjaste. Por compartir sin medida tus ideas, tu experiencia, tu conocimiento. Gracias por comprenderme en momentos en los que me sacó de quicio a mí misma, que últimamente aumentaron de forma exponencial. A vos te debo un enorme crecimiento profesional y personal. Gracias.

Gracias Rosco, Batti y Rufo, tres científicos salados de los que aprendí mucho de ciencia y aún más de la vida. Unos amigos de los buenos, de los que siempre hay que tener donde uno trabaja para que le pongan los pies sobre la tierra y para que las horas no se hagan eternas aunque lo sean. Ustedes hacen que ir a trabajar sea un placer.

Gracias Francisco y Uriel, dos mentes excepcionales que tuvieron mucho que ver con este trabajo. Aprendí mucho de ustedes (aunque no parezca). Gracias.

Gracias a todos y cada uno de mis compañeros del laboratorio que en mayor o menor medida tienen que lidiar conmigo todos los días, los buenos y los malos. Gracias por la paciencia o la impaciencia, ambas ayudan a crecer. Gracias por todos los favores que pedí y que devolvieron sin que hubiera chocolate de por medio. Gracias por no desvalijar por completo mi mesada, en breve volveré.

Gracias infinitas a mis amigos de miércoles por nuestra sana costumbre semanal de bancarnos la cabeza mutuamente con unos fernets de por medio. Gracias al coto por

estar siempre presentes, gente linda si las hay. Sin todos ustedes la vida se haría cuesta arriba. Gracias a mis amigos todos, que por suerte son muchos. Gracias por acompañarme desde otro lugar en esta aventura, por darme para adelante siempre y por compartir su vida conmigo.

Gracias a mis padres, aunque agradecer es un hecho simbólico en este caso porque la palabra queda chica para todo lo implica. Gracias por creer en mí, en mis sueños, en mi pasión por lo que hago. Gracias por el apoyo incondicional. Gracias por darme las herramientas para afrontar la vida y la libertad de hacer con ellas lo que me hiciera feliz. Siéntanse más que satisfechos, hicieron un trabajo excelente. Gracias a mis hermanos que son unos grandes. Gracias por toda una vida de felicidad compartida y muchísimas gracias por regalarme esos niños hermosos que iluminan mi vida. A toda mi familia, gracias por tanto amor.

Índice de Contenidos

RESUMEN GENERAL	4
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	7
LOS RIZOBIOS	7
Historia	9
Fijación biológica de nitrógeno	9
La simbiosis rizobio-leguminosa	11
EL HIERRO.....	15
Importancia biológica del hierro	15
Importancia del hierro en la simbiosis rizobio-leguminosa	16
SISTEMAS DE ADQUISICIÓN DE HIERRO EN BACTERIAS	17
Adquisición del ion ferroso.....	18
Adquisición del ion férrico.....	19
Adquisición de compuestos hemínicos	21
Liberación del hierro hemínico.....	29
REGULACIÓN MEDIADA POR HIERRO	32
Fur y DtxR	33
Regulación de la homeostasis en α -Proteobacterias.....	36
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	41
Denominación	41
El genoma de <i>S. meliloti</i>	43
ADQUISICIÓN DE HIERRO Y SU REGULACIÓN EN <i>S. meliloti</i>	44
Adquisición de hierro en vida libre.....	44
Adquisición de hierro en simbiosis	50
Regulación	54
HIPÓTESIS.....	60
OBJETIVOS.....	60
OBJETIVO GENERAL.....	60
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	60
CAPÍTULO II: ShmR es esencial para la utilización de hemo como fuente de hierro nutricional en <i>Sinorhizobium meliloti</i>	61

RESUMEN	61
OBJETIVOS.....	61
PRINCIPALES RESULTADOS Y CONCLUSIONES	62
CAPÍTULO III: Una novedosa proteína pequeña (HmuP) modula la adquisición de hemina en <i>Sinorhizobium meliloti</i>	66
RESUMEN	66
OBJETIVO.....	67
PRINCIPALES RESULTADOS Y CONCLUSIONES	67
CAPÍTULO IV: La regulación ejercida por la proteína HmuP depende de la presencia de motivos conservados ubicados en la región 5´UTR del gen <i>shmR</i>	81
RESUMEN	81
INTRODUCCIÓN	81
OBJETIVO.....	83
MATERIALES Y MÉTODOS.....	83
Bacterias, plásmidos y condiciones de crecimiento.	83
Generación de la doble mutante HMUP/ Δ rirA.	84
Purificación de ARN.....	84
Determinación del sitio de inicio de la transcripción.....	84
PCR cuantitativa (qPCR).....	85
Análisis de la actividad de la región promotora del gen <i>shmR</i>	85
Evaluación de la expresión de <i>gfp</i> -UV.	87
Clonado, sobreexpresión y purificación de la proteína HmuP recombinante.	87
Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA).	88
Resonancia de plasmones de superficie (SPR).....	88
Co-Inmunoprecipitación (Co-IP).	89
RESULTADOS	91
El gen <i>shmR</i> se transcribe a partir de dos sitios de inicio de la transcripción	91
Análisis <i>in silico</i> de la región corriente arriba de <i>shmR</i>	93
Nucleótidos conservados dentro de las cajas HmuP son importantes para la actividad dependiente de hierro de la expresión de <i>shmR</i>	95
Una región de 176 pb es suficiente para mantener la actividad de la expresión dependiente de hierro.	98
El mecanismo de acción de HmuP es independiente de hierro y de RirA.	101
<i>In vitro</i> HmuP es capaz de unirse a las cajas HmuP identificadas.	102

<i>In vivo</i> HmuP se une a motivos conservados.....	108
DISCUSIÓN	109
CAPÍTULO V: HmuQ y HmuS de <i>Sinorhizobium meliloti</i> degradan hemo <i>in vitro</i> y participan del metabolismo de hemo <i>in vivo</i>	119
RESUMEN	119
OBJETIVO.....	120
PRINCIPALES RESULTADOS Y CONCLUSIONES	120
CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN GENERAL.....	142
ADQUISICIÓN DE COMPUESTOS HEMÍNICOS	¡Error! Marcador no definido.
REGULACIÓN MEDIADA POR HmuP	¡Error! Marcador no definido.
REFERENCIAS.....	142

RESUMEN GENERAL

Sinorhizobium meliloti es una α -Proteobacteria perteneciente a la familia Rhizobiaceae, cuya característica más relevante es su capacidad de establecer asociaciones simbióticas con plantas leguminosas y llevar a cabo el proceso de fijación biológica de nitrógeno. La simbiosis rizobio-leguminosa es un sistema único. Más allá de su indudable importancia económica y ecológica, la utilización de rizobios como modelo de estudio ha contribuido a la comprensión de sistemas biológicos complejos permitiendo nuevos enfoques en el estudio de las interacciones microorganismo-hospedero.

Al igual que la mayoría de los organismos vivos, *S. meliloti* requiere de un correcto suministro de hierro para llevar a cabo los mecanismos bioquímicos básicos necesarios para la vida, pero en particular tiene un papel clave en el ciclo de vida de esta bacteria. En el suelo y la rizósfera es importante para su sobrevivencia y competencia con otros organismos mientras que en la asociación con la planta hospedera es imprescindible para la formación y desarrollo del nódulo así como para la fijación biológica de nitrógeno.

Si bien se desconoce cuál es la fuente de hierro en el nódulo, la gran abundancia de leghemoglobina en los nódulos, hace atractiva la idea de que esta proteína pueda ser la fuente de hierro suministrada por la planta.

La adquisición de compuestos que contienen hemo es uno de los sistemas de adquisición de hierro que emplean los microorganismos. Si bien estos sistemas en un principio se consideraban restringidos a bacterias patógenas de animales, nuestro grupo demostró que *S. meliloti* es capaz de utilizar el hemo como fuente de hierro nutricional. Identificamos una proteína de membrana externa capaz de unirse a la hemina inmovilizada en agarosa y este receptor de compuestos hemínicos se denominó ShmR (*Sinorhizobium heme receptor*).

Considerando estos antecedentes, el objetivo de esta tesis fue profundizar el conocimiento sobre los mecanismos implicados en el uso de compuestos hemínicos como fuentes de hierro en *S. meliloti* 1021. Como primera aproximación nos propusimos determinar la función de ShmR en la fisiología de la bacteria. Mediante la construcción

de una cepa mutante carente del receptor, establecimos el rol de ShmR como único receptor de compuestos hemínicos necesario para utilizar al hemo como fuente de hierro en las condiciones ensayadas, y determinamos que no es esencial para el establecimiento de una simbiosis efectiva (Capítulo II).

Otro de los objetivos de esta tesis fue determinar cómo se regula la expresión del gen *shmR*. Con esta finalidad se realizó una mutagénesis generalizada empleando a la mutante *shmR* como cepa parental. Esta cepa mutante, contiene el gen *shmR* interrumpido con un casete *lacZ-Gm^R* lo cual nos permite, mediante la determinación de la actividad β -galactosidasa, evaluar indirectamente la expresión de *shmR*. Por medio de esta aproximación, identificamos a la proteína pequeña HmuP como un activador específico de la expresión de *shmR*. Determinamos que HmuP se encuentra altamente conservada en Proteobacterias y que co-localiza con genes implicados en la adquisición de hierro. Identificamos la presencia de un motivo altamente conservado en el extremo C-terminal y demostramos su importancia para la actividad de la proteína (Capítulo III). Mediante una aproximación *in silico* encontramos motivos conservados a los que denominamos cajas HmuP ubicados corriente arriba de posibles genes que codifican receptores de hemo, entre ellos *shmR*. Las cajas HmuP están ampliamente distribuidas en Proteobacterias, se ubican en forma de tándem y su presencia se correlaciona con la presencia de genes homólogos a *hmuP* en los genomas. Demostramos la importancia de estas cajas para la correcta activación de la expresión de *shmR* y comprobamos *in vitro* e *in vivo* la capacidad de HmuP de unirse a secuencias de ADN que contengan estos motivos. Los resultados obtenidos sugieren la unión de HmuP a las cajas HmuP como mecanismo de acción de la proteína (Capítulo IV).

En paralelo a la caracterización de ShmR por nuestro grupo, se determinó la participación de HmuTUV en el transporte de hemo a través del periplasma y la membrana interna completando el esquema de transporte a través de las membranas. La siguiente pregunta que nos hicimos entonces fue cuál era el mecanismo implicado en la liberación del hierro hemínico. Es así que surge otro de los objetivos de esta tesis, la identificación de proteínas capaces de llevar a cabo la liberación del hierro hemínico una vez que éste se encuentra en el citosol. El mecanismo utilizado por bacterias para la degradación de hemo implica la participación de enzimas del tipo hemo-oxigenasas. La

búsqueda *in silico* de estas enzimas en el genoma de *S. meliloti* no permitió identificar hemo-oxigenasas clásicas. Sin embargo, se encontró la presencia de dos genes posiblemente involucrados en la degradación de hemo: *hmuS* y *hmuQ*. Demostramos que *in vitro* ambas proteínas son capaces de unir hemo y degradarlo con distinta regio-especificidad. También determinamos que ambas proteínas son importantes, pero no imprescindibles, para la utilización de hemo como fuente de hierro en vida libre y que ninguna de ellas es necesaria para el establecimiento de una simbiosis efectiva (Capítulo V).

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

LOS RIZOBIOS

Las bacterias que fijan nitrógeno en simbiosis con leguminosas en estructuras especializadas denominadas nódulos, son designadas colectivamente rizobios. La palabra rizobio deriva del griego *rhiza* (raíz) y *bios* (vida). Hasta hace muy poco tiempo se consideraba que los rizobios pertenecían únicamente a la clase α -Proteobacterias y al orden Rhizobiales restringiéndose esta característica a cinco géneros: *Azorhizobium* (1), *Bradyrhizobium* (2), *Mesorhizobium* (3), *Rhizobium* (4), y *Sinorhizobium/Ensifer* (5). El estudio de microsimbiontes asociados a leguminosas de escaso uso agronómico permitió el descubrimiento de otros rizobios. En la última actualización (año 2013) del sitio de la Universidad de México dedicado a la taxonomía de rizobios (6), se reportaron un total de 133 especies de rizobios pertenecientes a 12 géneros dentro de las α -Proteobacterias: *Aminobacter* (7), *Azorhizobium* (1), *Bradyrhizobium* (2), *Devosia* (8), *Mesorhizobium* (3), *Methylobacterium* (9), *Microvirga* (10), *Ochrobactrum* (11), *Phyllobacterium* (12), *Rhizobium* (4), *Sinorhizobium/Ensifer* (5) y *Shinella* (13). Con los avances actuales en técnicas de secuenciación masiva y la posibilidad de disponer de genomas bacterianos completos, el área de la sistemática se ha visto revolucionada y la clasificación bacteriana sometida a un proceso de reevaluación. Los rizobios no son ajenos a esta reestructura (14) y es así que frecuentemente surgen nuevos género de rizobios y nuevas reordenaciones. Por ejemplo recientemente se han agregado los géneros *Neorhizobium* y *Pararhizobium* (15–17) y se han encontrado rizobios pertenecientes a los géneros *Burkholderia* y *Cupriavidus* del grupo de las β -Proteobacterias (18–20).

Además de establecer asociaciones simbióticas con leguminosas, los rizobios son microorganismos saprófitos que habitan en el suelo, condición denominada “vida libre”. Suelen localizarse en la superficie de las raíces (rizoplano), en el suelo que rodea inmediatamente la raíz (rizósfera) y en menor cantidad en suelos no rizosféricos. La

rizósfera se define como la zona influenciada por compuestos liberados por la planta a través de sus raíces. Se estima que las plantas liberan entre un 20 % y un 50 % de sus fotosintatos a través de sus raíces. La rizósfera es considerada el mayor y uno de los más complejos ecosistemas de la Tierra donde una gran cantidad de organismos macroscópicos y microorganismos conviven, encontrándose entre ellos a los rizobios [Revisado por Philippot *et al.* (21)].

En la mayoría de los casos el establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa es un proceso altamente específico ya que cada rizobio es capaz de interaccionar con una o muy pocas especies vegetales [Revisado por Cooper, 2004 (22)]. Si bien existen rizobios con un amplio rango de hospedero, como por ejemplo *Rhizobium* sp. NGR234 capaz de nodular 112 géneros de leguminosas (23), éstos son la excepción y no la regla. En la Tabla 1.1 se muestran algunas de estas asociaciones.

Tabla 1.1. Algunas especies de rizobio y su leguminosa hospedera.^a

Especie	Hospedero
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	
<i>bv. phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>bv. trifolii</i>	<i>Trifolium</i>
<i>bv. viciae</i>	<i>Pisum, Lens, Vicia</i>
<i>Rhizobium etli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>Rhizobium tropici</i>	<i>Phaseolus, Leucaena</i>
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>
<i>Sinorhizobium fredii</i>	<i>Glycine, etc.</i>
<i>Mesorhizobium loti</i>	<i>Lotus, Astragalus</i>
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania</i>
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Glycine, Macroptilium, Vigna</i>

^aModificada de Cooper (22).

Historia

Existen referencias escritas del antiguo Egipto, Roma y Grecia describiendo observaciones que indicaban que incluir plantas leguminosas en las rotaciones de cultivos resultaba en una mayor producción de los cultivos de plantas no-leguminosas. En el año 1838 el químico francés Boussingault observó que en suelos donde las plantas no-leguminosas crecían pobremente, las leguminosas sí eran capaces de crecer y sugirió que las primeras podían obtener el nitrógeno del aire. El experimento definitivo llegó casi cincuenta años después, en el año 1886 realizado por los alemanes Hellriegel y Wilfarth. Mediante experimentos en suelos estériles observaron que algunas plantas de arveja eran amarillas y enanas mientras que otras eran verdes y vigorosas. La observación crucial fue la presencia de nódulos en todas las plantas que crecían saludablemente [Revisado por Burris (24)].

La presencia de estas estructuras en las raíces de plantas leguminosas ya había sido descrita por Fuchs en el año 1542 y por Brock en 1556, pero fue Dalechamps en el año 1587 quien los denominó nódulos y los consideró estructuras normales de las plantas. El concepto de nódulo como la formación de una estructura que surge de la asociación entre una leguminosa y una bacteria fijadora de nitrógeno aparece en el año 1888 cuando Beijerinck aísla bacterias de un nódulo a las que llamó *Bacillus radicola*. Posteriormente, en 1889 Frank nombró a esta bacteria *Rhizobium leguminosarum* e identificó más especies pertenecientes al mismo grupo. Estos descubrimientos llevaron rápidamente al uso de bacterias como inoculantes de leguminosas, abriendo el campo de la fijación biológica de nitrógeno [Revisado por Broun *et. al.* (25)].

Fijación biológica de nitrógeno

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) es la conversión, por parte de microorganismos, del N₂ atmosférico a amonio. Esta reducción es catalizada por el complejo nitrogenasa de acuerdo a la siguiente estequiometría:



En la mayoría de los microorganismos capaces de llevar a cabo la FBN, el complejo nitrogenasa está formado por dos proteínas Fe-S: la reductasa de la dinitrogenasa, o proteína Fe (componente II), y la dinitrogenasa, o proteína Mo-Fe-Co (componente I) [Revisado por Monza y Palacios (26)]. La estructura y el mecanismo de acción de la nitrogenasa se esquematizan en la figura 1.1.

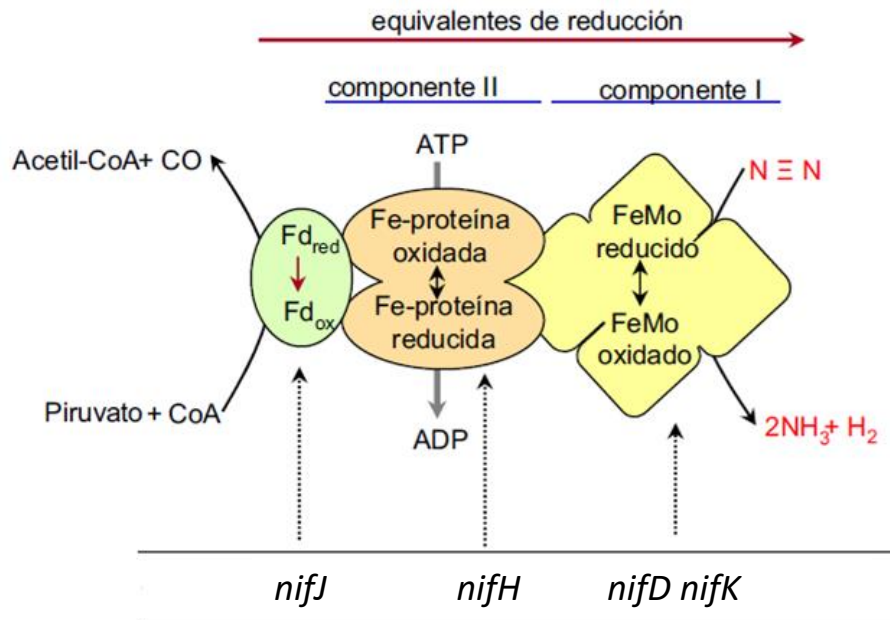


Fig. 1.1 Estructura y función del complejo enzimático de la nitrogenasa. La enzima consta de dos componentes: el componente II o Fe-proteína y el componente I o Fe-Mo-Co. El flujo de electrones se da desde el agente reductor (ferredoxina, flavodoxina o NADPH) al componente II y luego al componente I. La unión e hidrólisis del ATP al componente II son necesarias para la reducción del N_2 por el componente I. Abajo se detallan los genes *nif* que codifican para el transportador de electrones (*nifJ*), para el componente II (*nifH*) y los dos oligómeros del componente I (*nifD* y *nifK*). Tomada de Monza y Palacios (26).

Sólo un grupo minoritario de procariotas, conocidos como diazótrofos o fijadores de nitrógeno, son capaces de llevar a cabo la FBN [Revisado por Monza y Palacios (26)].

Los microorganismos diazótrofos presentan diferentes tipos de nutrición y estrategias para fijar nitrógeno. En la Tabla 1.2 se muestran los principales grupos según estas características.

Tabla 1.2. Géneros representativos de microorganismos diazotófos^a

FIJADORES LIBRES		
Quimiorganotrofos	Fotótrofos	Quimiolitótrofos
Aerobios		
<i>Klebsiella, Azotobacter, Azospirillum, Acetobacter</i>	<i>Anabaena, Nostoc, Calotrix</i>	<i>Alcaligenes</i>
Anaerobios		
<i>Clostridium, Desulfovibrio</i>	<i>Rhodobacter, Chromatium</i>	<i>Methanococcus</i>
FIJADORES SIMBIÓTICOS		
Con leguminosas		
<i>Rhizobium, Sinorhizobium, Mesorhizobium, Bradyrhizobium, Azorhizobium</i>		
Con no leguminosas		
<i>Frankia, Nostoc</i>		

^aTomada de Monza y Palacios (26).

La FBN es responsable de la entrada a los ecosistemas de unas 250×10^6 toneladas de nitrógeno anuales, lo que significa que el 80 % del nitrógeno en los ecosistemas proviene de la atmósfera. La FBN llevada a cabo por fijadores simbióticos incluye a los sistemas más evolucionados y más eficientes en términos de cantidad de nitrógeno fijado [Revisado por Monza y Palacios (26)].

La simbiosis rizobio-leguminosa

La especificidad de la asociación rizobio-leguminosa está dada por un reconocimiento mutuo, el cual es mediado por un diálogo molecular que desencadena programas genéticos en ambos organismos los cuales dan lugar a una secuencia de eventos altamente coordinados que permiten finalmente al establecimiento de la simbiosis y la formación del nódulo [Revisado por Jones *et al.* (27)]. Los rizobios tienen respuestas quimiotácticas frente a diferentes compuestos producidos y exudados por las raíces de las leguminosas, que llevan a estos microorganismos a colonizar y adherirse a las raíces de la planta. La producción de flavonoides (compuestos aromáticos) por parte de la planta hospedera es la primera señal en la interacción. Estos compuestos son secretados a la rizósfera donde funcionan como inductores de los genes *nod* bacterianos, dando

como resultado la producción de factores Nod (lipo-quito-oligosacáridos) por parte de la bacteria. Estos factores Nod activan una compleja ruta de señalización en la planta que comienza a prepararse para recibir a su pareja simbiótica (Fig. 1.2A y 1.2E). Como resultado de la activación de esta ruta de señalización se da la curvatura del pelo radicular atrapando los rizobios que se encuentran adheridos (Fig. 1.2B y 1.2F). Los factores Nod junto con exopolisacáridos simbióticos (β -glucanos secretados por los rizobios) inducen en la planta la formación del hilo de infección, delgados túbulos rodeados por una membrana de origen vegetal repletos de bacterias que penetran en el tejido cortical de manera de permitir su acceso a las células blanco, la células del córtex interno (Fig. 1.2C y 1.2G). Estas células internalizan la bacteria al citoplasma mediante endocitosis, en un compartimento rodeado por una membrana de origen vegetal (membrana peribacteroidal). Este conjunto, compuesto por una o varias bacterias rodeadas de la membrana peribacteroidal es denominado simbiosoma. Una vez dentro del simbiosoma la bacteria sufre un proceso de diferenciación transformándose en bacteroide, que es la forma capaz de llevar a cabo el proceso de fijación de nitrógeno. Esta asociación lleva finalmente a la formación en la planta de estructuras morfológicas especializadas llamadas nódulos, donde tiene lugar la FBN (Fig. 1.2D y 1.2H) [Revisado por Jones *et al.* (27)].

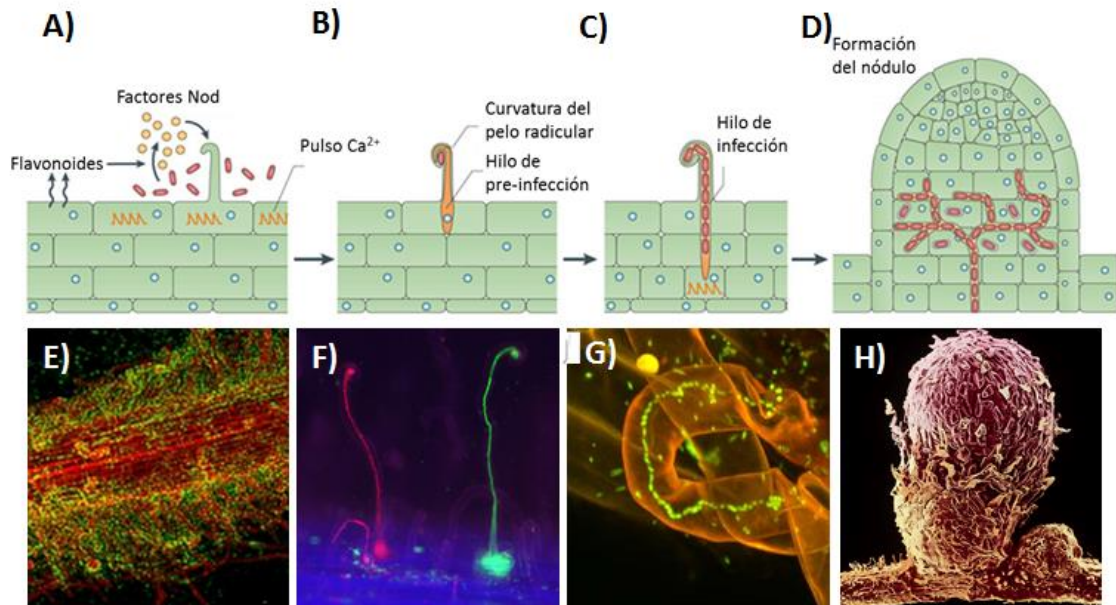


Figura 1.2. Eventos implicados en el establecimiento de la simbiosis y formación del nódulo. (A-D) Esquema representativo de las etapas implicadas en la simbiosis rizobio-leguminosa. **(A)** Los flavonoides liberados por las raíces de la planta leguminosa son reconocidos por los rizobios presentes en la rizósfera, que en respuesta producen factores de nodulación (factores Nod). Los factores Nod desencadenan en la planta la ruta de señalización implicada en el establecimiento de la simbiosis que lleva a oscilaciones de calcio en células epidérmicas en una primera instancia y luego también en células corticales a medida que la colonización avanza. **(B)** Los rizobios ingresan a la planta a través de los pelos radiculares que se curvan alrededor de las bacterias adheridas a la superficie de la raíz, quedando atrapadas en esta estructura. En el sitio de infección se dan cambios a nivel del citoesqueleto y reorganización de organelos para formar el hilo de pre-infección donde luego se formará el hilo de infección. **(C)** Los hilos de infección son invaginaciones de las células vegetales que se inician en el sitio de curvatura del pelo y permite la invasión de los tejidos radiculares por parte de los rizobios. **(D)** Los nódulos se inician debajo del sitio de infección mediante la proliferación de las células corticales que se vuelven meristemáticas. El hilo de infección avanza hacia los nódulos emergentes y se ramifica dentro del tejido del nódulo. Las bacterias son liberadas dentro de las células vegetales en compartimentos rodeados de una membrana de origen vegetal. Dentro de estos compartimentos la bacteria se diferencia a bacteroide, estado en el que es capaz de llevar a cabo la FBN. Tomada de Oldroyd *et al.* (28). **(E-H)** Imágenes representativas de los eventos descritos en A-D. **(E)** Biofilm ocasionado por *R. leguminosarum* bv. *trifolii* en la superficie de la raíz de *Trifolium repens*. Tomada de Robledo *et al.* (29). **(F)** Hilos de infección en alfalfa ocasionados por *S. meliloti* expresando *gfp* (verde) o *DsRed* (roja). Tomada de Gage *et al.* (30). **(G)** hilo de infección ocasionado por *S. meliloti* marcada con Syto13 (verde) en raíces de *Medicago truncatula* teñidas con yoduro de propidio. Imagen tomada por la Dr. Catalina Pislaru (31). **(H)** Microscopía electrónica de barrido de nódulo de *Pisum sativum* inducido por *R. leguminosarum*. Imágen tomada por el Dr. Jeremy Burgess (32).

Según la morfología y desarrollo nodular se distinguen dos tipos de nódulos, los indeterminados y los determinados. Los nódulos indeterminados tienen un aspecto alargado ocasionado por un meristema persistente que continuamente da lugar a nuevas células susceptibles de ser infectadas por los rizobios que se encuentran dentro

del nódulo. Estos nódulos crecen de manera que las células invadidas senescentes se encuentran próximas a la raíz, mientras que las células con bacteroides funcionales ocupan la parte central del nódulo, resultando en un gradiente de etapas de desarrollo (Fig. 1.3). Los nódulos determinados carecen de un meristema persistente, son redondos y no presentan un gradiente de desarrollo como los indeterminados [Revisado por Ferguson *et al.* (33)].

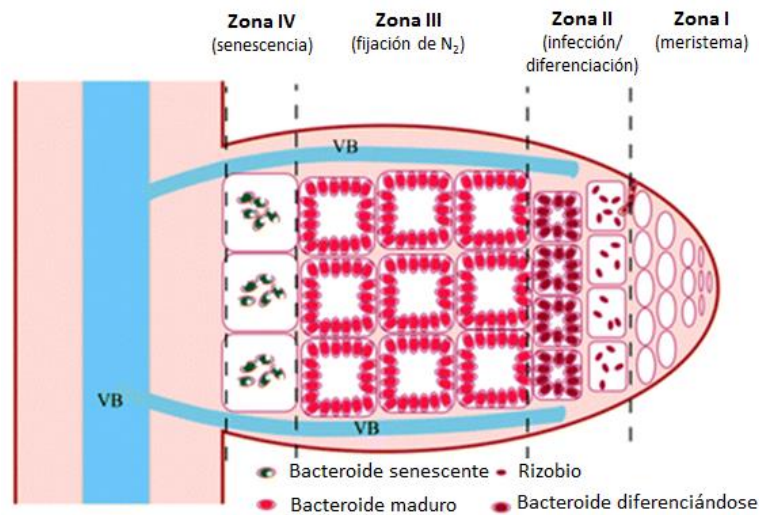


Fig. 1.3. Esquema representativo de las diferentes etapas de desarrollo que presenta un nódulo indeterminado. Los nódulos indeterminados presentan un meristema persistente que da origen a nuevas células susceptibles de ser infectadas (Zona I), lo que les confiere su típica forma alargada. El gradiente de diferenciación se desarrolla desde el meristema hacia la región más próxima a la raíz, definiendo tres zonas. La zona de infección y diferenciación del rizobio en bacterioide se denomina zona II. La región central del nódulo (zona III) está ocupada por los bacteroides activos en donde se da la FBN y finalmente en la zona IV es donde se encuentran los bacteroides senescentes. VB, haces vasculares. Tomada de Rodríguez-Haas *et al.* (34).

La planta utiliza el nitrógeno proporcionado por el bacterioide en forma de amonio para sintetizar sus aminoácidos, otorgando a cambio fuentes de carbono y un ambiente propicio para el desarrollo del microorganismo. El nódulo proporciona además condiciones óptimas para que se dé la FBN. Dado que el complejo nitrogenasa es irreversiblemente inactivado por O₂, los diazótrofos han desarrollado distintos mecanismos de protección. En el caso de los rizobios el mecanismo de protección está dado por la barrera física que significa la presencia del bacterioide dentro de las células del hospedero. Por otra parte, el proceso de FBN es costoso energéticamente y requiere

de una tasa de respiración activa. Para cubrir estas necesidades, las células del nódulo cuentan con una alta concentración de leghemoglobina. La leghemoglobina es una hemoproteína monomérica que actúa como proteína de transporte con alta afinidad por el O₂, cuya función es mantener un correcto suministro de oxígeno en el nódulo de manera que sea suficiente para que tenga lugar la respiración celular pero no afecte la fijación de nitrógeno [Revisado por Monza y Palacios (26)].

EL HIERRO

Importancia biológica del hierro

El hierro es un elemento de transición requerido por prácticamente todos los organismos y su importante rol biológico se debe a la variedad de reacciones en las que participa. Este metal cumple tanto funciones catalíticas como de oxidación-reducción, siendo esta última consecuencia directa de los dos estados redox en los que el hierro se encuentra mayoritariamente presente en los sistemas biológicos: oxidado como ion férrico (Fe³⁺) o reducido como ion ferroso (Fe²⁺). En ambas formas es capaz de adoptar distintas configuraciones electrónicas de baja y alta energía dependiendo del entorno del ligando al que se encuentre unido. Estas propiedades convierten al hierro en un grupo prostético muy versátil y apropiado para cumplir funciones catalíticas o de transporte de electrones, ya sea incorporándose a centros hierro-azufre, al hemo o a proteínas directamente. La importancia de este metal para la vida se ve reflejada en la variedad de procesos biológicos en los cuales las proteínas que contienen hierro participan: biosíntesis de aminoácidos y ácidos nucleicos, transporte de electrones y transporte de oxígeno, fotosíntesis, metanogénesis, fijación de nitrógeno, respiración, ciclo de los ácidos tricarboxílicos y regulación génica [Revisado por Andrews *et al.* (35, 36)].

El hierro es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre representando un 5 % de la misma, y dentro de los metales es el segundo más abundante después del aluminio. En presencia de oxígeno, el ion ferroso es rápidamente oxidado a la forma férrica y como consecuencia esta última resulta la forma más abundante en ambientes

aeróbicos. A pHs alcalinos o neutro, el Fe^{3+} forma $\text{Fe}(\text{OH})_3$ el cual polimeriza con el tiempo formando compuestos de muy baja solubilidad tornándose muy poco biodisponible para las células [Revisado por Andrews *et al.* (35, 36)]. Sin embargo, en los orígenes de la vida previo a la oxigenación fotosintética de la atmósfera por las cianobacterias (2200-2700 millones de años atrás), el hierro se encontraba en su forma ferrosa soluble. Podemos suponer entonces que en los orígenes de la vida el hierro habría sido el grupo prostético ideal considerando su abundancia, disponibilidad y versatilidad. El hecho que la naturaleza haya mantenido, aun en condiciones de poca biodisponibilidad, este metal como un componente esencial de varias proteínas, deja en evidencia las propiedades únicas y cruciales que tiene [Revisado por Ilbert y Bonnefoy (37)].

Importancia del hierro en la simbiosis rizobio-leguminosa

Ya sea en vida libre o en simbiosis, los rizobios al igual que la mayoría de los organismos vivos requieren de un correcto suministro de hierro para llevar a cabo los mecanismos bioquímicos básicos necesarios para la vida.

Se ha demostrado la importancia del hierro para el establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa, siendo la baja disponibilidad del metal un factor que afecta la interacción a distintos niveles: disminuye la competitividad del rizobio para nodular (38), previene el inicio de la formación del nódulo (39) y bloquea el desarrollo de nódulos ya iniciados (40).

También la FBN es un proceso totalmente dependiente de hierro ya que este metal es un componente estructural de varias proteínas claves del proceso como son la nitrogenasa, la hidrogenasa y la leghemoglobina. La nitrogenasa contiene aproximadamente 34 átomos de hierro y constituye cerca del 30 % de las proteínas solubles en el bacteroide (11 % de las proteínas totales). La leghemoglobina en algunos casos puede llegar a representar hasta el 20 % del total de hierro en el nódulo [Revisado por O'Brian y Fabiano (41)].

El hierro también cumple un papel fundamental en el metabolismo de los bacteroides. Éstos tienen una demanda respiratoria muy alta con el fin de proveer a la nitrogenasa del gran contenido de ATP que necesita (16 moléculas de ATP por cada N_2 reducido).

Esta alta tasa respiratoria con poco O₂ disponible, requiere abundancia de citocromos y otras ferro-proteínas (42, 43).

Podemos decir entonces que el hierro tiene un papel fundamental en el ciclo de vida de los rizobios. En el suelo y la rizósfera es importante para la sobrevivencia y competencia de la bacteria mientras que en la asociación con la planta es necesario para la correcta formación y desarrollo del nódulo así como para que se dé una fijación de nitrógeno efectiva.

SISTEMAS DE ADQUISICIÓN DE HIERRO EN BACTERIAS

Si bien el hierro es un elemento sumamente abundante, su baja solubilidad y su unión a proteínas han supuesto un desafío para los microorganismos que habitualmente se enfrentan a condiciones donde la disponibilidad real del metal es muy limitada. Como consecuencia han desarrollado una impresionante variedad de sistemas involucrados en la adquisición y utilización de este metal a partir de las distintas fuentes de hierro presentes en los hábitats que colonizan, lo cual contribuye a su capacidad adaptativa a diferentes nichos.

La manera que las bacterias tienen de lidiar con la brecha entre la solubilidad del ion férrico y los requerimientos de hierro es mediante su solubilización. Esto puede ser llevado a cabo disminuyendo el pH del medio, reduciendo el ion férrico a ferroso, o mediante la utilización de quelantes del ion férrico que actúen como agentes solubilizadores. Por otro lado, aquellos microorganismos capaces de colonizar y sobrevivir en un hospedero han desarrollado mecanismos para obtener el hierro que se encuentra combinado a proteínas encargadas de su transporte o a hemoproteínas presentes en los organismos hospederos [Revisado por Andrews *et. al* (35, 36)].

Usualmente las bacterias exhiben una gran variedad de sistemas de captación de hierro con especificidad para diferentes fuentes del metal, los cuales pueden actuar en distintas condiciones ambientales permitiendo a las bacterias sobrevivir en nichos particulares [Revisado por Andrews *et al.* (35, 36)]. A continuación se detallan los distintos sistemas de adquisición de hierro con énfasis en aquellos involucrados en la captación a partir de compuestos hemínicos.

Adquisición del ion ferroso

La adquisición del ion ferroso tiene un papel importante en ambientes ácidos o en condiciones de anaerobiosis, donde el ion ferroso es estable y mucho más soluble que el ion férrico. En algunos microorganismos como *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori* y *B. japonicum*, la presencia de reductasas férricas extracelulares o ancladas a la membrana convertirían el ion férrico extracelular en ion ferroso, facilitando su transporte por sistemas especializados [Revisado por Andrews *et al.* (35, 36)]. Entre ellos, el transportador FeoABC es el más estudiado. Originalmente fue identificado en *E. coli* y está codificado por el operón *feoABC* el cual es expresado en condiciones anóxicas y de baja disponibilidad de hierro. Una vez que el ion ferroso atraviesa la membrana externa (posiblemente a través de porinas), es captado por la proteína FeoB (proteína integral de membrana interna) que junto a FeoA (proteína citoplasmática) son encargadas de transportarlo a través de la membrana interna en un proceso dependiente de GTP (Fig. 1.4). FeoC estaría involucrado en la regulación del sistema aunque sólo está presente en γ -Proteobacterias [Revisado por Cartron *et al.* (44) y Andrews *et al.* (35, 36)]. Sistemas análogos también están presentes en bacterias Gram positivas.

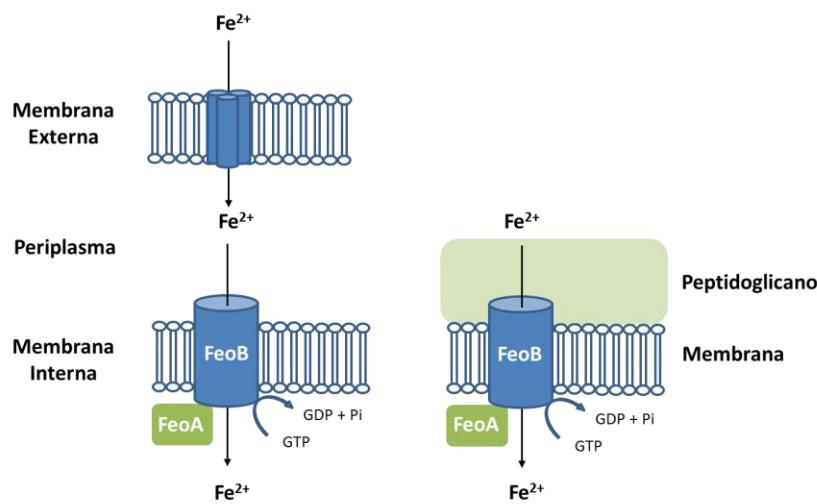


Fig. 1.4. Representación esquemática de la adquisición del ion ferroso por el sistema Feo. Izquierda, sistema Feo en bacterias Gram-negativas; derecha, sistema Feo en bacterias Gram-positivas. En bacterias Gram-negativas el Fe²⁺ extracelular difunde al periplasma a través de porinas. Tanto en bacterias Gram-negativas como en Gram-positivas el Fe²⁺ es transportado al citosol atravesando la membrana citoplasmática en un proceso dependiente de energía mediado por FeoB. La proteína FeoB posee un dominio proteína-G en su extremo N-terminal. Se piensa que la proteína FeoA es necesaria para la actividad máxima de FeoB, quizá mediante la activación de la función GTPasa de FeoB. Adaptada de Andrews *et al.* (36).

Adquisición del ion férrico

Las bacterias son capaces de obtener hierro en la forma férrica mediante la utilización de sideróforos, compuestos de bajo peso molecular (< 2.000 Da) que son excretados al medio extracelular y actúan como quelantes del ion férrico con alta afinidad. Una vez en el exterior, los sideróforos unen y solubilizan el hierro generando un complejo ferri-sideróforo que es posteriormente internalizado [Revisado por Andrews *et al.* (35, 36)]. En bacterias Gram-negativas, el complejo ferri-sideróforo es reconocido por receptores de membrana externa y transportado hacia el periplasma en un proceso dependiente del complejo TonB-ExbB-ExbD. Este complejo, localizado en la membrana interna (ExbB y ExbD) y en el periplasma (TonB), es el encargado de transducir la energía generada en la membrana interna hacia el receptor, ya que no se encuentran sistemas capaces de generar energía a nivel de la membrana externa. Mediante la participación de proteínas periplásmicas, el complejo es presentado a un transportador de tipo ABC (ATP-binding cassette) presente en la membrana interna, el cual es el encargado de su transporte al citosol (Fig. 1.5) [Revisado por Andrews *et al.* (35, 36)].

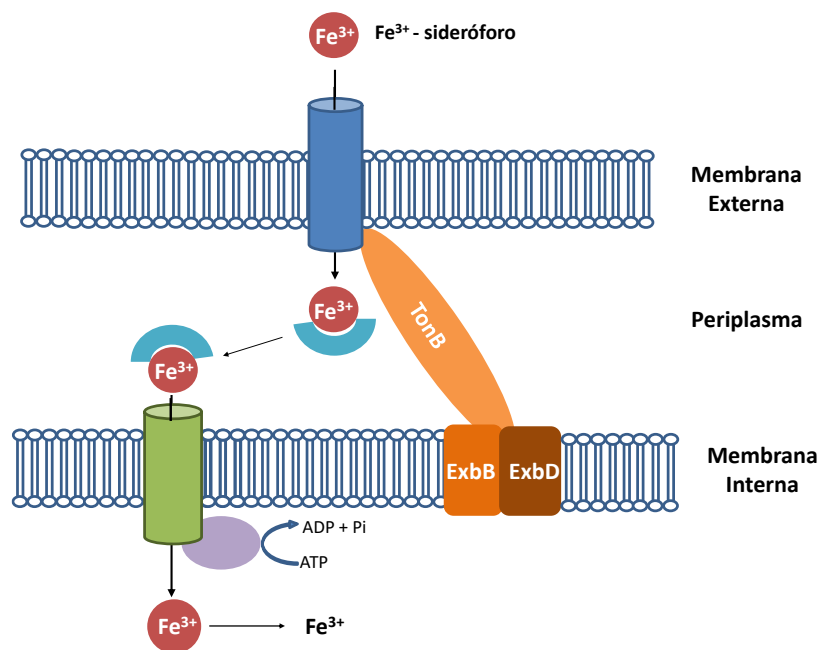


Fig. 1.5. Representación esquemática de la adquisición de hierro mediada por sideróforos en bacterias Gram-negativas. Este sistema requiere de la presencia de un receptor de membrana externa (azul) que reconoce el complejo ferri-sideróforo (rojo), una proteína periplásmica (turquesa) encargada de recibir el sustrato y presentarlo al transportador de tipo ABC ubicado en la membrana interna (verde y violeta). La adquisición del complejo ferri-sideróforo mediada por el receptor de membrana externa requiere la energía suministrada por el complejo TonB-ExbB-ExbD. Adaptada de Andrews *et al.* (36).

Los transportadores de tipo ABC constituyen una de las más grandes superfamilias de proteínas y son responsables del transporte de moléculas a través de las membranas celulares en procesos dependientes de ATP. Están compuestos de dos dominios transmembrana que conforman un canal a nivel de la membrana por donde el ligando es translocado, y dos dominios citosólicos de unión a nucleótidos que unen e hidrolizan ATP (45). En bacterias, la mayoría de los transportadores de tipo ABC involucrados en la adquisición de nutrientes y otras moléculas, dependen de la participación de proteínas periplásmicas de unión (PBP's, periplasmic binding proteins). Las PBP's son proteínas solubles localizadas en el periplasma en bacterias Gram-negativas, mientras que en bacterias Gram-positivas las proteínas análogas son lipoproteínas ancladas en la cara externa de la membrana citoplasmática. Las PBP's se unen de forma específica al sustrato a ser translocado y lo presentan al transportador de membrana interna [Revisado por Davidson *et al.* (46)]. El transporte del complejo ferri-sideróforo en bacterias Gram-positivas requiere la intervención del transportador de tipo ABC y de la presencia de proteínas de unión localizadas en la superficie externa de la membrana citoplasmática (Fig. 1.6) [Revisado por Andrews *et al.* (35, 36)].

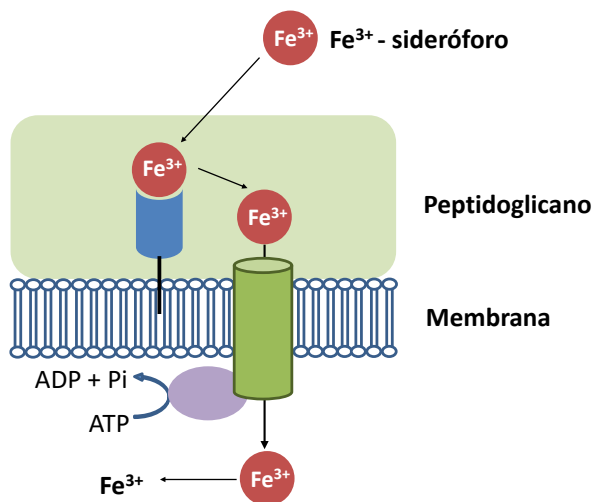


Fig. 1.6. Representación esquemática de la adquisición de hierro mediada por sideróforos en bacterias Gram-positivas. Este sistema implica la participación de una proteína anclada a la membrana (azul), responsable de unir el complejo ferri-sideróforo y presentarlo al transportador de tipo ABC encargado de su transporte al interior celular (verde y violeta). Adaptada de Andrews *et al.* (36).

Una vez en el citosol, el hierro del complejo ferri-sideróforo debe ser liberado para poder ser utilizado. Este evento puede darse mediante la reducción del ion férrico a ferroso por acción de reductasas férricas, teniendo como consecuencia la disociación del complejo dada la baja afinidad del sideróforo por el ion ferroso. Otro de los mecanismos

implica la hidrólisis del sideróforo, dejando el ion férrico libre y susceptible de ser reducido a la forma ferrosa por acción de reductasas férricas [Revisado por Andrews *et al.* (35, 36)].

Las bacterias pueden ser oportunistas respecto a la utilización de este sistema de adquisición de hierro, ya que son capaces de “piratear” sideróforos producidos por otros organismos y captar el hierro combinado a sideróforos que no sintetizan ellas mismas (xenosideróforos) [Revisado por Andrews *et al.* (35, 36)].

Adquisición de compuestos hemínicos

Si bien el término hemo se refiere a la protoporfirina IX ferrosa y hemina al clorhidrato de la forma férrica, es común utilizar indistintamente ambas denominaciones cuando su estado de oxidación no se conoce específicamente o es indiferente. El hemo es un compuesto esencial para la mayoría de los organismos ya que es un grupo prostético en hemoproteínas como la hemoglobina, leghemoglobina, mioglobina, citocromos, catalasas y peroxidasas, participando en procesos biológicos fundamentales como el transporte y almacenamiento de O₂, respiración y transferencia de electrones. En bacterias, el hemo es habitualmente sintetizado *de novo* aunque algunas bacterias carecen de esta ruta de síntesis por lo que deben adquirir de forma exógena el hemo o sus precursores. Además, es una fuente importante de hierro inorgánico para muchas bacterias que han desarrollado mecanismos de adquisición específicos que le permiten obtener esta molécula a partir de proteínas que la contengan o directamente del medio extracelular si la misma se encuentra en forma libre [Revisado por Genco y Dixon (47), y Wandersman y Stojiljkovic (48)].

Adquisición de hemo en bacterias Gram-positivas

En bacterias Gram-positivas, si bien la gruesa capa de peptidoglicano es necesaria para diversas funciones, implica un obstáculo para el transporte de ligandos al interior celular. En el caso particular del hemo, dada su reactividad redox, requiere un transporte secuencial mediado por interacciones proteína-proteína de manera de prevenir la oxidación de lípidos de membrana. Este proceso implica la participación de varias

lipoproteínas ancladas a distintas profundidades de la pared celular [Revisado por Smith y Wilks (45)].

Pocos sistemas de adquisición de hemo han sido identificados y caracterizados en bacterias Gram-positivas. Uno de los más estudiados es el sistema Isd (iron-regulated surface determinant) de *Staphylococcus aureus* (49). Este sistema involucra una maquinaria de adquisición y utilización de hemo compuesta por cinco unidades transcripcionales: *isdA*, *isdB*, *isdCDEFsrtBisdG*, *isdH*, e *isdI*. Estos genes codifican para proteínas de superficie ancladas a la pared celular (IsdABCH), un transportador de membrana de tipo ABC (IsdDEF), dos proteínas citosólicas (IsdGI) encargadas de la liberación del hierro una vez que el hemo alcanza el citosol y una sortasa (StrB) involucrada en el anclaje de IsdC a la pared celular. StrA (cuya secuencia codificante se ubica en otra región del genoma) es la encargada del anclaje de IsdH, IsdB e IsdA [Revisado por Grigg *et al.* (50) y Skaar y Schneewind (51)].

Una característica común de todas las proteínas Isd ancladas a la pared celular es la presencia de al menos un dominio NEAT (near iron transporter), que consiste en una región conservada de aproximadamente 120 aminoácidos implicada en la unión de las hemoproteínas y en el transporte del grupo hemo. IsdB e IsdH, completamente expuestas al medio extracelular, actúan como receptores de compuestos hemínicos y son las encargadas de liberar el hemo de las hemoproteínas. Ambas proteínas son capaces de unir hemoglobina, e IsdH se une además a hemoglobina-haptoglobina. Una vez que el hemo es liberado, es capturado por IsdA (parcialmente expuesta al medio extracelular) y transferido a IsdC mediante la formación de un complejo IsdA-IsdC. IsdC se encuentra escondida dentro de la pared celular y es la encargada de entregar el hemo a IsdE, una lipoproteína de membrana. IsdE entrega el hemo al transportador de tipo ABC para su translocación a través de la membrana citoplasmática. Si bien se especula que este transporte está mediado por las proteínas IsdDEF, éste no parecería ser el único sistema implicado ya que su ausencia disminuye pero no impide por completo el crecimiento de *S. aureus* en presencia de hemo como única fuente de hierro [Revisado por Reniere *et al.* (52) y Maresso y Schneewind (53)]. En la figura 1.7 se esquematiza este sistema.

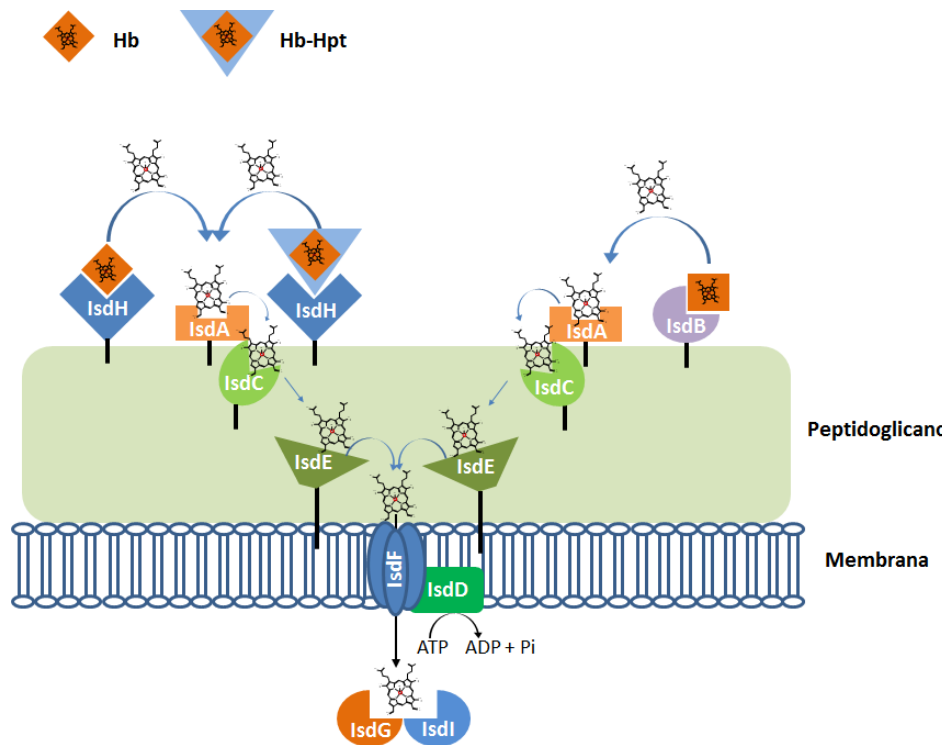


Fig. 1.7. Representación esquemática del sistema de transporte de hemo de *S. aureus*. El transporte de hemo es llevado a cabo por la acción coordinada de nueve proteínas Isd. IsdA, IsdB, IsdC, e IsdH se encuentran unidas covalentemente a la pared celular. IsdE, IsdF e IsdD conforman el transportador de tipo ABC involucrado en el transporte del hemo a través de la membrana citoplasmática. Las proteínas IsdG e IsdI son las encargadas de liberar el hierro del hemo. La preferencia de cada proteína por un ligando determinado se ilustra como Hm (hemo) y Hb-Hpt (hemoglobina-haptoglobina). La vía de transferencia del hemo del sistema Isd se representa con flechas. Adaptada de Grigg *et al.* (50).

El locus *isd* también está presente en otras bacterias Gram-positivas como *Listeria monocytogens*, *Listeria innocua*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* y *Clostridium tetani* [Revisado por Sheldon y Heinrichs (54)].

En el caso de *B. anthracis*, el mecanismo de adquisición de hemo mediado por el sistema *isd* presenta algunas variaciones (55). En este microorganismo, el locus *isd* está compuesto por ocho marcos de lectura abierto: *isdC*, *isdX1*, *isdX2*, *isdE1*, *isdE2*, *isdF-srtB*, *isdG*. Tanto IsdX1 como IsdX2 son secretadas al medio extracelular para captar el hemo presente en la hemoglobina y transferirlo a la proteína de membrana IsdC (Fig. 1.8). El gen más pequeño, *isdX*, contiene un dominio NEAT y está conservado en todos los miembros del grupo *B. cereus* pero ausente en *Staphylococcus*, *Clostridium* y *Streptococcus*. El gen *isdX2* también está conservado y contiene cinco dominios NEAT. (55, 56). El sistema de adquisición de hemo presente en *B. anthracis* es el único sistema

descrito hasta el momento en bacterias Gram-positivas que depende de la liberación de proteínas al medio extracelular para la adquisición de compuestos hemínicos (54). Como se detalla más adelante, este sistema basado en proteínas secretadas denominadas hemóforos ha sido descrito en una variedad de bacterias Gram-negativas.

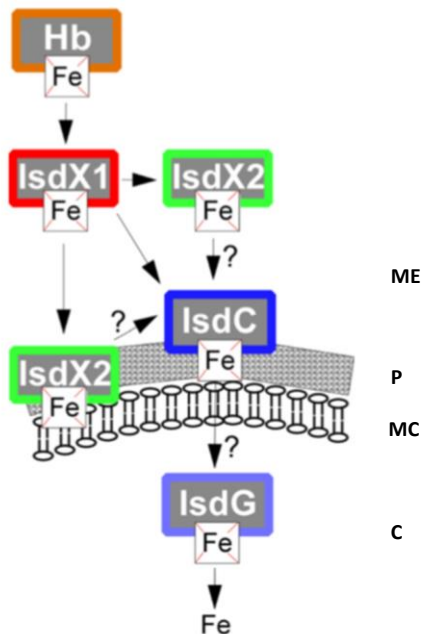


Fig. 1.8. Modelo de adquisición y transporte de hemo propuesto para *B. anthracis*. La proteína IsdX1 es secretada e interacciona con el hemo presente en la hemoglobina (Hb) el cual es transferido rápidamente a la proteína IsdC, anclada a la pared celular, mediante la interacción de los dominios NEAT de ambas proteínas. Alternativamente, IsdX1 transfiere el hemo a la proteína IsdX2, ya sea ésta se encuentre asociada a la membrana o secretada. Cómo IsdX2 transfiere el hemo a IsdC se desconoce, así como el mecanismo mediante el cual el hemo ingresa a la célula. Se propone que IsdC transfiere el hemo a un transportador de tipo ABC con homología a IsdE de *S. aureus* (no mostrado). Finalmente, IsdG recibiría el hemo y lo degradaría de manera de liberar el hierro en el citosol. Tomado de Fabian *et al.* (56)

Adquisición de hemo en bacterias Gram-negativas

En bacterias Gram-negativas, la membrana externa forma una barrera de permeabilidad para sustratos > 600 Da. El hemo posee un peso molecular de 613 Da y en solución habitualmente se encuentra como una mezcla de monómeros y dímeros, limitando su habilidad de atravesar la membrana externa a través de porinas [Revisado por Genco y Dixon (47)]. Es por esto que las bacterias Gram-negativas han desarrollado distintos sistemas de adquisición de compuestos hemínicos. Varios de estos sistemas han sido identificados y caracterizados. Según Wandersman y Stojiljkovic (48) se pueden clasificar en dos grupos no excluyentes: aquellos que involucran un contacto directo entre el receptor y la fuente de hemo a ser internalizada, y aquellos que dependen de la síntesis y secreción de proteínas (hemóforos) que interaccionan en el medio extracelular con la fuente de hemo y presentan el sustrato a los receptores. Ambos sistemas requieren la presencia de un receptor de membrana externa específico para el transporte del hemo

hacia el periplasma. Estos receptores varían tanto en tamaño (70-120 kDa) como en la diversidad de compuestos que son capaces de reconocer, pudiendo reconocer desde un único ligando hasta varios ligandos distintos [Revisado por Tong y Guo (57)]. Los receptores de compuestos hemínicos comparten ciertas características que se detallan a continuación [Revisado por Stojiljkovic y Perkins-Balding (58)].

1. Transportan el grupo hemo libre a través de la membrana externa en un proceso activo. Al igual que los receptores de sideróforos, dependen del complejo TonB-ExbB-ExbD para obtener la energía necesaria para la internalización del hemo.
2. Su expresión es máxima en condiciones de falta de hierro.
3. Presentan un motivo altamente conservado FRAP/NPNL (FRAPX₁₀HX₂NPNLX₂E).
4. Estructuralmente son homólogos a los receptores de sideróforos.

Otro aspecto común a ambos sistemas de adquisición de hemo es la participación de proteínas de unión periplásmicas y transportadores de tipo ABC implicados en el transporte a través de la membrana interna. Las proteínas de unión periplásmicas son críticas en el transporte del hemo desde la membrana externa hacia el transportador de tipo ABC (45).

i) Adquisición mediada por hemóforos

Los hemóforos son proteínas extracelulares pequeñas producidas por varias bacterias Gram-negativas (descritas también en *B. anthracis*), conforman una familia independiente de proteínas de unión a hemo y no presentan homología con ninguna otra proteína conocida. Se encargan de unir el hemo y entregarlo al receptor de membrana externa específico, el cual posteriormente lo transporta hacia el periplasma [Revisado por Wandersman y Stojiljkovic (48)].

Hasta el momento se han identificado dos sistemas de adquisición de hemo mediados por hemóforos en bacterias Gram-negativas. Uno de ellos es el sistema mediado por el hemóforo HasA (heme acquisition system) que ha sido identificado en *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Yersinia pestis* y *Yersinia enterocolitica*. El otro sistema es el mediado por el hemóforo HxuA

(heme/hemopexin utilization) que ha sido descrito únicamente en *Haemophilus influenzae* [Revisado por Tong y Guo (57)].

El sistema más estudiado es el sistema HasA-HasR de *S. marcescens*, donde HasA es el hemóforo y HasR el receptor de membrana externa específico (59). La proteína HasA (de 19 kDa) tiene una alta afinidad por el hemo ($K_d \sim 10^{-11}$ M) y si bien no es necesaria para la adquisición de hemo o hemoglobina por parte de HasR, aumenta 100 veces la eficiencia del sistema. Sin embargo, cuando la fuente de hemo presente es la hemopexina o mioglobina HasA es imprescindible. Al ser capaz de extraer el hemo de varias fuentes distintas, HasA amplía el espectro de las fuentes de hierro hemínico potencialmente utilizables [Revisado por Wandersman y Delepelaire (60)].

Los genes implicados en la adquisición de hemina mediada por hemóforos en *S. marcescens* están organizados en un operón, denominado operón *has* (Fig. 1.9). Este operón está compuesto por los genes *hasI* y *hasS* que codifican para un factor sigma extra-citoplasmático y un factor antisigma de transmembrana respectivamente, *hasR* codifica para el receptor de membrana externa, *hasA* codifica para el hemóforo, *hasD* y *hasE* codifican para las proteínas de membrana interna involucradas en la secreción del hemóforo y por último *hasB* que codifica una proteína homóloga a TonB, especializada en la transducción de energía para el transporte de hemina a través de este sistema [Revisado por Cescau *et al.* (61)].

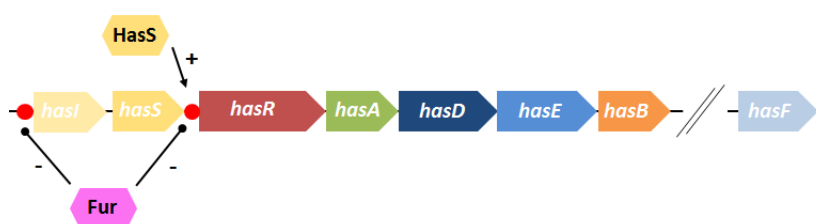


Fig. 1.9. Organización genómica del operón *has* de *S. marcescens*. *hasI* y *hasS* codifican para un factor sigma extracitoplasmático y un factor antisigma de transmembrana, respectivamente; *hasR* codifica para el receptor de membrana externa y *hasA* codifica para el hemóforo; *hasD* y *hasE* codifican proteínas implicadas en la secreción del hemóforo; *hasB* codifica para una proteína homóloga a TonB, encargada de la transducción de la fuerza protón motriz necesaria para el transporte a nivel de la membrana externa. *hasF* se encuentra en otra región del genoma y codifica para una proteína de membrana externa involucrada en la exportación del hemóforo. Los círculos rojos muestran los sitios donde actúa el regulador Fur. Se esquematiza el efecto activador de HasS sobre los genes corriente abajo y el efecto represor de la proteína Fur sobre el sistema HasI-HasS y sobre los demás genes del operón *has*. Tomado de Tong y Guo (57).

Este operón es regulado negativamente por el regulador global de respuesta a hierro Fur (ver más adelante) y positivamente por hemina. En esta regulación participan además las proteínas reguladoras HasI y HasS. Esta regulación implica una expresión basal del sistema en condiciones de baja disponibilidad de hierro, permitiendo bajos niveles de secreción del hemóforo. Cuando hay hemina disponible, es captada por HasA, el complejo hemina-HasA es reconocido por el receptor HasR y se dispara una cascada de señales que permite la liberación del factor sigma HasI de la acción del factor antisigma HasS. De esta manera, HasI activa la total transcripción del sistema (62, 63). En la figura 1.10 se esquematiza este sistema.

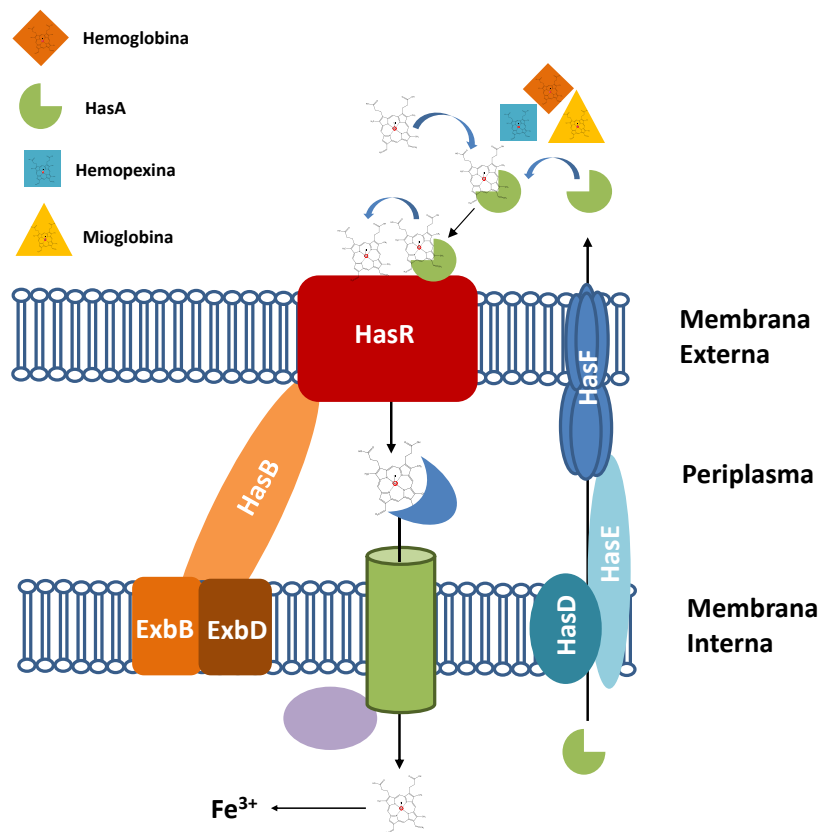


Fig. 1.10. Representación esquemática del sistema de adquisición de hemo mediado por hemóforos de *S. marcescens*. HasDEF participan en la secreción del hemóforo HasA al medio extracelular donde es capaz de unir distintos compuestos hemínicos y presentarlos al receptor de membrana externa HasR. La internalización del hemo al periplasma depende del sistema HasB-ExbB-ExbD. El transporte a través de la membrana interna es dependiente de un transportador de tipo ABC (verde y violeta) y una proteína periplásmica (azul). Modificado de Wandersman y Delepelaire (60).

ii) Adquisición directa

El otro mecanismo de adquisición de compuestos hemínicos no depende de la participación de hemóforos, sino de la interacción directa del receptor de membrana externa con la fuente de hemo. Estos receptores comparten una alta identidad de secuencia y una estructura similar a los receptores dependientes de hemóforos (25-65 %), así como a los receptores de sideróforos (17 % – 23 %)(45).

El sistema presente en *Y. enterocolitica* fue el primer mecanismo de adquisición de hemina en ser caracterizado y es considerado como referencia de estos sistemas. Utilizando una aproximación exquisita, Stojiljkovic y Hantke (64) identificaron el receptor de membrana externa involucrado en la adquisición de hemo al que llamaron HemR. También identificaron tres genes presentes en la misma región genómica que participaban del metabolismo de hemo: *hemP* corriente arriba, *hemS* corriente abajo, y *hemT* ubicado corriente abajo de *hemS*. Demostraron que HemP, HemR y HemS eran necesarias para la utilización de hemo como fuente de hierro. Propusieron como posibles funciones para HemS la de una permeasa citoplasmática encargada del transporte del hemo a través del citosol o la de una proteína de degradación de hemo. En el año 1994, estos mismos autores identificaron y caracterizaron el sistema de transporte de hemina a través de la membrana citoplasmática en este microorganismo (65). Este sistema consiste de cuatro proteínas: la proteína periplásmica de unión a hemo, HemT; una permeasa de hemo, HemU; la proteína de unión a ATP, HemV; y HemS posiblemente involucrada en la degradación de hemo en el citosol. Si bien HemU y HemV eran necesarias para la adquisición de hemo, podía prescindir de HemT sugiriendo que otra proteína periplásmica podía cumplir esta función. Propusieron entonces un modelo de utilización de hemina en *Y. enterocolitica* donde HmuR es el receptor de membrana externa, HemT, HemU y HemV las encargadas del transporte del hemo hacia el citosol donde es degradado por acción de HemS liberando el hierro. Éste fue uno de los primeros trabajos donde se caracterizó un transportador de tipo ABC involucrado en la adquisición de hemo (65).

A partir de estos trabajos pioneros se identificaron y caracterizaron varios sistemas de adquisición de compuestos hemínicos de este tipo. Algunos ejemplos son el sistema

hmuRSTUV de *Y. pestis*, *shuASTUV* de *Shigella dysenteriae* y *phuRSTUVW* de *P. aeruginosa* (66–68).

Liberación del hierro hemínico

Una vez dentro de la célula el hemo puede tener dos destinos: **i)** incorporarse directamente a hemoproteínas bacterianas o **ii)** ser degradado para liberar el hierro que será utilizado como nutriente.

La degradación biológica del hemo es llevada a cabo por una familia de enzimas denominadas hemo-oxigenasas (HOs). Las HOs catalizan la conversión del hemo en biliverdina mediante oxidación del anillo porfirínico, con la consecuente liberación de monóxido de carbono y hierro. Esta reacción consume tres moléculas de O_2 y siete electrones. En mamíferos, los equivalentes de reducción son proporcionados por el NADPH vía la citocromo P450 reductasa (Fig. 1.11) [Revisado por Wilks y Heinzl (69)].

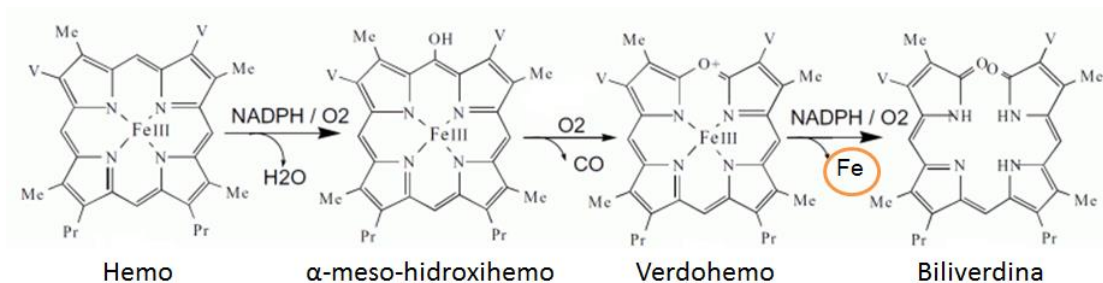


Fig. 1.11. Esquema de la degradación de hemo por acción de las HOs. Como consecuencia de la acción de las HOs se forman distintos intermediarios y finalmente se da la ruptura del anillo porfirínico y la liberación del hierro. V, vinilo; Me, metilo; Pr, propilo. Tomado de Ratliff *et al.* (70).

Las HOs se clasifican principalmente en base a su estructura. La familia de HO “canónicas” o “clásicas” se identifican por su homología con la HO humana HO-1. Este tipo de HOs se ha descrito en varias bacterias donde su función está relacionada principalmente a la adquisición de hierro a partir de hemo. Hasta la fecha se desconoce el donador de electrones en condiciones fisiológicas para estas HOs bacterianas (71–74). Si bien la mayoría de las HOs producen el isómero α-biliverdina, en *P. aeruginosa* se ha reportado la producción de los isómeros β-biliverdina y δ-biliverdina como consecuencia de la actividad HO de la proteína PigA (73, 75). *P. aeruginosa* presenta también la

proteína BphO, una HO que produce α -biliverdina como producto de reacción (76). La presencia de HOs “clásicas” con distinta regioespecificidad en un mismo organismo ha sido reportada sólo en algunas cepas de *Pseudomonas* (75).

En el año 2004 se describió en *S. aureus* una nueva clase de enzimas degradadoras de hemo pertenecientes a la familia de las monooxigenasas de antibióticos a las que se denominó IsdG e IsdI (77). Unos años después se reportó la presencia de proteínas homólogas a IsdG en *B. anthracis* (78) una bacteria también Gram positiva y en *B. japonicum* (79), una bacteria Gram negativa. En un principio se las clasificó como HOs ya que se demostró que degradaban el hemo generando un producto de reacción con igual tiempo de retención que la biliverdina (77, 78) y en el caso de *B. anthracis* también se determinó la liberación de hierro (78). En *B. japonicum* fue el único caso donde se determinó que el producto de reacción de HmuQ (homólogo a IsdG) era efectivamente biliverdina mediante HPLC-MS (79). Se las denominó HOs no canónicas o HOs de tipo IsdG. Recientemente se ha demostrado en *S. aureus* que el mecanismo de degradación de hemo y, más importante aún, el producto de esta degradación difiere del presentado por las HOs. Se determinó que IsdG e IsdI degradan la hemina formando el cromóforo oxo-bilirrubina, denominado staphylobilina (80). También se demostró que en lugar de liberar monóxido de carbono como consecuencia de la oxidación del anillo, se libera formaldehído (81). Este fenómeno se encontró también en *Bacillus subtilis* donde la proteína HmoB degrada la hemina generando staphylobilina y formaldehído (82).

En *S. aureus* recientemente se identificaron las reductasas IruO y NtrA que catalizan la transferencia de electrones del NADPH a IsdG e IsdI (83, 84). Hasta la fecha son las únicas proteínas identificadas implicadas en la transferencia de electrones a proteínas degradadoras de hemo, completando el esquema de degradación en este microorganismo.

El estudio de proteínas degradadoras de hemo del tipo IsdG, llevó a la identificación de MhuD en *Mycobacterium tuberculosis*. Se determinó que esta proteína también cataliza la degradación de hemo mediante un mecanismo distinto al de las HOs canónicas generando como producto final el cromóforo mycobilina (85). Como en el caso de IsdG, IsdI y HmoB, MhuD no genera CO como consecuencia de la degradación del hemo, sino que retiene el carbono como aldehído en el sitio de apertura del anillo. En el caso de *M.*

tuberculosis, los autores proponen que el hecho de no producir CO sería importante desde el punto de vista funcional ya que una de las señales implicadas en la transición al estado de dormancia en este microorganismo es mediado por la producción de CO (85).

En la figura 1.12 se muestran los distintos cromóforos, resultado de la degradación biológica del hemo, reportados hasta el momento.

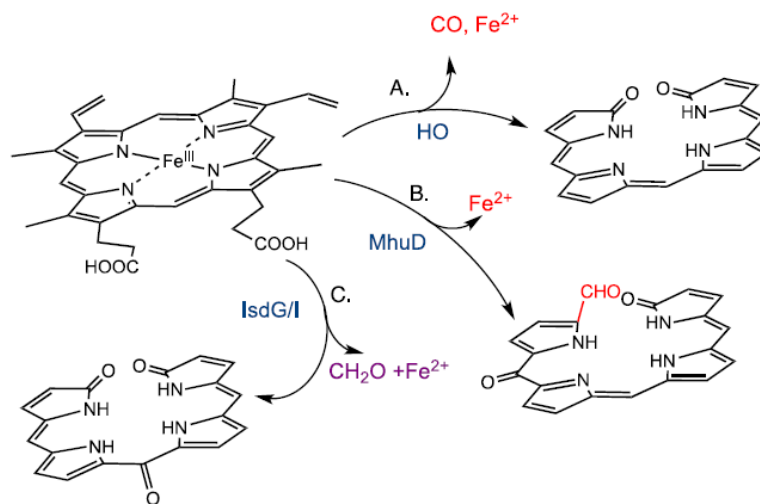


Fig. 1.12. Cromóforos obtenidos por acción de enzimas bacterianas degradadoras de hemo. (A) Las HOs canónicas degradan el hemo a biliverdina con la consecuente liberación de hierro y CO; (B) la proteína MhuD de *M. tuberculosis* degrada el hemo a mycobilina liberando hierro pero sin liberación de CO, ya que mantiene el carbono como aldehído en el sitio de ruptura del anillo; (C) las proteínas IsdG e IsdI de *S. aureus* así como HmoB de *B. subtilis* producen staphylobilina liberando formaldehído y hierro. Tomado de Wilks y Heinzl (69).

También se han descrito otras proteínas capaces de degradar hemo que no presentan identidad de secuencia con HOs canónicas ni con proteínas de la familia IsdG. Este es el caso de las proteínas PhuS de *P. aeruginosa* y HugZ de *H. pylori* (86, 87).

HugZ pertenece a la familia de proteínas de tipo piridoxamina 5'-fosfato oxidasa (pfam01243), siendo ChuZ de *Campylobacter jejuni* la única proteína homóloga que se ha caracterizado hasta el momento (88). HugZ produce el isómero δ -biliverdina como consecuencia de su actividad degradadora de hemo y es el único caso reportado hasta el momento en que se produce este isómero como producto de degradación del hemo (87). Si bien se demostró que ChuZ es capaz de degradar hemo, no se han identificado

los productos de reacción (88). Estas proteínas no presentan identidad de secuencia con ninguna de las enzimas degradadoras de hemo mencionadas anteriormente, por lo que HugZ y posiblemente ChuZ formarían un grupo independiente de enzimas con actividad HO.

Homólogos a PhuS se han identificado en otras bacterias, y en la mayoría de los genomas secuenciados están anotadas como “proteínas degradadoras de hemo”. PhuS pertenece a la familia de proteínas de tipo HemS (pfam05171). HemS de *Y. enterocolitica*, ChuS de *E. coli* O157:H7 y HemS de *Bartonella henselae* son ejemplos donde se ha demostrado la capacidad de degradar hemo de estas proteínas pero no se ha demostrado la actividad HO mediante caracterización de los productos de reacción (65, 89, 90).

REGULACIÓN MEDIADA POR HIERRO

El hierro es capaz de participar en la formación de radicales libres al interactuar con formas reducidas de oxígeno, en una reacción conocida como reacción de Fenton:



La generación de especies altamente reactivas de oxígeno puede causar daño a distintas macromoléculas. Uno de los blancos de los radicales hidroxilo es el ADN, el cual sufre mutaciones a causa de éstos y en caso de un daño excesivo lleva a la muerte celular [Revisado por Andrews *et al.* (35, 36)].

La esencialidad de este metal junto con su potencial toxicidad, obliga a los microorganismos a poseer mecanismos que permitan regular finamente las concentraciones intracelulares de hierro, de manera que sean suficientes para las funciones celulares básicas pero no alcancen niveles tóxicos.

El mantenimiento de la homeostasis se alcanza mediante un balance entre la adquisición, el almacenamiento, el uso del hierro y posiblemente su exportación y se basa generalmente en la acción concertada de distintas estrategias que se detallan a continuación [Revisado por Andrews *et al.* (35, 36)].

1. Expresión de sistemas de alta afinidad que permiten la adquisición del metal cuando se encuentra en bajas concentraciones
2. Almacenamiento del hierro libre en proteínas intracelulares
3. Participación de sistemas de tolerancia al estrés oxidativo
4. Control del consumo de hierro en condiciones limitantes mediante la represión de la expresión de proteínas que contienen hierro
5. La presencia de un sistema que responda a hierro y que coordine la expresión de la maquinaria implicada en los mecanismos mencionados, en función de la disponibilidad de hierro

Fur y DtxR

En *E. coli* y en muchas otras bacterias, tanto Gram-negativas como Gram-positivas, la homeostasis de hierro está a cargo principalmente de la proteína Fur (ferric uptake regulator). Fur actúa como represor de la transcripción y su actividad depende de la unión a su co-represor, Fe^{2+} . La formación del complejo Fur- Fe^{2+} aumenta la afinidad de la proteína por su ADN blanco, una secuencia compuesta por repetidos invertidos denominada "caja Fur". Este motivo conservado principalmente se ubica en la región -10 o -35 de sus genes blanco, de modo que la formación del complejo Fur-ADN obstaculiza el acceso de la ARN polimerasa impidiendo la transcripción (Fig. 1.13) [Revisado por Troxell y Hassan (91)].

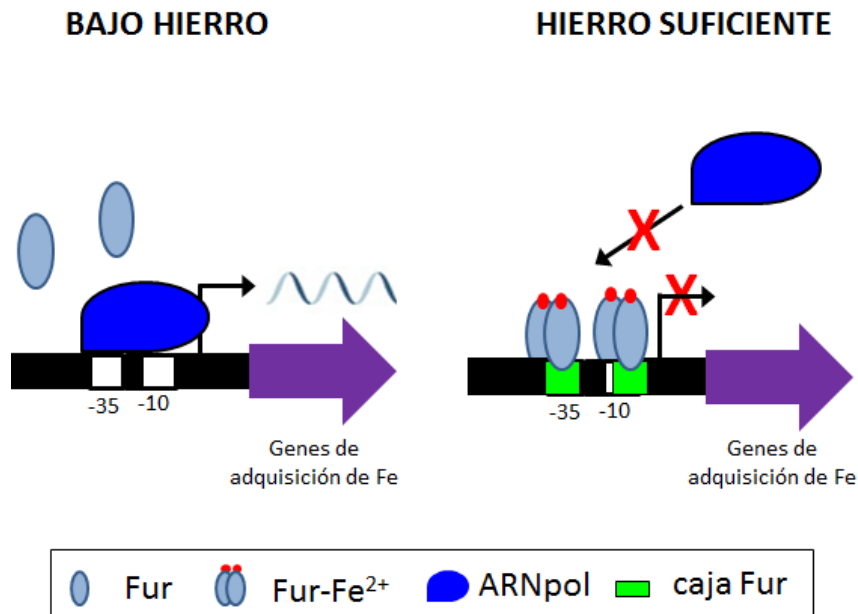


Fig. 1.13. Esquema representativo del mecanismo de acción del regulador global de respuesta a hierro Fur. En condiciones de baja disponibilidad de hierro, apo-Fur no se une a las cajas Fur y se da la transcripción de los genes implicados en la adquisición de hierro. En presencia de hierro, se forma el complejo Fur-Fe²⁺, aumentando la afinidad de Fur por su secuencia blanco. La unión del complejo a la caja Fur, ubicada en las regiones -10 o -35, evita el acceso de la ARN polimerasa y bloquea la transcripción. Adaptada de Troxell y Hassan (91).

Si bien la principal función de Fur es la represión de genes involucrados en la adquisición de hierro cuando hay suficiencia de este metal, también reprime genes involucrados en funciones centrales como el ciclo de ácidos tricarboxílicos, glucólisis, respiración, estrés oxidativo y síntesis de ADN. En *E. coli* por ejemplo, el regulón Fur involucra aproximadamente unos 90 genes. La variedad de blancos sobre los que actúa, hace a la proteína Fur un regulador global que es capaz de adaptar varios procesos celulares de acuerdo a la disponibilidad de hierro [Revisado por Andrews *et al.* (35, 36)].

También existen genes inducidos en forma directa o indirecta por la proteína Fur. Por ejemplo se ha encontrado que la expresión de algunos genes que se inducen por Fur, lo hacen mediante la acción de un ARN pequeño denominado *ryhB*. Este ARN pequeño actúa post-transcripcionalmente mediante apareamiento con su ARNm blanco, causando una rápida degradación de los transcritos. *ryhB* es reprimido por Fur en

presencia de hierro, convirtiendo indirectamente a Fur un activador (Fig. 1.14) [Revisado por Troxell y Hassan (91)].

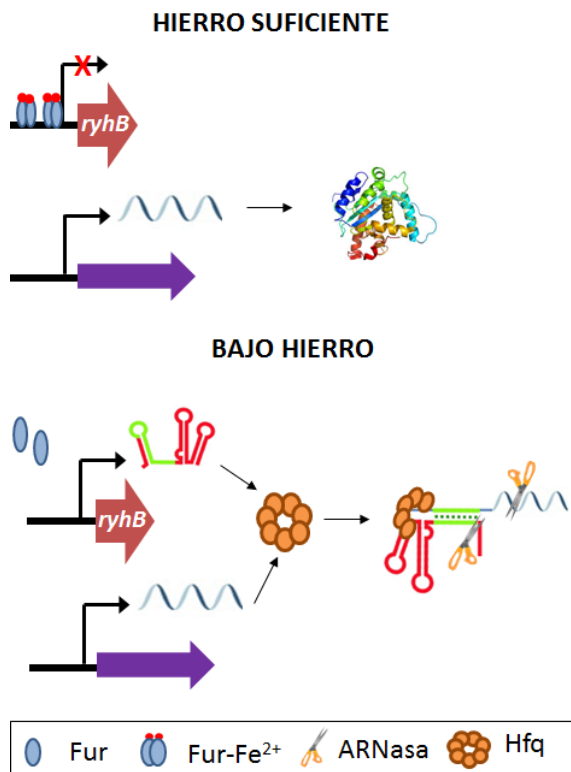


Fig. 1.14. Esquema representativo del mecanismo de activación en respuesta a hierro mediado por *rhyB*. En condiciones de disponibilidad de hierro, Fur se une a la región promotora de *rhyB* impidiendo su transcripción. La ausencia de *rhyB* permite que sus ARNm blancos se mantengan estables y se dé la traducción. Cuando la concentración de hierro intracelular baja, Fur pierde afinidad por su blanco y se da la expresión de *rhyB*. En un proceso mediado por la chaperona Hfq, *rhyB* se une a regiones blanco presente en los transcritos que regula mediante apareamiento. La formación del complejo Hfq-*rhyB*-ARNm actúa como una señal de degradación, reclutando RNAsas que degradan el transcripto. Adaptada de Troxell y Hassan 2013 (91).

Pero también se han encontrado casos de activación mediados por Fur e independientes de un ARN pequeño. Éstos implican la unión de la proteína Fur al ADN, específicamente a cajas Fur ubicadas corriente arriba del sitio de unión de la ARN polimerasa en los genes regulados. Los mecanismos de acción planteados hasta el momento para la activación mediada por la unión de Fur a esta región son dos: **i)** reclutamiento de la ARN polimerasa y **ii)** anti-represión.

El reclutamiento mediado por Fur de la ARN polimerasa a la región promotora no se ha demostrado ya que no se determinó la interacción entre estas dos proteínas. El mecanismo de anti-represión ha sido identificado y caracterizado para el gen *ftnA* de *E. coli* que codifica para una ferritina (proteína de almacenamiento de hierro). En este caso, la regulación de *ftnA* depende de la proteína H-NS, una proteína de unión a ADN asociada al nucleóide y que tiene un efecto pleiotrópico en la regulación génica. La unión de H-NS a la región promotora de *ftnA* impide su transcripción, actuando como un

repressor. En condiciones de disponibilidad de hierro, Fur se une a una caja Fur ubicada corriente arriba de *ftnA* y esta unión impide la unión de H-NS a su blanco. La unión de Fur entonces, libera al gen *ftnA* de la represión mediada por H-NS actuando indirectamente como un activador [Revisado por Troxell y Hassan (91)].

En bacterias Gram-positivas con alto contenido G+C, el regulador global en respuesta a hierro es la proteína DtxR (*d*iphtheria *t*oxin *r*egulator), originalmente identificado en *Corynebacterium diphtheriae* como un repressor de la producción de la toxina diftérica (92). Si bien no presenta similitud a nivel de secuencia con la proteína Fur, su estructura terciaria y mecanismo de acción es similar. En presencia de hierro, actúa reprimiendo la transcripción de genes involucrados en la adquisición de hierro. Al igual que Fur, el complejo DtxR-Fe²⁺ se une en forma de dímero a secuencias blanco palindrómicas presentes en los promotores que regula [Revisado por Andrews *et al.* (35, 36)].

Regulación de la homeostasis en α -Proteobacterias

Homólogos a la proteína Fur se han identificado y caracterizado en *R. leguminosarum*, *S. meliloti*, *B. japonicum* y *Brucella abortus*, demostrándose que en estas bacterias el homólogo a Fur no está involucrado en el metabolismo de hierro sino de manganeso (93, 94). Dada su participación como regulador del transporte de manganeso, se denominó a esta proteína Mur (*m*anganeso *u*ptake *r*egulator). Estudios *in silico* permitieron establecer que la participación del homólogo a Fur en la homeostasis de manganeso no está restringida a estos microorganismos sino que se encuentra ampliamente distribuida en las α - Proteobacterias (95). En este grupo, la regulación de la homeostasis de hierro estaría dada mayoritariamente por las proteínas Irr y/o RirA.

Irr

La proteína Irr (*i*ron *r*esponse *r*egulator) fue identificada originalmente en *B. japonicum* (96). Su presencia está restringida a miembros de la clase α -Proteobacterias, particularmente Rhizobiales y Rhodobacterales. *Pelagibacter ubique*, *Magnetospirillum* y *Rhodospirillum* son las únicas excepciones fuera de estos órdenes, que también poseen este regulador (95). Irr pertenece a la familia de reguladores Fur y, si bien su mecanismo

de acción es distinto, al igual que Fur se comporta como un regulador global. Muchos de los genes que en *E. coli* son regulados por la proteína Fur, en *B. japonicum* están bajo el control de Irr [Revisado por Rudolph *et al.* (97)].

La proteína Irr de *B. japonicum* percibe el estado de hierro de la bacteria de forma indirecta a través de la disponibilidad de hemo (98). En la biosíntesis de hemo, la enzima ferroquelatasa es la encargada de la incorporación de hierro en el anillo porfirínico. En condiciones de disponibilidad de hierro, Irr se une a la ferroquelatasa de manera que la síntesis de hemo y la proteína Irr co-localizan (99). La proteína Irr presenta dos sitios específicos de unión a hemo, HXH y HRM (heme regulatory motif), este último involucrado en la degradación de Irr al ser ocupado. Es así que en condiciones de disponibilidad de hierro, la etapa final en la síntesis de hemo induce la degradación de Irr con lo cual no está presente para ejercer su función regulatoria (100). En condiciones de baja disponibilidad de hierro el complejo Irr-ferroquelatasa no se forma, por lo que la proteína Irr es capaz de regular sus genes blanco (Fig. 1.15). Este no es el caso en la bacteria *R. leguminosarum*, donde la proteína Irr carece del sitio HRM y no se degrada en presencia de hierro. Sin embargo se demostró *in vitro* que la presencia de hemo (no así de hierro) inhibe la unión de la proteína Irr a sus secuencias blanco posiblemente debido a un cambio conformacional inducido por la unión del hemo al sitio HXH. Este motivo también demostró ser necesario para la función de la proteína Irr *in vivo* (101).

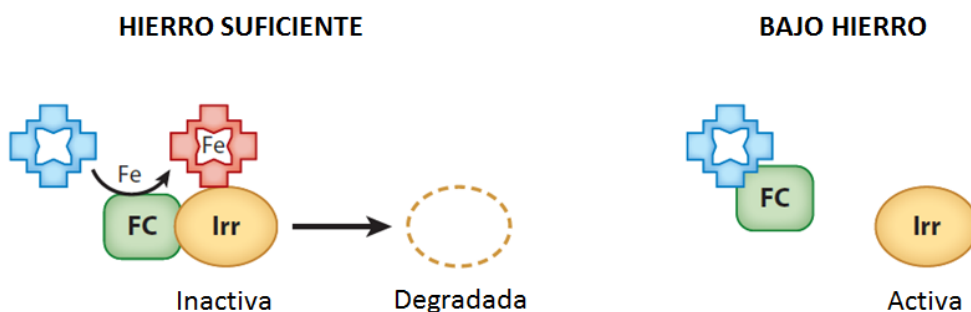


Fig. 1.15. Regulación dependiente de hemo de la proteína Irr en *B. japonicum*. En condiciones de disponibilidad de hierro, la proteína Irr forma un complejo con la enzima ferroquelatasa (FC), lo que resulta en la inactivación de Irr y la posterior degradación dependiente de hemo de la misma. En condiciones de baja disponibilidad del metal, FC se une a la protoporfirina pero no a hierro y por lo tanto no es posible la formación del complejo Irr-FC y la proteína Irr es activa. Tomada de O'Brian (102).

Al igual que Fur y DtxR, la proteína Irr reconoce motivos conservados en la región promotora de los genes que regula y se une a ella para ejercer su efecto. Los motivos conservados son palíndromes imperfectos de 17 pb con una secuencia consenso 5´-TTTRGAAYNRTTCYAAA-3´ denominada ICE (iron control element) (95).

En *B. japonicum*, dependiendo de la ubicación de los ICE en la región promotora, la unión de Irr a estas secuencias activará o reprimirá la transcripción de los genes blanco (103), mientras que en *R. leguminosarum* Irr actuaría únicamente como represor (104). También se ha demostrado que existe un rango de afinidades entre la proteína Irr y los distintos ICE. Esto permitiría modular la expresión, de manera que aquellos promotores que tengan una alta afinidad se mantengan ocupados por la proteína aún en condiciones donde la concentración de Irr es baja (Fig. 1.16) [Revisado por O´Brian (102)].

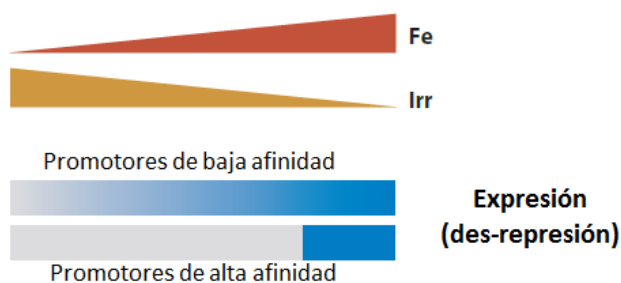


Fig. 1.16. Esquema de modulación de la expresión en función de la afinidad de Irr por la secuencia blanco. Los promotores con baja afinidad por Irr mantienen una expresión aún en condiciones de baja disponibilidad de hierro donde la concentración del represor Irr es alta. En cambio, aquellos promotores con una afinidad alta se encuentran reprimidos en condiciones donde la concentración de Irr es alta o moderada, des-reprimiéndose solamente a altas concentraciones de hierro y bajas concentraciones de Irr. Tomado de O´Brian (102)

En *B. japonicum*, el regulón Irr abarca aproximadamente 80 genes, 61 de los cuales están sujetos a una regulación positiva mediada por Irr y 17 están regulados negativamente por la proteína, indicando que la función principal de Irr como regulador es a través de la activación de la expresión (98). Los genes que se encuentran bajo control positivo están involucrados en la captación de hierro y otras funciones que le permiten una mejor adaptación a medios limitados en hierro mientras que Irr reprime los genes que codifican para proteínas que funcionan óptimamente en condiciones de suficiencia de hierro como la síntesis de hemo o la formación de centros hierro-azufre o a la respuesta a estrés por hierro (Fig. 1.17) [Revisado por O´Brian (102)].

Bradyrhizobium japonicum

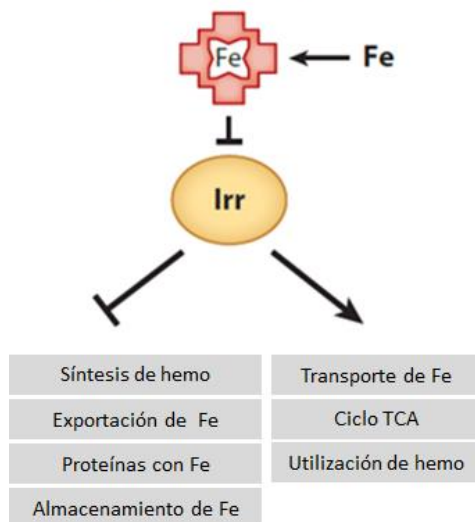


Fig. 1.17. Esquema del regulón Irr. En presencia de hierro, la proteína Irr se encuentra inactiva no pudiendo ejercer su papel como regulador. En condiciones de baja disponibilidad de hierro, Irr actúa como represor de mecanismos involucrados en procesos dependientes del metal. En estas mismas condiciones actúa como activador de aquellos procesos que involucran la adquisición de hierro y la adaptación a dicho ambiente. Tomado de O'Brian (102).

RirA

La proteína RirA (rhizobial iron regulator) fue identificada originalmente en *R. leguminosarum* como una proteína represora involucrada en la homeostasis de hierro (105). RirA no presenta similitud de secuencia con la proteína Fur, sino que pertenece a la familia de reguladores transcripcionales del tipo Rrf2. Esta familia de reguladores está ampliamente distribuida en bacterias, sin embargo en pocos casos se han caracterizado. Se ha determinado que Rrf2 de *Desulfovibrio vulgaris* está involucrado en la síntesis de citocromos; NsrR e IscR de *E. coli*, en la respuesta a óxido nítrico y en el ensamblado de centros hierro-azufre respectivamente; y el regulador CymR de *B. subtilis*, en el metabolismo de cisteína [Revisado por Rudolph *et al.* (97)]. Si bien se desconoce el mecanismo de acción de RirA se propone que, al igual que IscR, responde a la disponibilidad de hierro indirectamente mediante la percepción de centros hierro-azufre (95).

Homólogos cercanos a RirA están presentes solamente en Rhizobiales, específicamente dentro de la familia Rhizobiaceae, pero también se encuentra en *Mesorhizobium*, *Brucella* y *Bartonella* (95). Interesantemente, RirA está ausente en *B. japonicum* y otros miembros de la familia *Bradyrhizobiaceae*, indicando que la presencia de RirA no es una propiedad intrínseca a los rizobios (95). Proteínas con una menor similitud de secuencia

se encuentran en una gran variedad de bacterias, indicando que la presencia de reguladores transcripcionales similares a RirA podría ser más generalizada (97).

En *R. leguminosarum* el regulón RirA comprende aproximadamente 100 proteínas, la mayoría reguladas negativamente por RirA, mientras que 17 de ellas están sujetas a una regulación positiva por la proteína (Fig. 1.18)(106). Se demostró la presencia de motivos conservados en la región promotora de varios de los genes regulados por RirA, a los que se denominó IRO (*iron responsive operators*) (107). Posteriormente, mediante genómica comparativa se evaluó la distribución de estos motivos en α -Proteobacterias y se determinó la secuencia consenso 5'-TGA-(N₉)-TCA-3' a la que se designó "caja RirA" (95). Esto demuestra que si bien RirA no presenta similitud de secuencia con Fur, al igual que éste actúa como un regulador global adaptando distintos procesos celulares en función de la disponibilidad de hierro. En *R. leguminosarum*, RirA está sujeta a dos niveles de regulación: auto-represión en condiciones de disponibilidad de hierro y represión mediada por la proteína Irr en condiciones de escasez del metal (105).

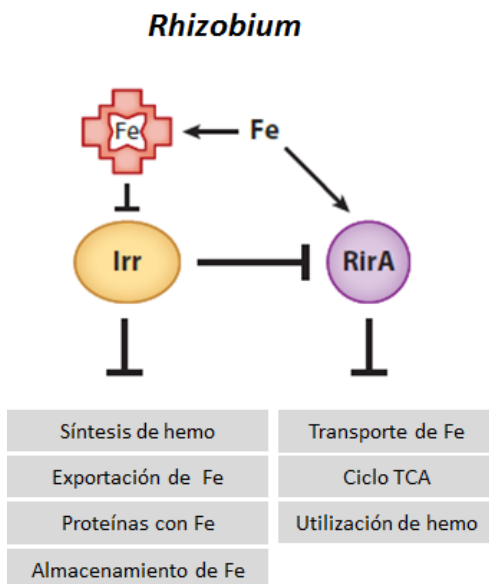


Fig. 1.18. Esquema del regulón RirA en *R. leguminosarum*. En presencia de hierro, la proteína Irr se encuentra inactiva no pudiendo ejercer su papel como regulador. En estas condiciones la proteína RirA se encuentra activa y actúa como represor de mecanismos implicados en la adquisición del metal. En condiciones de baja disponibilidad de hierro, Irr actúa como represor de mecanismos involucrados en procesos dependientes del metal y actúa también reprimiendo la expresión de *rirA*. Tomado de O'Brian (102)

Es evidente que la homeostasis de hierro es un tema complejo en el que participan varios factores. La esencialidad del metal junto con su potencial toxicidad hace necesaria la existencia de un balance muy delicado entre la adquisición, el consumo y el almacenamiento, mediado por un intrincado sistema de regulación que actúa a distintos niveles. La importancia de este balance se hace evidente ante la existencia de genes que,

independientemente de la proteína implicada en su regulación (Fur, DtxR, RirA, Irr), responden al metal, y dicha respuesta se mantiene en los distintos grupos taxonómicos. También queda claro que, si bien la proteína Fur se considera el paradigma de regulador de la homeostasis de hierro y su relevancia es innegable en un amplio número de bacterias, en α -Proteobacterias, particularmente en Rhizobiales y Rhodobacterales, el panorama es completamente distinto. Aunque en estos microorganismos existe un homólogo a la proteína Fur, se ha comprobado en *R. leguminosarum*, *S. meliloti* y *B. japonicum* que este regulador responde a manganeso y no a hierro (93, 94, 108). Parecería evidente entonces, que en α -Proteobacterias la homeostasis de hierro depende de la participación de las proteínas RirA, Irr, o ambas, y que el homólogo a Fur (Mur) quedó relegado a un papel secundario.

Sinorhizobium meliloti

Denominación

Sinorhizobium, del latín medieval *sino* (China), fue identificado originalmente por Chen *et al.* en el año 1988 (5) como un aislamiento de crecimiento rápido proveniente de soja en China. Con esa denominación se pretendía resaltar la diferencia con el género *Bradyrhizobium* (de *brady*: lento) al cual pertenecían los clásicos simbioses de soja. En el año 2003, al comparar cepas de *Ensifer* aisladas por Casida en 1982 (109) con las cepas de *Sinorhizobium* aisladas por Chen, Willems *et al.* (110) concluyeron que *Ensifer* y *Sinorhizobium* eran sinónimos y propusieron mantener el nombre *Sinorhizobium* para ambos géneros. Sewada *et al.* (111) realizaron una revisión de la sistemática de rizobios, donde concluyen que efectivamente el género *Sinorhizobium* se agrupa con el género *Ensifer* y deberían ser amalgamados. Dado que el nombre *Ensifer* fue publicado primero, éste tendría prioridad y sería el apropiado (112–114), sin embargo ambos nombres se siguen usando en la literatura. En esta tesis utilizaremos el nombre *Sinorhizobium* por ser el más conocido y utilizado en el ámbito de la rizobiología.

El género *Sinorhizobium* pertenece a la familia Rhizobiaceae y está compuesto por 13 especies siendo una de ellas, *S. meliloti* (115). *S. meliloti* es capaz de establecer

asociaciones simbióticas principalmente con leguminosas del género *Medicago*, *Melilotus* y *Trigonella*, induciendo la formación de nódulos indeterminados, característicos de estas especies vegetales (Fig. 1.19). La simbiosis *S. meliloti* - *Medicago sativa* (planta conocida con el nombre vernáculo de alfalfa) es una de las interacciones bacteria-planta mejor estudiada [Revisado por van Rhijn y Vanderleyden (116)].

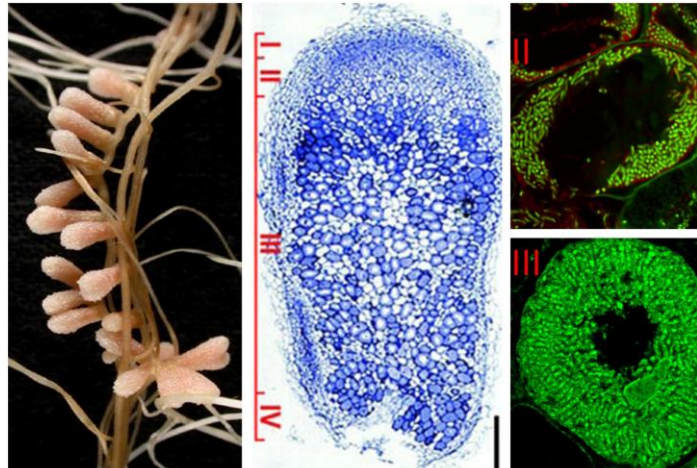


Fig. 1.19. Estructura de los nódulos formados en la simbiosis *S. meliloti* – *Medicago truncatula*. A la izquierda, nódulos formados en la asociación. En el centro, corte longitudinal del nódulo mostrando las diferentes zonas: (I) meristema, (II) zona de infección, (III) zona de fijación de nitrógeno, (IV) zona de senescencia. A la derecha, cortes transversales donde se muestran las células bacterianas teñidas con Syto9 (fluorescencia verde) en distintas zonas del nódulo. En la zona II (arriba) se muestran bacterias en fase de diferenciación, mientras que en la zona III (abajo) se ve el citosol de las células vegetales lleno de bacteroides alargados. Tomado de Maróti y Kondorosi (117).

S. meliloti es un bacilo Gram-negativo, no esporulado, heterótrofo y aerobio. Como todos los rizobios, *S. meliloti* debe ser capaz de prosperar tanto en un medio complejo y competitivo como es la rizósfera, así como intracelularmente una vez establecida la simbiosis. Esto exige una gran versatilidad por parte de estos microorganismos que se ve reflejada a nivel del genoma. *S. meliloti* presenta un genoma complejo y de gran tamaño que le confiere una gran capacidad metabólica y le proporciona ventajas a la hora de adaptarse a los distintos nichos que coloniza [Revisado por Geddes y Oresnik (118)].

El genoma de *S. meliloti*

El tamaño del genoma de los rizobios varía entre 5,4 Mb y 9,2 Mb y el número de plásmidos que presentan varía entre 0 y 7. Muchos rizobios presentan plásmidos de gran tamaño, conocidos como megaplásmidos. Estos megaplásmidos tienen un tamaño mayor a 500 Kb y en algunos genomas contienen genes esenciales, haciendo que la distinción entre plásmidos y cromosomas en algunos casos no sea tan clara. Esto llevó a Harrison *et al.* (119) a definir en el año 2010 una nueva clase de replicón, el crómido. Estos autores proponen tres criterios para definir un crómido: **i)** presentan sistemas de mantenimiento y replicación típicos de plásmidos; **ii)** presentan una composición nucleotídica similar a la del cromosoma; **iii)** poseen genes esenciales que se encuentran en el cromosoma en otras especies.

La cepa 1021 de *S. meliloti* posee un genoma de aproximadamente 6,7 Mb, compuesto por tres replicones: un cromosoma de 3,65 Mb, el crómido pSymB de 1,68 Mb y el megaplásmido pSymA de 1,36 Mb (Fig. 1.20) (120–122). Al día de la fecha, están disponibles las secuencias de 54 genomas de *Sinorhizobium*, de los cuales 34 corresponden a *S. meliloti* y 9 de ellos se encuentran completos (123).

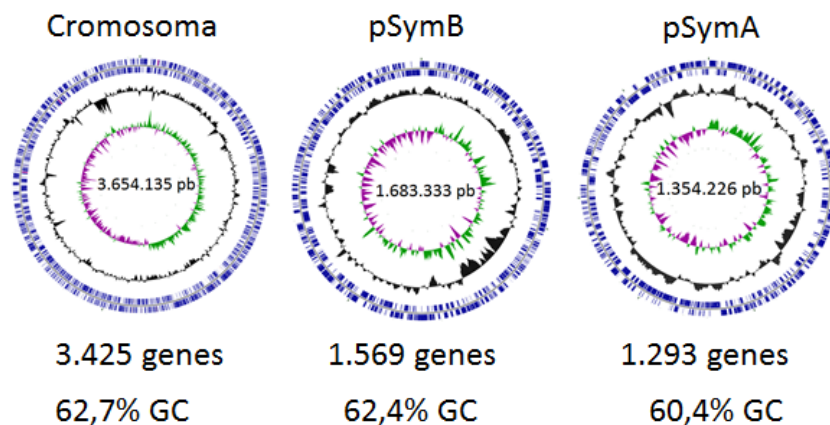


Fig. 1.20. Composición del genoma de *S. meliloti* 1021. Genoma de 6,7 Mb que consta de tres replicones: cromosoma (3,65 Mb), el crómido pSymB (1,68 Mb) y el megaplásmido pSymA (1,35 Mb). Presenta un total de 6.287 genes, de los cuales aproximadamente la mitad (54,5 %) se encuentran en el cromosoma y la otra mitad distribuidos entre pSymB (25 %) y pSymA (20,5 %). El cromosoma y el crómido presentan un contenido GC similar (62,7 % y 62,4 % respectivamente) y pSymA un contenido GC menor (60,4 %) (120). Imagen modificada de la página del Instituto Nacional Francés de Investigación Agronómica (INRA) (124).

De los 6.287 marcos de lectura posibles, se puede asignar función por homología de secuencias a 59,7 % de ellos. Del 40,3 % restante, 8,2 % están codificadas por genes sin homología en la base de datos, es decir por genes que serían particulares para esta bacteria. Interesantemente, casi un 12 % de los genes anotados codifica para factores de transcripción y proteínas de transporte, otorgándole a *S. meliloti* la versatilidad necesaria para su complejo ciclo de vida (125).

Los tres replicones presentan diferencias no sólo desde el punto de vista estructural, sino también desde el punto de vista funcional. El cromosoma de *S. meliloti* se asemeja a la composición típica presentada por bacterias aerobias heterótrofas. La adquisición de pSymB le habría permitido ampliar su capacidad metabólica al poder metabolizar una gran variedad de compuestos que estarían presentes en el suelo y en la rizósfera. Esto se debe a que casi un 20 % de pSymB está compuesto por genes que codifican para sistemas de adquisición de solutos y presenta genes implicados en actividades catabólicas. Por otro lado, un 14 % de los genes estaría dedicado a la síntesis de polisacáridos, indicando la importancia de este crómido en la capacidad de la bacteria para colonizar la planta. El plásmido pSymA está especializado en la nodulación y la fijación de nitrógeno ya que contiene los genes *nod*, *nif* y *fix* esenciales para estos procesos. La adquisición de pSymA habría permitido entonces lograr nodular y colonizar un ambiente bajo en oxígeno como lo es el nódulo (126, 127).

Interesantemente, todos los replicones están presentes en los distintos aislamientos salvajes de *S. meliloti* y no existen evidencias de que se pierdan naturalmente. Esto sugiere que tanto pSymB como pSymA son componentes indispensables del genoma en los ambientes naturales donde el microorganismo se encuentra (127).

ADQUISICIÓN DE HIERRO Y SU REGULACIÓN EN *S. meliloti*

Adquisición de hierro en vida libre

En vida libre *S. meliloti* se enfrenta a condiciones donde el hierro está poco biodisponible y necesita estrategias que le permitan solubilizar y utilizar el Fe^{3+} . Estas estrategias incluyen la producción de sideróforos endógenos, la utilización de sideróforos

producidos por otros microorganismos (xenosideróforos) y la utilización de compuestos hemínicos (128, 129). En *S. meliloti*, como en todas las bacterias Gram-negativas, cualquiera de estas estrategias necesita de la presencia de receptores de membrana externa dependientes de TonB (TBDRs, “TonB dependent receptors”).

A partir de la secuenciación del genoma de *S. meliloti* 1021, Capela *et al.* (126) predijeron por homología de secuencia la presencia de al menos seis TBDRs. En el año 2010, Lim (130) utilizó una aproximación *in silico* para determinar la presencia de TBDRs en rizobios utilizando como referencia aquellas secuencias de TBDRs en las que se había demostrado su función. En el caso de *S. meliloti* 1021 reportó siete receptores de este tipo, dos localizados en pSymA y cinco localizados en el cromosoma (Tabla 1.3). En base a predicciones por contexto genómico o por filogenia determinó la posible función de estos TBDRs (130).

Tabla 1.3. Identificación *in silico* de transportadores de membrana externa dependientes de TonB presentes en *S. meliloti* 1021^a.

Locus	Anotación por homología o función	Predicción de especificidad de sustrato según su filogenia	Predicción de especificidad de sustrato según su contexto genómico
SMa1747	<i>fhuA3</i>	Fe-sideróforo	Fe-sideróforo
SMa2414	<i>rhtA</i> ^b	Fe-sideróforo	Fe-sideróforo
SMc01611	<i>fhuA1</i>	Fe-sideróforo	Fe-sideróforo
SMc01657	<i>foxA</i>	Fe-sideróforo	Fe-sideróforo
SMc02726	<i>shmR</i>	Hemo	—
SMc02890	<i>fyuA</i>	—	—
SMc04205	<i>hasR</i>	Hemo	—

^aModificada de Lim 2010 (130)

^b En rojo se indican aquellos genes para los que se ha demostrado su función

Como se muestra en la tabla 1.3, sólo 4 de estos sistemas han sido caracterizados por lo que no se puede asumir que todos ellos estén involucrados en el metabolismo de hierro.

Rizobactina 1021

La producción del sideróforo rizobactina 1021 (un dihidroxamato derivado del citrato), fue el primer sistema de adquisición de hierro identificado y caracterizado en *S. meliloti* 1021 (128, 131). Su síntesis, internalización y regulación implica la participación de una agrupación de genes localizados en el plásmido pSymA (Fig. 1.21). Los genes *rhtX-rhbABCDEF* forman parte de un operón y están implicados en la síntesis del sideróforo (*rhbABCDEF*) y en el transporte del complejo ferri-sideróforo a través de la membrana interna (*rhtX*) (132, 133). Corriente abajo se encuentra el gen *rhtA*, que codifica para el receptor de membrana externa involucrado en el reconocimiento de la rizobactina férrica. Entre el operón *rhtX-rhbABCDEF* y el receptor *rhtA*, se encuentra el gen *rhrA* ubicado en la hebra complementaria. Este gen codifica para una proteína que actúa como activador tanto de los genes biosintéticos para el sideróforo como del gen *rhtA* (133).



Fig. 1.21. Organización genómica de los genes involucrado en la síntesis (*rhb*), regulación (*rhr*) y transporte (*rht*) de rizobactina 1021 en *S. meliloti*. Los genes *rhtX-rhbABCDEF* forman parte de un mismo operón involucrado en la síntesis del sideróforo y su transporte a través de la membrana interna. *rhrA* codifica para un activador específico de la síntesis y adquisición de rizobactina. *rhtA* codifica para el receptor de membrana externa involucrado en la adquisición del sideróforo. Tomado de O'Ciuv *et al.* (132).

Utilización de xenosideróforos

S. meliloti es capaz de utilizar los xenosideróforos ferricromo y ferrioxamina B, producidos por streptomycetes y hongos, respectivamente (129). En *S. meliloti* 2011, una cepa estrechamente relacionada con *S. meliloti* 1021, el mecanismo implicado en el transporte de estos sideróforos ha sido caracterizado. Los genes *fhuA1* y *foxA* codifican para los receptores de membrana externa de ferricromo y ferrioxamina B, respectivamente (134). Si bien existe en *S. meliloti* otro homólogo a *fhuA* (*sma1747*), no participa en la adquisición de ninguno de estos dos sideróforos ya que mutantes en *fhuA1* o *foxA* pierden la capacidad de utilizarlos, indicando que no existe un sistema

alternativo para estos sideróforos al menos en las condiciones ensayadas. Corriente abajo de *foxA* se encuentran los genes *fhuF* y *fhuP*, que codifican respectivamente para una ferrioxamina B reductasa y una proteína periplásmica implicada en la adquisición de ambos sideróforos. Los genes *hmuUV* son los responsables del transporte de estos sideróforos a través de la membrana interna (134). Dado que el operón *hmuTUV* codifica para el sistema transportador involucrado en la adquisición de hemo en *S. meliloti* 2011, este resultado implica que la permeasa *hmuUV* no sólo participa del transporte de hemo, sino que también es capaz de transportar ferrioxamina B y ferricromo. La capacidad de transportar sustratos que son estructuralmente distintos es una propiedad inusual en permeasas, lo que hace de éste un sistema sumamente atractivo. Interesantemente, la proteína periplásmica HmuT no es necesaria para el transporte de los sideróforos (donde la proteína FhuP cumple esta función) pero sí para el transporte de hemo, sugiriendo que la especificidad del sustrato a ser transportado está dada por la proteína periplásmica (134).

Adquisición de compuestos hemínicos

Durante muchos años se consideró que el transporte y utilización de hemo como fuente de hierro era una característica asociada a bacterias patógenas. Sin embargo nuestro grupo encontró que una variedad de rizobios, incluyendo *S. meliloti*, y otras bacterias no patógenas, también podían usar compuestos hemínicos como fuente de hierro (129). Este fue el primer reporte de bacterias no patógenas con esta capacidad.

En *R. leguminosarum* y *B. japonicum* se han identificado algunos de los genes que participan en la captación de hierro hemínico (135, 136). En estas especies, los genes implicados en el transporte de hemina forman una agrupación en el cromosoma e incluyen el transportador *hmuTUV*, así como *exbB*, *exbD* y *tonB* (135, 136). En *B. japonicum* se ha identificado el gen *hmuR* en la misma agrupación genómica. Se demostró que HmuR es el receptor de membrana externa involucrado en la utilización de hemina, hemoglobina y leghemoglobina como fuentes de hierro. Esta proteína no es esencial para la fijación biológica de nitrógeno ni para el establecimiento de una simbiosis efectiva (136). Según una predicción establecida por análisis filogenético de

seis cepas de *Rhizobium*, Lim (130) identificó la presencia de un TBDR posiblemente involucrado en la adquisición de hemo en estas bacterias. El contexto genómico en estas seis cepas es el mismo: el TBDR está ubicado entre el gen *trpE*, que codificaría para una antranilato sintasa, y una proteína tipo extensina (Tabla 1.4) indicando que, a diferencia de *Bradyrhizobium*, en *Rhizobium* el receptor de membrana externa no se encontraría en la misma región genómica que el transportador *hmuTUV*. Hasta el momento, no se ha demostrado la función de ninguno de estos TBDR en *Rhizobium*.

Tabla 1.4. Identificación y ubicación del posible receptor de membrana externa dependiente de TonB presente en cepas de *Rhizobium*^a

Cepa	Locus tag	Gen	Producto
<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	NGR_c23510	<i>trpE</i>	Antranilato sintasa
	NGR_c23520		TBDR (posible receptor de hemina)
	NGR_c23530		Proteína tipo extensina
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 3841	RL3521	<i>trpE</i>	Antranilato sintasa
	RL3522		TBDR (posible receptor de hemina)
	RL3523		Proteína tipo extensina
<i>Rhizobium etli</i> CFN 42	RHE_CH03075	<i>trpE</i>	Antranilato sintasa
	RHE_CH03076		TBDR (posible receptor de hemina)
	RHE_CH03077		Proteína tipo extensina
<i>Rhizobium etli</i> CIAT 652	RHECIAT_CH0003233	<i>trpE</i>	Antranilato sintasa
	RHECIAT_CH0003234		TBDR (posible receptor de hemina)
	RHECIAT_CH0003235		Proteína tipo extensina
	RHECIAT_CH0003235		Proteína tipo extensina
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> WSM1325	Rleg_3078	<i>trpE</i>	Antranilato sintasa
	Rleg_3079		TBDR (posible receptor de hemina)
	Rleg_3080		Proteína tipo extensina
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> WSM2304	Rleg2_2812	<i>trpE</i>	Antranilato sintasa
	Rleg2_2813		TBDR (posible receptor de hemina)
	Rleg2_2814		Proteína tipo extensina

^aModificada de Lim 2010 (130)

Mediante análisis *in silico* del genoma de *S. meliloti* 1021 se identificaron dos posibles receptores de hemo dependientes del complejo TonB: SMc02726 y SMc04205 (126, 130). El marco abierto de lectura SMc04205 presenta identidad de secuencia con varios receptores de hemina y su secuencia incluye el típico motivo FRAP/NPNL, característico

de receptores de membrana externa involucrados en el transporte de hemo (136). Presenta 31 % de identidad de secuencia con HasR de *S. marcescens*, receptor de membrana externa involucrado en la adquisición de hemo mediada por el hemóforo HasA. Hasta el momento no se ha caracterizado la función de este receptor en *S. meliloti* y no se ha descrito la presencia de proteínas homólogas al hemóforo HasA en rizobios. En el año 2002, se caracterizó en nuestro laboratorio el homólogo a la proteína SMC02726 en *S. meliloti* 242, cepa estreptomycin resistente derivada del aislamiento nativo *S. meliloti* 259 (137). Se demostró la capacidad de esta proteína de unir hemo, por lo cual se denominó ShmR (*Sinorhizobium heme receptor*). ShmR es una proteína de membrana externa de 91 kDa, cuya expresión está regulada negativamente por hierro. Presenta el motivo FRAP/NPNL, característico de receptores de membrana externa involucrados en el transporte de hemo (137). En el genoma de *S. meliloti* 1021 el gen *shmR* se encuentra en el cromosoma y no forma parte de ningún operón. Corriente abajo de *shmR* y en la misma hebra se encuentra el gen *trpE*, una posible antranilato sintasa, y corriente arriba y en la hebra contraria el gen *smc02727*, una proteína hipotética con homología parcial con proteínas del tipo extensinas, manteniendo el arreglo génico observado en *Rhizobium*.

En la figura 1.22 se esquematizan los distintos sistemas de adquisición de hierro presentes en *S. meliloti* 1021.

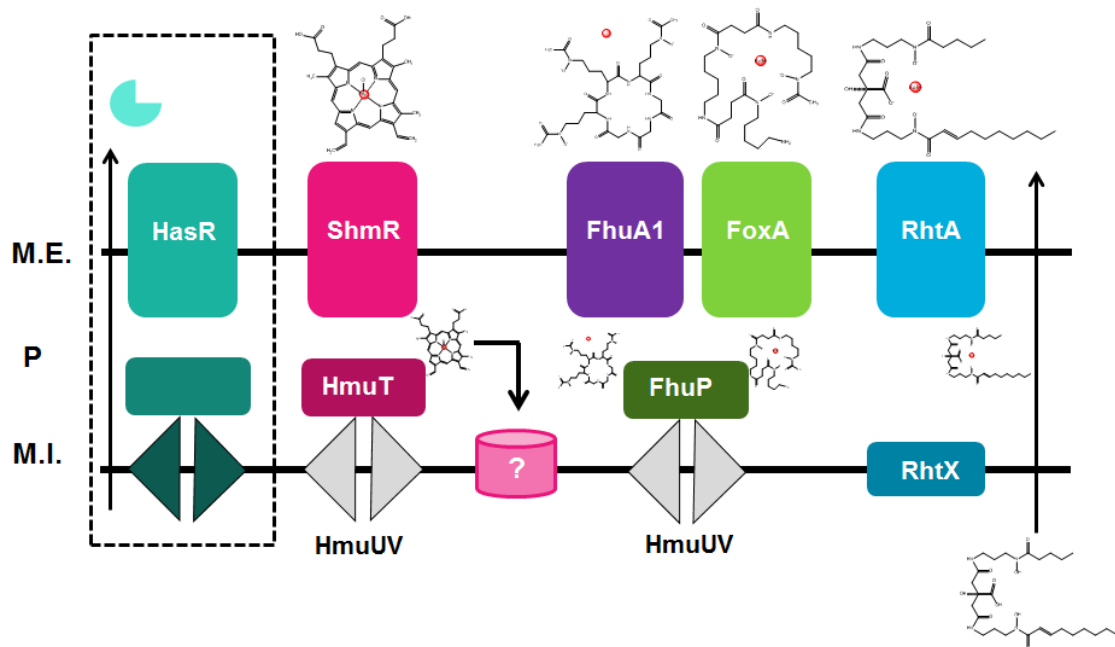


Fig. 1.22. Mecanismos de adquisición de hierro presentes en *S. meliloti* 1021. El receptor RhtA es el encargado del transporte al periplasma del sideróforo endógeno Rizobactina 1021 unido a hierro y RhtX del transporte del complejo ferri-sideróforo al citosol. FhuA1 y FoxA reconocen y transportan al periplasma los xenosideróforos ferricromo y ferroxamina B respectivamente. La proteína periplásmica FhuP, junto con el transportador de tipo ABC HmuUV transportan estos sideróforos al citosol. El receptor de membrana externa encargado de la adquisición de compuestos hemínicos es ShmR. Una vez en el periplasma, el hemo es transportado al citosol por acción de la proteína periplásmica HmuT y el transportador de tipo ABC HmuUV. Existiría otro transportador a nivel de la membrana interna encargado del transporte de hemo (cilindro rosado) aun no caracterizado. El recuadro con línea punteada muestra un posible sistema de adquisición de hemina mediado por hemóforos aún no caracterizado. HasR sería el receptor de membrana externa. Adaptada de O'Brian y Fabiano (41).

Interesantemente, en todos los rizobios estudiados hasta la fecha la presencia de sistemas involucrados en el uso de xenosideróforos es variable mientras que los sistemas de adquisición de compuestos hemínicos están presentes en todos ellos. A su vez, la mayoría de los sistemas de transporte de hemo están ubicados en el cromosoma bacteriano sugiriendo su relevancia para la vida de la bacteria [Revisado por O'Brian y Fabiano 2010 (41)].

Adquisición de hierro en simbiosis

Una vez establecida la simbiosis, *S. meliloti* se enfrenta a condiciones muy distintas a las que debe afrontar en vida libre. La bacteria es endocitada al citoplasma de la célula vegetal y queda rodeada de una membrana de origen vegetal (membrana

peribacteroidea), dependiendo completamente de la planta para el suministro de nutrientes, entre ellos el hierro. Dado que varios de los procesos que se dan en el bacteroide involucran ferro-proteínas (FBN, respiración), la demanda de hierro es muy alta e implica un continuo abastecimiento de este metal por parte de la planta. Su importancia para la simbiosis se ve reflejada en la distribución del hierro en plantas noduladas. En soja se determinó que en el estadio maduro del nódulo éstos contienen el 44 % del hierro total de la planta, salvo cuando madura la semilla donde pasa a ser un 27 % [Revisado por Brear *et al.* (138)]. El hierro podría llegar al nódulo por la vasculatura de la planta o lo podría adquirir directamente de la rizósfera. En nódulos de *Phaseolus vulgaris* se ha reportado la presencia de reductasas férricas en células del córtex que estarían involucradas en la solubilización y utilización del hierro presente en la rizósfera [Revisado por Brear *et al.* (138)]. En *Medicago truncatula* se demostró que el hierro llega al nódulo a través de la vasculatura de la planta en forma de citrato férrico y se libera al apoplasto en la zona II. El hierro es posteriormente internalizado por las células vegetales infectadas a través de transportadores no caracterizados (transportadores de iones metálicos, posiblemente tipo ZIP o Nramp) y en la zona III el hierro es transportado al simbiosoma (posiblemente por acción de transportadores de tipo vacuolar) para quedar disponible para el bacteroide (34).

A pesar de la importancia del hierro en la simbiosis y la FBN, se desconoce realmente cuál es la fuente de hierro disponible para el bacteroide y los mecanismos implicados en su adquisición. Se podría especular que: **i)** el hierro se encuentra en su forma oxidada (Fe^{3+}), formando complejos poco solubles y la bacteria utiliza su sideróforo endógeno para adquirirlo; **ii)** habría un sistema de transporte de citrato férrico o de otro compuesto férrico o ferroso, activo en el bacteroide; **iii)** el hierro en el simbiosoma se encuentra en su forma reducida (Fe^{2+}), más soluble y estable, y podría ser transportada por transportadores de ion ferroso; **iv)** el bacteroide es capaz de utilizar el hemo de la leghemoglobina presente en el nódulo que sería transportado por los sistemas de adquisición de compuestos hemínicos; **v)** la bacteria antes de diferenciarse es capaz de almacenar hierro suficiente como para satisfacer las demandas del bacteroide.

¿Sideróforos o leghemoglobina?

Mediante la generación de mutantes defectuosas en la producción de sideróforos se ha demostrado en varias cepas de *S. meliloti* que estos compuestos no son esenciales para la nodulación ni para la FBN (133, 139). En *R. leguminosarum* mutaciones en los genes *fhuDCB*, involucrados en el transporte del sideróforo endógeno vicibactina a nivel de la membrana interna, o *rpol*, un factor sigma extracitoplasmático que regula la producción del sideróforo, no afectan la simbiosis ni la FBN (140, 141). Estos resultados sugieren que los sideróforos no serían el mecanismo de adquisición de hierro utilizado por los rizobios en las etapas simbióticas.

Si bien la leghemoglobina es abundante en el nódulo (aproximadamente 250 nmoles/gr de nódulo fresco) (142), su disponibilidad para el bacteroide es cuestionable ya que la membrana peribacteroidea separa al bacteroide del citosol de la célula vegetal y no se ha demostrado el transporte de esta fuente de hemo a través de la misma, aunque no podría descartarse que el hemo de la leghemoglobina sí esté disponible [Revisado por O'Brian y Fabiano (41)]. Sin embargo, mutantes en los sistemas de adquisición de hemo en *B. japonicum* y *R. leguminosarum* demostraron no ser necesarios para la nodulación ni para la FBN (135, 136). Como se detalla en el Capítulo II de esta tesis, en el caso de *S. meliloti* el receptor de compuestos hemínicos ShmR tampoco resultó ser necesario en las etapas simbióticas (143). Esto fue reportado concomitantemente por Ó Cuív *et al.* (134).

En *R. leguminosarum* y *B. japonicum* mutantes carentes de TonB no presentaron ningún defecto en la nodulación ni en la FBN, sugiriendo que los receptores de membrana externa dependientes de TonB no estarían implicados en la adquisición de hierro en las etapas simbióticas, lo que descartaría a los sideróforos y la leghemoglobina como posibles fuentes de este metal o al menos a los mecanismos mediados por TonB (135, 136).

¿Bacterioferritina?

Las bacterias pueden almacenar el hierro citosólico en proteínas especializadas del tipo ferritinas. De esta manera, cuentan con una fuente interna de hierro que en algunos casos se ha demostrado que puede ser utilizado cuando la disponibilidad del metal

disminuye. Las proteínas de almacenamiento que se han identificado en bacterias son las bacterioferritinas, ferritinas y Dps (DNA binding protein from starved cells). Las ferritinas y bacterioferritinas son capaces de almacenar entre 2.000 y 3.000 átomos de hierro, mientras que las Dps almacenan alrededor de 500 átomos [Revisado por Andrews *et al.* (35, 36)]. En el genoma de *S. meliloti* 1021, el gen *smc03786* codifica para una bacterioferritina (Bfr), mientras que están ausentes homólogos a ferritinas y Dps. En nuestro grupo se caracterizó la función de Bfr demostrándose que esta proteína no es esencial para el establecimiento de una simbiosis efectiva (144).

¿Ion ferroso?

Recientemente se demostró *in planta* mediante sondas acidofílicas y microscopía confocal que el espacio que existe entre el bacteroide y la membrana peribacteroidal (espacio peribacteroidal, EPB) en la zona del nódulo donde se encuentran los bacteroides activos (zona III) es un compartimento ácido. Se determinó que existe un gradiente de pH en el EPB de las distintas zonas de nódulos indeterminados. La zona de diferenciación de la bacteria a bacteroide (zona II) presenta un pH de 5,5-6, la zona activa un pH de 4,5-5 (el cual es más ácido que el pH del citoplasma de la célula vegetal y que el del bacteroide), y en la zona de senescencia el pH es de 6-6,5. La acumulación de protones en el EPB en la zona III generaría la fuerza protón motriz necesaria para la adquisición de solutos por parte del bacteroide (145). Por otro lado, los bacteroides se encuentran en un ambiente bajo en oxígeno necesario para que se de la FBN. Tomando en cuenta entonces que el EPB es un ambiente ácido y bajo en oxígeno, se podría esperar que el hierro libre se encuentre soluble en forma de ion Fe^{2+} . El ion Fe^{2+} atravesaría la membrana externa a través de porinas y una vez en el periplasma podría ser transportado al interior del bacteroide en forma de Fe^{2+} . En *E. coli* y otras bacterias, el transporte de ferroso está a cargo de la proteína FeoB. No se han identificado genes homólogos a FeoB en los genomas de *S. meliloti* y *R. leguminosarum*. En *B. japonicum*, el producto de *blr6523* presenta 31 % de identidad de secuencia con FeoB de *E. coli*, pero no se ha demostrado que efectivamente transporte Fe^{2+} [Revisado por O'Brian y Fabiano (41)]. La existencia de transportadores de Fe^{2+} alternativos en rizobios no ha sido estudiada.

Regulación

El regulador global de respuesta a hierro en *S. meliloti* es la proteína RirA, la cual presenta 84 % de identidad de secuencia aminoacídica con la proteína RirA de *R. leguminosarum* (146, 147). En el genoma de *S. meliloti*, el gen *rirA* no forma parte de ningún operón. Corriente abajo se encuentra una agrupación de genes posiblemente involucrados en el transporte de dipéptidos (*dppA1-F1*) y corriente arriba el gen *fbpA*. La mutante *rirA* presenta una disminución en el crecimiento en condiciones de disponibilidad de hierro y es incapaz de crecer en presencia de hemo. Este fenotipo se debe a la des-represión de los sistemas de adquisición, que implican la acumulación de hierro y hemina en concentraciones que resultan tóxicas para la bacteria (146). Mediante una aproximación transcriptómica usando microarreglos, se comparó la expresión de 6.208 genes con dos finalidades: i) determinar los genes regulados por RirA y ii) determinar la expresión diferencial de genes en función de la disponibilidad de hierro. Para determinar el regulón RirA, se comparó la expresión de la cepa parental vs la mutante $\Delta rirA$ en condiciones de disponibilidad de hierro donde la proteína RirA es activa. Para determinar la expresión diferencial en función del hierro, se comparó la expresión de la cepa parental en condiciones de disponibilidad vs ausencia de hierro. Se determinó que el regulón RirA abarca 195 genes, 132 de ellos sujetos a represión por RirA y 63 sujetos a activación. Se determinó el “estimulón” de hierro, definido como aquellos genes que presentan una expresión diferencial en condiciones de baja disponibilidad de hierro (Fig. 1.23) (146).

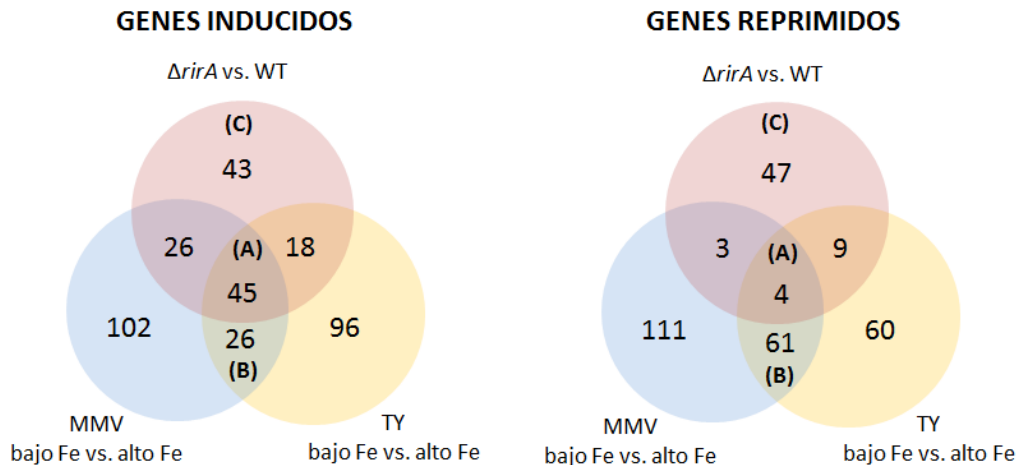


Fig. 1.23. Diagrama de Venn de los genes de *S. meliloti* con expresión alterada obtenidos por microarreglos. Los grupos de genes que resultan más interesantes son aquellos que presentan una inducción o represión en función del hierro pero de forma independiente de RirA (subconjunto B), en las tres condiciones de microarreglo ensayadas (subconjunto A) y solamente en la mutante *rirA* en comparación con la cepa parental (subconjunto C). Adaptada de Chao *et al.* (146)

El estímulo abarca 136 genes, 71 inducidos y 65 reprimidos en condiciones de bajo hierro (Fig. 1.23, subconjuntos A y B). De estos 71 genes inducidos, 45 también mostraron represión por RirA demostrando el papel de esta proteína como regulador global de respuesta a hierro (Fig. 1.23 izquierda, subconjunto A). Interesantemente, de los 65 genes del estímulo que son reprimidos en bajo hierro, sólo 4 son activados por RirA, indicando que esta proteína actúa principalmente como represor, aunque puede tener también una función activadora (directa o indirecta) en condiciones de bajo hierro (Fig. 1.23 derecha, subconjunto A). La presencia de genes del estímulo que no dependen de la acción de RirA sugiere la presencia de otros mecanismos de regulación implicados en la adaptación a condiciones limitantes de hierro (Fig. 1.23, subconjunto B). Los autores proponen que el hecho que se detectaran 90 genes con expresión diferencial exclusivamente en el contexto $\Delta rirA$, independientemente de la disponibilidad de hierro (Fig. 1.23, subconjunto C) se podría deber a que: **i)** RirA es capaz de regular genes en forma independiente de hierro; **ii)** la limitación de hierro no fue suficiente para generar un cambio significativo en la expresión; **iii)** la mutación en *rirA* podría tener como consecuencia cambios a nivel transcripcional que sean mediados por

el estado fisiológico de la célula y no directamente por la ausencia de la proteína RirA (146).

Dentro de los genes cuya expresión está altamente inducida en condiciones de baja disponibilidad de hierro y en la mutante *rirA* en presencia de hierro se encuentran los implicados en la biosíntesis, adquisición y regulación de sideróforos (Fig. 1.24 A), así como la agrupación de genes involucrados en la adquisición de hemo y otra agrupación corriente arriba de éste (Fig. 1.24 B). Si bien el gen *shmR* no forma parte de la misma agrupación genómica que *hmuTUV*, su expresión también se encuentra altamente inducida en condiciones de baja disponibilidad de hierro y en la mutante *rirA* en presencia de hierro (146).

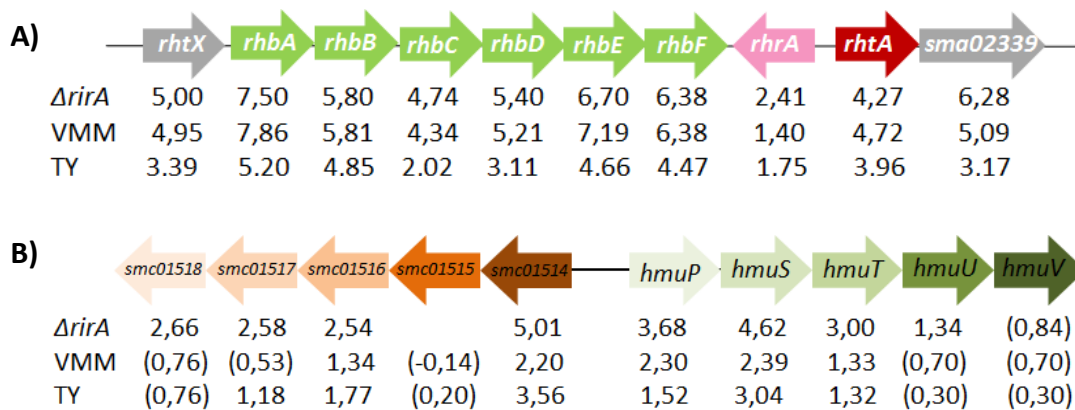


Fig. 1.24. Genes implicados en la utilización de hierro altamente inducidos en la mutante *rirA* y en condiciones de baja disponibilidad de hierro. Mapa físico de la región implicada en la síntesis, adquisición y regulación del sideróforo rizobactina 1021 (A) o de la adquisición de hemo (B). Los valores muestran el \log_2 de la proporción de expresión respecto a la cepa parental en el caso de *ΔrirA* o a respecto a la condición de suficiencia de hierro en el caso del medio mínimo MMV y el medio rico TY. Adaptada de Chao et. al (146).

Si bien mediante esta aproximación no se pudo determinar un patrón de expresión diferencial para *rirA* en función de la disponibilidad de hierro, Viguier *et al.* (147) determinaron por PCR cuantitativa que su expresión está reprimida en condiciones de bajo hierro.

En el genoma de *S. meliloti* 1021 también se encuentra un gen homólogo a *irr* cuya secuencia aminoacídica posee un 85 % y 57 % de identidad con las proteínas Irr de *R. leguminosarum* y *B. japonicum* (respectivamente). Resultados obtenidos en nuestro laboratorio (144) así como el análisis *in silico* del genoma (95), indicarían que en *S.*

meliloti su actividad estaría restringida al control de unos pocos genes y no sería un regulador global de la respuesta a hierro, a diferencia de lo encontrado en *B. japonicum*.

Mediante una aproximación *in silico*, Rodionov *et al.* determinaron la presencia de los motivos de unión a RirA (caja RirA) y a Irr (ICE) en varias α -Proteobacteria, entre ellas *S. meliloti* 1021 (95). Si bien el regulón RirA en *S. meliloti* involucraría aproximadamente 130 genes sujetos a represión por esta proteína, el análisis *in silico* permitió identificar cajas RirA en la región 5' de 24 operones, correspondiéndose a aproximadamente 50 genes sujetos a regulación por RirA (Fig. 1.25) (95, 146). Esta aparente discrepancia podría explicarse por cambios transcripcionales ocurridos en la mutante *rirA* relacionados a la desregulación de los mecanismos de adquisición de hierro y no a la ausencia de RirA *per se*. Otra posibilidad es que la proteína RirA modifique la expresión de ciertos genes mediante cascadas regulatorias que incluyan otros reguladores transcripcionales, por ejemplo RhrA (95, 146).

Locus ID	Operon	Position	Score	RirA-box	Function
<i>Sinorhizobium meliloti</i>					
SMc01657	<i>fhuA2-fhuF-irp6A2</i>	-94	5.34	CATGACTt aAAaAGTCATG	ferrichrome iron receptor, ferric iron reductase, Ferrisiderophore-binding protein
		-51	4.01	CATGAgTgaTtagcTCacc	
SMa2412	<i>rhrA</i>	-107	4.88	CAaGACTATTt aAGTCATG	transcriptional activator of rhizobactin biosynthesis and transport
SMa2414	<i>rhtA-iucB(vbsA)</i>	-80	4.88	CATGACTt aAATAGTctTG	rhizobactin receptor, siderophore biosynthesis
SMc01747	<i>hmuPSTUV</i>	-134	4.82	tATGAgTAAaTgaAGTCAaG	hemin ABC transporter
SMc01514	<i>SMc01514-tonB</i>	-114	4.82	CtTGACTt cAtTAcTCAaT	hypothetical protein, iron transport component TonB
SMc02889	<i>rhtX2 - viuA</i>	-65	4.77	CcTGAAaTgcAATAGTCAaG	ferrisiderophore permease and receptor
SMc00529	<i>sufS2-sufBCDS1XA</i>	-164	4.74	CtTGACTAAaAccAGTCAgc	Fe-S cluster assembly
SMc04203	<i>fecI-fecR</i>	-171	4.68	CATGAtTATctcAaTCAac	iron transport sigma factor and sensor
SMb21432	<i>irp6A1-irp6BC</i>	-58	4.68	gtTGACcggTAAaAGTCATG	ferrisiderophore ABC transporter
SMc00045	<i>cycF-cycG</i>	-183	4.57	gATGAgTt cTATAcTCAaT	cytochrome c-556, diheme cytochrome c-type [heme]
SMa2337	<i>rhtX-rhbABCDEF</i>	-60	4.47	gATGACggcAAcAcTCAaT	rhizobactin siderophore transporter, and biosynthesis genes
SMc00592		-54	4.37	CtTGACgATcAAaAGTCAgc	similar to AMP-dependent synthetase / ligase:Acyltransferase 3
SMc02726	<i>shnR</i>	-140	4.26	atTGACaATcAcAcTCAaT	hemin receptor
		-53	3.84	CtTGAgTt cgcgcgTCaAc	
SMc02727		-89	3.84	gtTGAgcggcgaAcTCAaG	hypothetical protein
		-2	4.26	CATGAgTgTgATtGTCaAt	
SMc04205	<i>hmuR</i>	-120	4.26	tATGACatccgTt tTCAaG	heme receptor
SMc02085	<i>exbB-exbD</i>	-182	4.20	CtTGAtTATTgTAcTCCac	components for TonB-dependent iron transporters
SMc01611	<i>fhuA1</i>	-86	4.08	gtTGAtct agAcAcTCAcTc	ferrichrome iron receptor
		-62	4.19	gtTGACagTAccgGTCaCg	
SMa1746	<i>fepBDGC-mxcB</i>	-178	4.09	CATGAaagcTt cgcTCAac	ferriterobactin ABC transporter, siderophore-interacting protein
SMa1747	<i>fhuA3</i>	-103	4.09	gtTGAgcgaAgcttTCATG	ferrichrome iron receptor
SMa1749	<i>araX1</i>	-115	4.01	aATGAgAATAcgAGTCAac	siderophore uptake AraC-type regulator
SMc00784	<i>fhpA</i>	-46	3.97	tATGAtTgactaAGTcAAg	ABC-type Fe3+ transport system, periplasmic component
SMc00785	<i>rirA</i>	-172	3.97	CtTaACTt agtcAaTCAaT	iron-responsive regulator RirA
SMc03787	<i>bfd-bfr</i>	-67	3.79	gtTGACggcAAaTGTcCtC	bacterioferritin ferredoxin, bacterioferritin

Fig. 1.25. Cajas RirA identificadas en *S. meliloti* 1021. Locus ID, gen donde se determinó un motivo de unión a RirA en su región 5'; Operon, posibles genes afectados por el motivo identificado en el locus; Position, posición en nucleótidos donde se ubica el motivo con respecto al sitio de inicio de la traducción; Function, posible función del operón que presenta el motivo. En azul se muestran los genes implicados en la adquisición de hierro, en rojo los de almacenamiento, en verde los de utilización (síntesis de hemo y centros Fe-S, proteínas que contienen hierro), y en violeta los factores de transcripción. Los recuadros negros indican aquellos locus que se transcriben de forma divergente y comparten la caja RirA. Con fondo celeste se muestran aquellos genes que coinciden con el regulón RirA determinado en la aproximación transcriptómica. Tomada de Rodionov *et al.* (95).

La mayoría de los resultados obtenidos *in silico* concuerdan con los resultados transcriptómicos ya que de los 24 operones que presentaron una caja RirA, 16 de ellos forman parte del regulón RirA determinado por la aproximación transcriptómica.

Mediante la aproximación *in silico* se pudieron predecir posibles blancos de acción de la proteína RirA que no forman parte del regulón determinado por la aproximación transcriptómica (95).

La aproximación *in silico* también permitió predecir posibles blancos de acción de la proteína Irr en *S. meliloti*. Se determinó que en algunos casos existe un solapamiento entre los regulones Irr y RirA, tal como en el caso de *R. leguminosarum*. Cinco genes presentaron tanto motivos de unión a RirA como a Irr, siendo uno de ellos el gen *rirA* donde la caja RirA se ubica corriente arriba del ICE, sugiriendo que la regulación mediada por Irr es negativa (104). En la figura 1.26 se esquematiza la ubicación y organización en el genoma de *S. meliloti* de los posibles blancos de acción de las proteínas RirA e Irr.

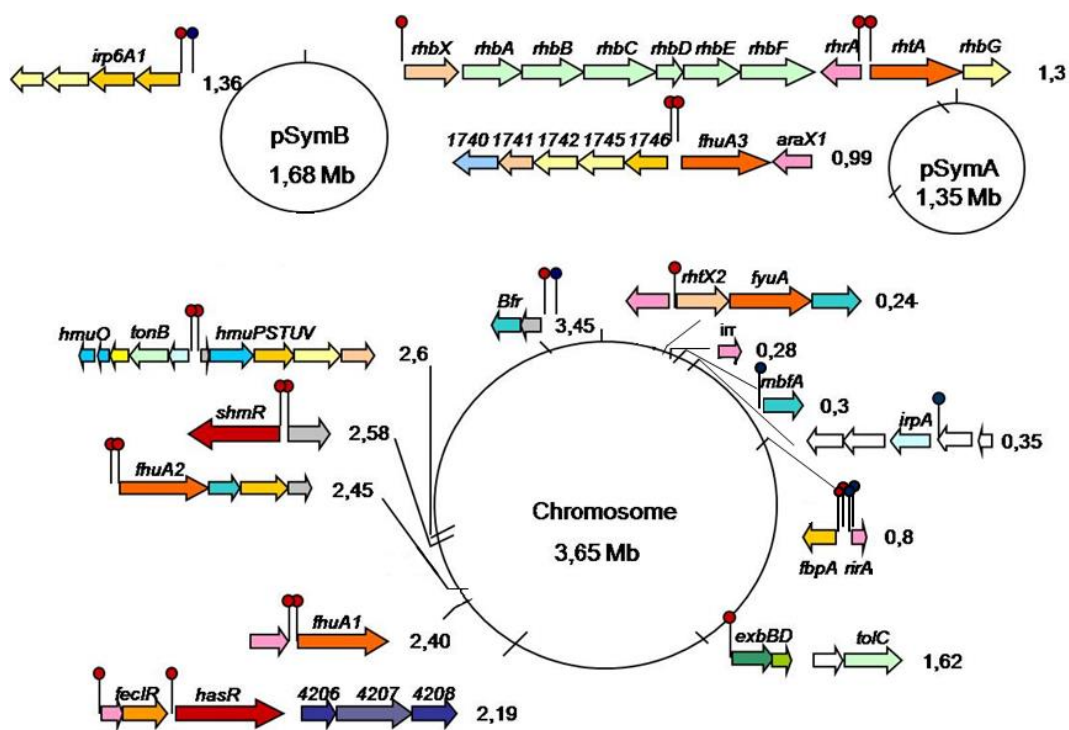


Fig. 1.26. Blancos de acción de las proteínas RirA e Irr en *S. meliloti* 1021 identificados mediante aproximación *in silico*. Los círculos rojos indican la ubicación de las posibles cajas RirA y los azules la ubicación de los ICE determinados *in silico*. Los receptores de membrana externa dependientes de TonB implicados o posiblemente implicados en la adquisición de hierro se muestran en anaranjado y aquellos que participan o tienen el potencial de participar en la adquisición de compuestos hemínicos se muestran en rojo. Adaptada de O'Brian y Fabiano (41).

La simbiosis rizobio-leguminosa es un sistema único que ha sido objeto de estudios intensivos durante las últimas décadas. Más allá de su indudable importancia económica y ecológica, la utilización de rizobios como modelo de estudio ha contribuido a la comprensión de sistemas biológicos complejos permitiendo nuevos enfoques en el estudio de las interacciones microorganismo-hospedero. La búsqueda de factores responsables de detectar la disponibilidad de hierro y responder adecuadamente a través de la regulación de la expresión génica es un tema de activa investigación en rizobios. El hecho que estos microorganismos se aparten del modelo clásico de regulación mediada por Fur, que presenten una regulación compleja donde existe un solapamiento de distintas cascadas de regulación y que los reguladores implicados respondan de forma indirecta a la concentración intracelular de hierro, hacen de estos microorganismos modelos muy interesantes para el estudio de la homeostasis de hierro.

HIPÓTESIS

A partir de la evidencia de que *S. meliloti* 1021 es capaz de utilizar compuestos hemínicos como fuente de hierro nutricional, nuestra hipótesis de trabajo es que esta bacteria presenta en su genoma un repertorio de genes que codifican para sistemas responsables de la adquisición y de la utilización de estos compuestos así como de reguladores involucrados en su expresión.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Profundizar en la elucidación de los sistemas implicados en la captación y utilización de hemina como fuente de hierro nutricional en *S. meliloti* 1021 así como en los mecanismos que regulan su expresión

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la participación de la proteína ShmR en la adquisición de hierro a partir de compuestos hemínicos y su función en la simbiosis con alfalfa.
2. Identificar genes responsables de la regulación de la expresión del gen *shmR* y determinar su mecanismo de acción.
3. Identificar enzimas con actividad hemo-oxigenasa y evaluar su relevancia en la fisiología de la bacteria en vida libre y en asociación con la planta hospedera.

CAPÍTULO II: ShmR es esencial para la utilización de hemo como fuente de hierro nutricional en *Sinorhizobium meliloti*

Vanesa Amarelle, Mark R. O' Brian y Elena Fabiano (2008). ShmR is essential for utilization of heme as a nutritional iron source *in Sinorhizobium meliloti*. Applied and Environmental Microbiology, 74 (20): 6473 - 6475.

RESUMEN

Nuestro grupo había demostrado que *S. meliloti* era capaz de utilizar diferentes compuestos hemínicos como fuente de hierro nutricional (129), había identificado mediante análisis *in silico* al receptor ShmR y demostrado que éste era capaz de combinarse con el hemo *in vitro* (137). En este capítulo nos planteamos como objetivo, elucidar la función de ShmR en *S. meliloti* 1021. Para esta aproximación se construyó una mutante donde el gen *shmR* fue interrumpido con un cassette *lacZ-Gm^R* y se evaluó el comportamiento de la cepa obtenida. La mutante presentó un aumento en la producción del sideróforo Rizobactina 1021, posiblemente como consecuencia de un mecanismo compensatorio, por lo que se construyó también una doble mutante carente de ShmR y del activador de la síntesis de sideróforos RhrA. Se determinó la importancia de ShmR para la adquisición de distintas fuentes de hierro en vida libre mediante la evaluación del crecimiento en cultivos líquidos y bioensayos, comprobándose en las condiciones ensayadas su relevancia para la utilización de hierro a partir de compuestos hemínicos. Los resultados obtenidos a partir de la inoculación de plantas de alfalfa con la cepa parental o con la mutante carente de ShmR, indicaron que esta proteína no es esencial para el establecimiento de una simbiosis efectiva.

OBJETIVOS

Determinar la participación de la proteína ShmR en la adquisición de compuestos hemínicos en vida libre y en simbiosis en *S. meliloti* 1021.

PRINCIPALES RESULTADOS Y CONCLUSIONES

En este capítulo demostramos que el receptor de membrana externa ShmR es necesario para la utilización de hemina, hemoglobina y leghemoglobina como fuentes de hierro nutricional en *S. meliloti*, pero no lo es en el caso del FeCl₃, ferricromo o rizobactina férrica. Nuestros resultados indican que en las condiciones ensayadas el sistema mediado por ShmR es el único sistema funcional involucrado en la utilización de compuestos hemínicos como fuentes de hierro cuando la bacteria crece en condiciones de vida libre. Demostramos también que la bacteria es capaz de percibir la presencia de hemo en el medio extracelular y responder mediante la represión de este sistema de alta afinidad. Comprobamos que la proteína ShmR no es necesaria para el establecimiento de la simbiosis con alfalfa ni para la fijación biológica de nitrógeno y planteamos dos posibles alternativas: **i)** la leghemoglobina no es la fuente de hierro nutricional en las etapas simbióticas; **ii)** existe un sistema alternativo de adquisición de compuestos hemínicos que se expresa en condiciones aún no determinadas, siendo la etapa simbiótica una de estas condiciones.

Contribución personal al trabajo. Fui responsable de la totalidad de las actividades prácticas realizadas en este trabajo. Participé activamente de la interpretación y discusión de los resultados, así como de la redacción del manuscrito.

Financiación. Este trabajo fue financiado por el National Institute of Health (NIH), la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) y el Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA).

ShmR Is Essential for Utilization of Heme as a Nutritional Iron Source in *Sinorhizobium meliloti*[∇]

Vanesa Amarelle,¹ Mark R. O'Brian,² and Elena Fabiano^{1*}

Laboratorio de Ecología Microbiana, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, MEC, Unidad Asociada a la Facultad de Ciencias, Av. Italia 3318, Montevideo 11600, Uruguay,¹ and Department of Biochemistry, School of Medicine and Biomedical Sciences, State University of New York at Buffalo, Buffalo, New York 14214²

Received 11 July 2008/Accepted 21 August 2008

The bacterium *Sinorhizobium meliloti* is able to use heme as a nutritional iron source. Here, we show that the iron-regulated *shmR* gene encodes an outer membrane protein required for growth on heme. Furthermore, an *shmR* mutant is resistant to the toxic heme analog gallium protoporphyrin. Thus, the receptor protein of the heme transport system has been identified in *S. meliloti*.

Heme is an iron protoporphyrin, which serves as the prosthetic group of heme proteins. Many bacteria, including *Sinorhizobium meliloti* and other rhizobia, can use heme as a nutritional iron source (8). In gram-negative bacteria, a heme-binding outer membrane receptor is a component of a heme transport system. Heme uptake systems in *Rhizobium leguminosarum* (14) and *Bradyrhizobium japonicum* (7) have been described, but a heme receptor was identified only in the latter species. Bioinformatic analysis of the *S. meliloti* 1021 genome identified two putative heme receptor genes, smc02726 and smc04205. We previously characterized the Smc02726 homolog in *S. meliloti* 242. This protein was shown to bind heme; thus, it was named ShmR (*S*inorhizobium *h*eme receptor) (2). In the *S. meliloti* 1021 genome, the *shmR* gene is on the chromosome and is not clustered within an operon. In this study, we investigate the role of ShmR in heme utilization in *S. meliloti* 1021.

In order to assess differential expression of outer membrane proteins in response to iron, cells were grown in M3 (2) iron-replete media or in media where iron was chelated with ethylenediamine-di-*o*-hydroxyphenylacetic acid (EDDHA). Outer membrane fractions were prepared as previously described by Battistoni et al. (2), which includes a step to solubilize inner membrane proteins and thus separate them from the insoluble outer membrane proteins. Analysis of the outer membrane protein profile of the *S. meliloti* 1021 cells revealed the presence of two proteins, 82 and 91 kDa in size, that were absent in iron-replete cultures. These two proteins were identified by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as RhtA and ShmR, respectively (data not shown). ShmR migrated more slowly than its predicted size of ca. 80 kDa, which is not unusual for membrane proteins. RhtA is an outer membrane receptor for the siderophore rhizobactin, which is specifically expressed under iron limitation (6). We did not attempt to identify other outer membrane proteins.

To further address the function of *shmR*, we constructed a

mutant strain disrupted in that gene as follows. A 2.7-kb DNA fragment containing the *shmR* gene was amplified from the *S. meliloti* 1021 genome by PCR using primers 5'-ATTCGCTCTCGCTCCGTA AAA and 5'-CAAATTGTGCTGAAACTGAGG as the forward and reverse primers, respectively, and cloned in the EcoRV site of pBluescript II SK (Stratagene). The *shmR* gene was disrupted by introducing the *lacZ*-Gm^r cassette from plasmid pAB2001 (3) into the SphI site of *shmR*, which creates a transcriptional *shmR::lacZ* fusion (Fig. 1). An EcoRI fragment containing the disrupted *shmR* gene was subcloned in the EcoRI site of pK18mobsacB (11) and mobilized into *S. meliloti* strain 1021 by triparental mating using DH5 α (pRK2013) as a helper strain (5). Double recombinants were initially identified based on streptomycin, gentamicin, and sucrose resistance and confirmed by Southern blotting using the 2.7-kb PCR fragment as a probe.

We compared the outer membrane profiles of the wild type with the *shmR* mutant strain by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis as described by Battistoni et al. (2). A protein band of about 91 kDa, corresponding to ShmR according to mass spectrometry data, was present in the wild-type strain but not in the *shmR* mutant strain grown in iron-limited cultures (Fig. 2).

***shmR* expression responds to exogenous hemin.** High-affinity heme transport systems are induced under iron limitation as a strategy to acquire iron from heme compounds (13). Previously we reported the iron responsiveness of the *shmR* promoter using a plasmid-borne transcriptional fusion with *gfpUV* (9), and similar results were obtained with a chromosomal *lacZ* fusion in this work (data not shown). Here, we examined the responsiveness of the *shmR* promoter to heme as an iron source using the plasmid-borne transcriptional fusion with *gfpUV* (Fig. 3). Under low-iron conditions with no exogenous heme, *shmR* promoter activity was induced, but activity decreased with increasing heme concentrations. Thus, expression of *shmR* is responsive to exogenous hemin and qualitatively similar to the response to iron (9).

The *S. meliloti* *shmR* mutant is resistant to the toxic heme analog Ga-PPIX. Bacteria that can transport heme into cells are sensitive to killing by the heme analogue gallium protoporphyrin (Ga-PPIX) (12). To test whether ShmR is required for internalization of heme, we examined the effects of Ga-

* Corresponding author. Mailing address: Laboratorio de Ecología Microbiana, IIBCE, Av. Italia 3318, Montevideo 11600, Uruguay. Phone: 598 (2) 4871616, ext. 146. Fax: 598 (2) 4875548. E-mail: efabiano@iibce.edu.uy.

[∇] Published ahead of print on 29 August 2008.

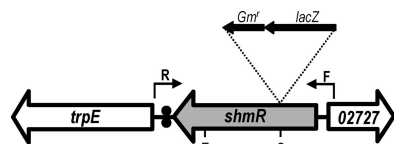


FIG. 1. Physical map of the *S. meliloti* 1021 DNA region containing the *shmR* gene. The *trpE* gene encodes an anthranilate synthase homolog; 02727 encodes a hypothetical protein. Black dots indicate the factor rho-independent transcriptional terminator. F and R indicate forward and reverse primers, respectively. S, SphI restriction site where the *lacZ*-Gm^f reporter was inserted; E, EcoRI restriction site used for subcloning the *shmR*::*lacZ*-Gm^f transcriptional fusion into the suicide plasmid.

PPIX on growth inhibition of the wild-type and *shmR* mutant strains. Ga-PPIX was spotted into wells of iron-chelated solid-medium plates containing cells, and the Ga-PPIX effect was scored as an inhibition halo around the wells. Growth of wild-type strain *S. meliloti* 1021 was affected by Ga-PPIX, as shown by an inhibition halo around the well indicating that Ga-PPIX enters cells. However, growth of the *shmR* mutant was not inhibited, showing that ShmR is required for internalization of the heme analogue. When the strains were grown in iron-sufficient solid media, the presence of Ga-PPIX did not inhibit bacterial growth (data not shown), which is consistent with iron-dependent regulation of *shmR*.

The *shmR* gene is required for utilization of heme as a nutritional iron source. To investigate the effect of a mutation in the *S. meliloti* *shmR* gene on heme-mediated iron nutrition, we tested the ability of the *shmR* mutant to use different iron sources for growth. Under iron limitation, *S. meliloti* synthesizes and transports the siderophore rhizobactin 1021 as an iron scavenging system (6). The expression of this system may interfere with the ability to establish whether the *shmR* strain can use heme as an iron source. To circumvent this problem, we carried out the studies using the rhizobactin-deficient strain H38 (10). This strain is disrupted in the *rhrA* gene, which encodes an activator of the rhizobactin 1021 system (6). This mutant does not produce the endogenous siderophore but retains the ability to utilize heme compounds and heterologous siderophores (10). As a consequence, the *rhrA* mutant is unable to grow in iron-restricted medium unless a nutritional iron source other than ferric-rhizobactin 1021 is added to the medium. The *shmR* gene was disrupted in strain H38 as described above to construct an *rhrA shmR* double mutant. When cultured in iron-replete M3 medium, the *rhrA* mutant and *rhrA*

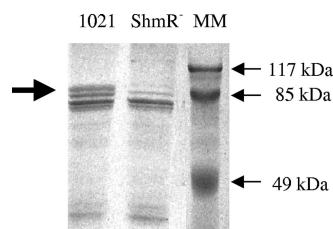


FIG. 2. Outer membrane protein profile. Wild-type *S. meliloti* 1021 and *shmR* mutant (ShmR⁻) strains were grown in M3 minimal medium containing 500 μ M EDDHA. The arrow indicates the protein band corresponding to ShmR. MM, molecular mass markers.

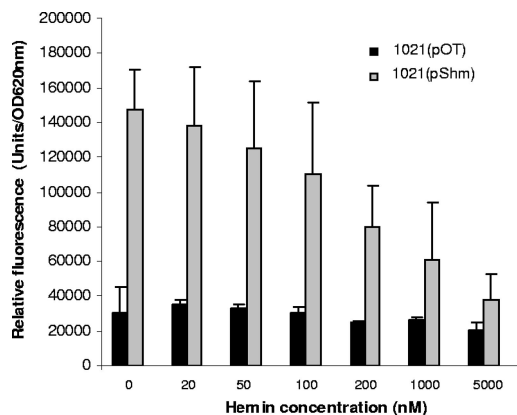


FIG. 3. In vivo effect of hemin concentration on *shmR* promoter activity in *S. meliloti* 1021. Wild-type strains containing either a plasmid with the presumptive *shmR* promoter fused to *gfpUV* [1021(pShm)] (9) or the pOT1 plasmid [1021(pOT)] (1) were grown in M3 minimal medium supplemented with 150 μ M EDDHA and different hemin concentrations. 1021(pOT) was used as a control. Relative fluorescence, in arbitrary fluorescence units per unit of optical density at 620 nm (OD_{620nm}), was determined. The data shown are the mean values of four independent experiments done by triplicate. The error bars indicate one standard deviation.

shmR double mutant exhibited similar growth properties. By contrast, media supplemented with the iron chelator EDDHA did not support growth of either strain. However, the addition of hemin to the iron-chelated medium restored growth of the *rhrA shmR* mutant but not of the *rhrA shmR* double mutant (Fig. 4). These data show that *shmR* is essential for the utilization of heme as a sole iron source by *S. meliloti*.

S. meliloti strain 1021 is able to use heme proteins, as well as heme, as sources of iron (8). However, the *shmR* strain was unable to grow on hemoglobin or leghemoglobin but retained the ability to grow on FeCl₃, ferrichrome, and ferric-rhizobac-

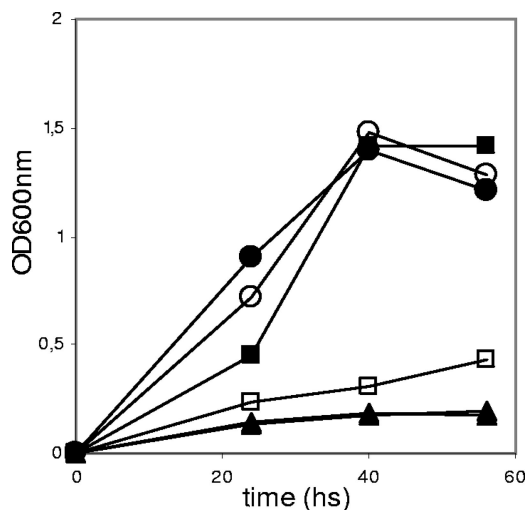


FIG. 4. The *shmR* gene is required to use heme as an iron source. *S. meliloti* H38 strain (black) and its *shmR* derivative mutant (white) were grown in M3 minimal medium supplemented with either 200 μ M EDDHA (triangles), 37 μ M FeCl₃ (circles), or 200 μ M EDDHA plus 10 μ M hemin (squares). OD_{600nm}, optical density at 600 nm.

TABLE 1. Effect of *shmR* gene mutation on the ability to use different compounds as sole iron sources

<i>S. meliloti</i> strain	Bacterial growth ^a (diam [cm] ± SD) around wells containing ^b :					
	Hm (20 nmol)	Hb (5 nmol)	Lb (5 nmol)	Fc (5 nmol)	Rhb1021 (20 nmol)	FeCl ₃ (740 nmol)
1021	2.1 ± 0.2	1.9 ± 0.1	1.9 ± 0.1	2.7 ± 0.2	2.9 ± 0.2	3.5 ± 0.2
<i>shmR</i>	0	0	0	3.1 ± 0.2	2.9 ± 0.2	3.9 ± 0.2

^aResults are averages of three independent experiments.

^bHm, hemin; Hb, hemoglobin; Lb, leghemoglobin; Fc, ferrichrome; Rhb1021, ferric-rhizobactin 1021. Solutions to be tested were added to wells in 500 μM EDDHA-tryptone-yeast extract medium (4) containing about 10⁶ CFU/ml.

tin 1021 (Table 1). These results demonstrate that the *shmR* gene is necessary for iron acquisition from heme, hemoglobin, and leghemoglobin and that this gene encodes the only functional heme receptor present under the conditions tested.

ShmR is not essential for nitrogen fixation. Two independent plant assays were carried out using the wild-type and *shmR* strains to inoculate 20 germinated seedlings in nitrogen-free Jensen medium as previously described (9). No significant differences could be detected in plant dry weight or visualization of nodules formed between *Medicago sativa* cv. Creola plants inoculated with wild-type or *shmR* mutant strains (data not shown). These results indicate that the ShmR protein is not essential for symbiosis or nitrogen fixation in alfalfa in the condition assayed here.

Conclusions. The results presented herein demonstrate that the outer membrane heme-binding protein ShmR plays an essential role in heme internalization and iron nutrition from heme, hemoglobin, and leghemoglobin in the free-living form of *S. meliloti*. Collectively, our findings show that ShmR is the only functional heme receptor in *S. meliloti* in free-living cells.

This research was supported by a grant from the NIH Fogarty International Research Collaboration, award R03 TW007353, to M.R.O., with E.F. as the foreign collaborator; by NIH grant GM067966 to M.R.O.; and by a grant from PEDECIBA-Uruguay to E.F.

We thank Federico Battistoni for mass spectrometry assays.

REFERENCES

- Allaway, D., N. A. Schofield, M. E. Leonard, L. Gilardoni, T. M. Finan, and P. S. Poole. 2001. Use of differential fluorescence induction and optical trapping to isolate environmentally induced genes. *Environ. Microbiol.* **3**:397–406.
- Battistoni, F., R. Platero, R. Duran, C. Cervenansky, J. Battistoni, A. Arias, and E. Fabiano. 2002. Identification of an iron-regulated, heme-binding outer membrane protein in *Sinorhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:5877–5881.
- Becker, A., M. Schmidt, W. Jager, and A. Puhler. 1995. New gentamicin-resistance and *lacZ* promoter-probe cassettes suitable for insertion mutagenesis and generation of transcriptional fusions. *Gene* **162**:37–39.
- Beringer, J. E. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **84**:188–198.
- Figurski, D. H., and D. R. Helinski. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:1648–1652.
- Lynch, D., J. O'Brien, T. Welch, P. Clarke, P. O. Cuiv, J. H. Crosa, and M. O'Connell. 2001. Genetic organization of the region encoding regulation, biosynthesis, and transport of rhizobactin 1021, a siderophore produced by *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **183**:2576–2585.
- Nienaber, A., H. Hennecke, and H. M. Fischer. 2001. Discovery of a haem uptake system in the soil bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Microbiol.* **41**:787–800.
- Noya, F., A. Arias, and E. Fabiano. 1997. Heme compounds as iron sources for nonpathogenic *Rhizobium* bacteria. *J. Bacteriol.* **179**:3076–3078.
- Platero, R., L. Peixoto, M. R. O'Brien, and E. Fabiano. 2004. Fur is involved in manganese-dependent regulation of *mntA* (*sitA*) expression in *Sinorhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:4349–4355.
- Platero, R. A., M. Jauregui, F. J. Battistoni, and E. R. Fabiano. 2003. Mutations in *sitB* and *sitD* genes affect manganese-growth requirements in *Sinorhizobium meliloti*. *FEMS Microbiol. Lett.* **218**:65–70.
- Schafer, A., A. Tauch, W. Jager, J. Kalinowski, G. Thierbach, and A. Puhler. 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**:69–73.
- Stojiljkovic, I., V. Kumar, and N. Srinivasan. 1999. Non-iron metalloporphyrins: potent antibacterial compounds that exploit haem/Hb uptake systems of pathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.* **31**:429–442.
- Wandersman, C., and P. Delepelaire. 2004. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**:611–647.
- Wexler, M., K. H. Yeoman, J. B. Stevens, N. G. de Luca, G. Sawers, and A. W. Johnston. 2001. The *Rhizobium leguminosarum tonB* gene is required for the uptake of siderophore and haem as sources of iron. *Mol. Microbiol.* **41**:801–816.

CAPÍTULO III: Una novedosa proteína pequeña (HmuP) modula la adquisición de hemina en *Sinorhizobium meliloti*

Vanesa Amarelle, Uriel Koziol, Federico Rosconi, Francisco Noya, Mark R. O' Brian y Elena Fabiano (2010). A new small regulatory protein, HmuP, modulates haemin acquisition in *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology*, 156 (6):1873–1882

RESUMEN

Como resultado del trabajo presentado en el Capítulo II se determinó que ShmR es el receptor de membrana externa involucrado en la adquisición de compuestos hemínicos en *S. meliloti* 1021 (143). Si bien se sabía que la expresión de *shmR* estaba regulada negativamente por RirA (146, 147), se desconocía si existían otras proteínas involucradas en su regulación. En este capítulo nos propusimos determinar si había otros reguladores implicados en la regulación de la expresión del gen *shmR*. Para ello se partió de la cepa mutante donde el gen *shmR* estaba interrumpido con el cassette *lacZ-Gm^R*, y se realizó una mutagénesis generalizada con el transposón Tn5-1063a. Se evaluó el fenotipo de expresión de las transconjugantes en búsqueda de una regulación aberrante del gen *shmR* de forma que la expresión de *shmR* en condiciones de baja disponibilidad de hierro se viera reprimida o, por el contrario, activada en presencia de altas concentraciones del metal. De esta forma, a través de la actividad β -galactosidasa determinamos indirectamente la actividad del promotor de *shmR*. Empleando esta estrategia encontramos, en un total de diez mil transconjugantes analizadas, veinte con fenotipo de expresión aberrante. Se logró identificar el sitio de inserción del transposón en siete de las veinte transconjugantes seleccionadas y se analizó en profundidad una de ellas donde el transposón se insertó en el gen *smc01747*, el cual renombramos como *hmuP* en base a homología de su secuencia aminoacídica con la proteína hipotética HmuP de *R. leguminosarum*. Se evaluó la importancia de HmuP para la adquisición de distintas fuentes de hierro en vida libre y su papel como activador (en forma directa o indirecta) de la expresión del receptor de hemina. Se identificó la presencia de un motivo

conservado en la región carboxilo-terminal de HmuP compuesto por los aminoácidos GKLILNK y se comprobó experimentalmente su importancia para la regulación mediada por HmuP. Los datos obtenidos a partir de la inoculación de plantas de alfalfa con la cepa mutante carente de HmuP, indicaron que esta proteína no es esencial para el establecimiento de una simbiosis efectiva. Teniendo en cuenta que esta proteína está anotada como proteína hipotética en la base de datos de los genomas secuenciados de bacterias pertenecientes a diferentes géneros, estos resultados permitirían adjudicarle una posible función también en estas bacterias.

OBJETIVO

Identificar genes responsables de la regulación de la expresión del gen *shmR*.

PRINCIPALES RESULTADOS Y CONCLUSIONES

En este capítulo, mediante la selección de mutantes que presentaran una regulación aberrante de la expresión del gen *shmR*, identificamos al gen *hmuP* como necesario para la activación de la expresión de *shmR* en condiciones de baja disponibilidad de hierro y por lo tanto para la internalización de la hemina. El mecanismo de acción podría ser el resultado de la acción directa de HmuP en la expresión de *shmR* o una acción indirecta, por ejemplo evitando la acción del regulador negativo RirA. Los resultados obtenidos indican que HmuP no afectaría la expresión de otros genes involucrados en la respuesta a hierro, sugiriendo que su función es específicamente la activación de la expresión de *shmR*. Demostramos también que HmuP no es necesaria para el establecimiento de la simbiosis efectiva con plantas de alfalfa.

Mediante análisis *in silico* de la composición aminoacídica predicha de HmuP comprobamos que es una proteína pequeña (5,2 kDa) con un punto isoeléctrico de 9,98 con lo cual puede considerarse una proteína básica. Su estructura terciaria estaría compuesta por tres hebras β -antiparalelas y una pequeña hélice α (148). Esta estructura es inusual en reguladores transcripcionales bacterianos. Determinamos que la proteína HmuP presenta el dominio hemP (pfam10636) en los últimos 36 aminoácidos de su secuencia, los cuales se encuentran altamente conservados en Proteobacterias y que la ausencia del dominio GKLILNK completo como de la K terminal afectan la expresión de

shmR sugiriendo que son importantes para la función de la proteína HmuP. Comprobamos que en distintos genomas el gen que codifica para proteínas homólogas a HmuP co-localiza con genes implicados en la adquisición de hierro, sugiriendo un rol conservado de HmuP en el metabolismo de este metal.

Contribución personal al trabajo. En este trabajo fui responsable de gran parte de las actividades prácticas. Uriel Koziol realizó los análisis bioinformáticos, la identificación de los genes mutados mediante PCR arbitraria y la integración del plásmido pRG1SMc02726 en el genoma de *S. meliloti*. Federico Rosconi realizó parte de las construcciones plasmídicas. Participé activamente de la interpretación y discusión de los resultados, así como de la redacción del manuscrito.

Financiación. Este trabajo fue financiado por el National Institute of Health (NIH) y el Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA).

A new small regulatory protein, HmuP, modulates haemin acquisition in *Sinorhizobium meliloti*

Vanesa Amarelle,¹ Uriel Koziol,^{1,2} Federico Rosconi,¹ Francisco Noya,¹ Mark R. O'Brian³ and Elena Fabiano¹

Correspondence

Elena Fabiano
efabiano@iibce.edu.uy

¹Laboratorio de Bioquímica y Genómica Microbianas, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, MEC, Unidad Asociada a la Facultad de Ciencias, Av. Italia 3318, Montevideo 11600, Uruguay

²Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Iguá 4225, Montevideo 11400, Uruguay

³Department of Biochemistry, School of Medicine and Biomedical Sciences, State University of New York at Buffalo, Buffalo, NY 14214, USA

Sinorhizobium meliloti has multiple systems for iron acquisition, including the use of haem as an iron source. Haem internalization involves the ShmR haem outer membrane receptor and the *hmuTUV* locus, which participates in haem transport across the cytoplasmic membrane. Previous studies have demonstrated that expression of the *shmR* gene is negatively regulated by iron through RirA. Here, we identify *hmuP* in a genetic screen for mutants that displayed aberrant control of *shmR*. The normal induction of *shmR* in response to iron limitation was lost in the *hmuP* mutant, showing that this gene positively affects *shmR* expression. Moreover, the HmuP protein is not part of the haemin transporter system. Analysis of gene expression and siderophore production indicates that disruption of *hmuP* does not affect other genes related to the iron-restriction response. Our results strongly indicate that the main function of HmuP is the transcriptional regulation of *shmR*. Sequence alignment of HmuP homologues and comparison with the NMR structure of *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 HmuP protein revealed that certain amino acids localized within predicted β -sheets are well conserved. Our data indicate that at least one of the β -sheets is important for HmuP activity.

Received 28 December 2009

Revised 12 February 2010

Accepted 16 February 2010

INTRODUCTION

The alpha-proteobacterium *Sinorhizobium meliloti* has the ability to fix nitrogen in symbiotic association with certain legumes. It is also a free-living organism in the soil and rhizosphere, and adaptation to diverse ecological niches involves differential regulation of gene expression. Nitrogen-fixing bacteria have a high demand for iron during symbiosis, since nitrogenase and other iron-containing proteins are required for N₂ fixation (Georgiadis *et al.*, 1992; Hennecke, 1992; Rees & Howard, 2000; Sangwan & O'Brian, 1992). In soil, iron is mostly insoluble, and therefore scarce. Like other bacteria, *S. meliloti* possesses highly efficient iron-acquisition systems. These systems comprise the synthesis and transport of the

di-hydroxamate siderophore rhizobactin 1021, the use of the xenosiderophores ferrichrome and ferrioxamine B, and iron acquisition from different iron-porphyrin compounds such as haemin, haemoglobin and leghaemoglobin (Cuiv *et al.*, 2008; Lynch *et al.*, 2001; Noya *et al.*, 1997; Persmark *et al.*, 1993). The haem transport mechanism involves ShmR, an outer membrane haem receptor, and the HmuTUV transport system (Amarelle *et al.*, 2008; Cuiv *et al.*, 2008). *Yersinia enterocolitica* HemTUV was among the first ABC transporters involved in haem uptake to be characterized, and is considered as a prototype for haem transport (Stojiljkovic & Hantke, 1994). Its homologue in *Yersinia pestis* is called HmuTUV (Hornung *et al.*, 1996). According to the model of Hem/Hmu transport, once the haem moiety is translocated into the periplasm it is bound by a periplasmic binding protein, HmuT, which in turn presents it to the inner membrane permease-ATP hydrolase complex HmuU/HmuV. Intact haem is then delivered to the bacterial cytoplasm (Hornung *et al.*, 1996; Stojiljkovic & Hantke, 1994).

Genes that encode rhizobactin 1021 biosynthesis and transport are located in a regulon that comprises the biosynthesis operon *rhbABCDEF*; *rhtA*, encoding the

Abbreviations: EDDHA, ethylenediamine-di-*o*-hydroxyphenylacetic acid; qPCR, quantitative real-time PCR; 5'-RACE, rapid amplification of 5' complementary DNA ends.

A supplementary figure, showing an alignment of the last 36 amino acid residues (HemP domain) of some HmuP homologues from the alpha-, beta-, gamma-, delta- and epsilon-proteobacteria, and a supplementary table, showing primers used in the study, are available with the online version of this paper.

ferri-rhizobactin 1021 outer membrane receptor; *rhtX*, encoding a permease that belongs to a novel family of siderophore transporters; and *rhrA*, the AraC-like regulator of the receptor and biosynthetic genes (Cuiv *et al.*, 2004; Lynch *et al.*, 2001). Ferrichrome and ferrioxamine B transport systems consist of FhuA1 and FoxA, the respective outer membrane receptors; FhuP, a periplasmic binding protein for both siderophores; and the HmuUV complex, also involved in haem transport across the inner membrane (Cuiv *et al.*, 2008).

Studies of the control of bacterial iron homeostasis have focused largely on the ferric uptake regulator Fur. This protein senses the intracellular ferrous ion concentration, through the formation of a Fur-Fe²⁺ complex, which in turn interacts with specific DNA targets in the promoters of iron-repressed genes (Andrews *et al.*, 2003). Nonetheless, in *S. meliloti* and other alpha-proteobacteria, Fur homologues are manganese-responsive regulators (Chao *et al.*, 2004; Diaz-Mireles *et al.*, 2004; Hohle & O'Brian, 2009; Platero *et al.*, 2004). In the alpha-proteobacteria *S. meliloti*, *Rhizobium leguminosarum* and *Agrobacterium tumefaciens*, a different protein, RirA, which belongs to the Rrf2 superfamily of regulators, is responsible for the regulation of most genes involved in iron uptake (Chao *et al.*, 2005; Ngok-Ngam *et al.*, 2009; Todd *et al.*,

2002; Viguier *et al.*, 2005). In particular, under iron-replete conditions, RirA represses the expression of the rhizobactin biosynthesis and transport regulon, *shmR* gene expression and the *hmuPSTUV* locus.

With the aim of finding novel transcriptional regulators involved in *shmR* expression, we performed a generalized mutagenesis approach in *S. meliloti*. In this work, we discover that the small protein HmuP is essential for *shmR* expression in iron-depleted conditions.

METHODS

Bacteria, plasmids and growth conditions. Bacteria and plasmids used in this study are listed in Table 1. *Escherichia coli* strains were grown aerobically at 37 °C in Luria-Bertani (LB) medium. *S. meliloti* strains were grown at 30 °C either in tryptone-yeast extract (TY) medium (Beringer, 1974) or in defined minimal medium M9 (Sambrook *et al.*, 1989) supplemented with 6 mM glutamate, 200 µM methionine and 1 µM biotin. Low-iron conditions were obtained by supplementation with ethylenediamine-di-*o*-hydroxyphenylacetic acid (EDDHA). When required, 50 µg kanamycin ml⁻¹, 100 µg neomycin ml⁻¹, 100 µg streptomycin ml⁻¹, 10 µg gentamicin ml⁻¹, 50 µg ampicillin ml⁻¹ or 1 µg tetracycline ml⁻¹ was added to the media.

Tn5-1063a transposon mutagenesis and selection of transconjugants. Plasmid pRL1063a (Wolk *et al.*, 1991), containing the

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Reference or source
<i>S. meliloti</i> strains		
SM1021	Streptomycin derivative of SU47	Meade <i>et al.</i> (1982)
SHMR	SM1021 <i>shmR</i> :: <i>lacZ-Gm^r</i>	Amarelle <i>et al.</i> (2008)
B20	SHMR <i>hmuP</i> ::Tn5-1063a	This work
HMUP	SM1021 <i>hmuP</i> ::Tn5-1063a	This work
SM1021::pRG1SMc02726	SM1021 with pRG1SMc02726 construct integrated into genome	This work
HMUP::pRG1SMc02726	HMUP with pRG1SMc02726 construct integrated into genome	This work
<i>E. coli</i> strains		
DH5α	<i>supE44ΔlacU169(φ80lacZΔM15)hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan (1983)
S17-1	<i>pro hsdR recA</i> [RP4-2(T _c ::Mu)(K _m ::Tn7)] mobilization strain for biparental matings	Simon <i>et al.</i> (1983)
S17-1 λ <i>pir</i>	λ <i>pir</i> lysogen of S17-1	Simon <i>et al.</i> (1983)
Plasmids		
pBluescript SK	Cloning vector, Am ^R	Stratagene
pOT2	Promoter probe vector based on pBBR-1-MCS-5 replicon. Contains promoterless <i>gfpuv</i> and multiple cloning site (MCS) between two transcriptional terminators, Gm ^R	Allaway <i>et al.</i> (2001)
pGEM-T	Cloning vector for PCR products, Am ^R	Promega
pRK2013	ColE1 replicon with RK2 <i>tra</i> genes. Used for mobilizing <i>incP</i> and <i>incQ</i> plasmids, Km ^R	Ditta <i>et al.</i> (1980)
pRL1063a	Tn5 derivative; promoterless <i>luxAB</i> ; <i>oriV</i> Km ^R	Wolk <i>et al.</i> (1991)
pRG1SMc02726	pMK2030 with SMc02726 ORF inserted, Tet ^R	Humann <i>et al.</i> (2008)
pOT-HmuP	<i>hmuP</i> under its native promoter and fused to <i>gfpuv</i>	This work
pOT-HmuPΔCt	<i>hmuP</i> lacking the region encoding the C-terminal GKLILNK residues, under its native promoter and fused to <i>gfpuv</i>	This work
pOT-HmuPAK	<i>hmuP</i> lacking the codon encoding the C-terminal lysine residue, under its native promoter and fused to <i>gfpuv</i>	This work
pOT-HmuPY	<i>hmuP</i> with a codon encoding tyrosine inserted before the stop codon, under its native promoter and fused to <i>gfpuv</i>	This work
pOT-HmuP _{pr}	<i>hmuP</i> presumptive promoter region fused to <i>gfpuv</i>	This work

transposable element Tn5-1063a, was used to generate over 10 000 insertional mutants of *S. meliloti* strain SHMR (Amarelle *et al.*, 2008). The transposon was delivered to strain SHMR by triparental mating with *E. coli* DH5 α (pRL1063a) and *E. coli* DH5 α (pRK2013) (Ditta *et al.*, 1980) as donor and helper strains, respectively. Transconjugants were screened for changes in *shmR* expression using TY solid media supplemented with streptomycin, neomycin, 20 μ g X-Gal ml⁻¹ and either 37 μ M FeCl₃ or 50 μ M EDDHA. Differences in *shmR* expression were confirmed by measuring β -galactosidase activity, using *S. meliloti* strain SHMR as control. Cells were grown for 48 h in TY medium and diluted 100-fold in TY medium supplemented with either 37 μ M FeCl₃ or 100 μ M EDDHA. Cultures were grown to early stationary phase at 200 r.p.m. and 30 °C. The β -galactosidase assay was performed according to Miller (1972), with the modifications described by Poole *et al.* (1994).

Sequence analysis of *S. meliloti* SHMR Tn1063a-tagged locus and transposon transduction. To identify the location of the transposon insertion in the B20 mutant, genomic DNA was isolated using the UltraClean Microbial DNA kit (MoBio). Arbitrary PCR (Knobloch *et al.*, 2003) was used to amplify fragments containing transposon junctions using arbitrary primers ARB1-A or ARB2 (Griffitts & Long, 2008) and the transposon-specific primers Tn5-4 or Tn5-2 (Yurgel & Kahn, 2005). The DNA sequence was determined using the sequencing primer TZTn5 (Yurgel & Kahn, 2005) and the obtained nucleotide sequence was searched in the *S. meliloti* 1021 genome using the BLAST algorithm.

Lysates obtained from B20 mutant cells infected with the Φ M12 phage (Finan *et al.*, 1984) were used to transduce the *hmuP*::Tn5-1063a mutation to *S. meliloti* 1021, as described by Humann *et al.* (2009). Transductants were selected by three consecutive passages in LB medium supplemented with neomycin.

Integration of pRG1SMc02726 in the *S. meliloti* genome and β -glucuronidase activity assays. The pRG1SMc02726 (Humann *et al.*, 2008) construction was transferred to *S. meliloti* 1021 and HMUP (SM1021 *hmuP*::Tn5-1063a) strains by biparental conjugation with strain *E. coli* S17-1 λ *pir* (pRG1SMc02726), and transconjugants were selected in Min-succinate-NH₄ medium (Yurgel & Kahn, 2005) supplemented with tetracycline. Transconjugants with the plasmid integrated by homologous recombination were confirmed by colony PCR using primers *shmR*forward (Amarelle *et al.*, 2008) and 2030F (Humann *et al.*, 2008).

Differences in *shmR*::*gusA* expression were assessed by measuring β -glucuronidase activity. Cells were grown for 48 h in M9 minimal medium and diluted 100-fold in M9 medium supplemented with 300 μ M EDDHA. Cultures were grown to early stationary phase at 200 r.p.m. and 30 °C. β -Glucuronidase activity assays were performed as described by Jefferson *et al.* (1986), and β -glucuronidase arbitrary units were defined as 1000 A₄₁₅ units min⁻¹ ml⁻¹ (OD₆₂₀ unit)⁻¹ (Jefferson *et al.*, 1986).

Construction of plasmids containing the *hmuP* gene or the *hmuP* mutated versions, and *in vivo* complementation of the HMUP mutant strain. PCRs were carried out with Tli Polymerase (Promega) and *S. meliloti* 1021 genomic DNA as template. Primers used are listed in Supplementary Table S1. The *hmuP* gene and its presumptive promoter region were amplified using primers HSF and HSR. The resulting 1952 bp fragment was cloned in the *Sma*I site of pBluescript SK (Promega), generating plasmid pBSK-HmuPS. Plasmid pBSK-HmuPS was subsequently digested with *Xho*I, and the 620 bp fragment obtained was subcloned in the *Xho*I site of pBluescript SK to obtain the pBSK-HmuP plasmid. This plasmid was digested with *Pst*I, and a 650 bp fragment was cloned into the *Pst*I site of pOT2 (Allaway *et al.*, 2001), creating pOT-HmuP.

For the construction of pOT-HmuPY, pOT-HmuPAK and pOT-HmuPAcT, primer HPprF was used as a forward primer and HPY, HPK or HPcT as reverse primer, respectively. The amplicons were cloned into the *Eco*RV site of pBluescript SK, giving rise to plasmids pBSK-HmuPY, pBSK-HmuPAK and pBSK-HmuPAcT. The *Bam*HI-*Hind*III fragments obtained from these plasmids were subcloned in pOT2, creating plasmids pOT-HmuPY, pOT-HmuPAK and pOT-HmuPAcT. These constructions were confirmed by sequencing.

For the construction of the pOT-HmuP_{pr} plasmid (*hmuP* presumptive promoter region fused to *gfpuv*), a 464 bp fragment was amplified using the primers HPprF and HPprR. This amplicon was cloned into the *Eco*RV site of pBluescript SK, giving rise to plasmid pBSK-HmuP_{pr}. Finally, pBSK-HmuP_{pr} was digested with *Hind*III/*Xba*I and subcloned into pOT2, resulting in plasmid pOT-HmuP_{pr}.

Plasmids were introduced into *S. meliloti* strains by triparental mating as described above.

Bioassays and growth assays. Bioassay experiments were carried out as previously described (Noya *et al.*, 1997). Briefly, 10 μ l of the stock solutions to be tested were added to wells in solid TY medium (15 g agar l⁻¹) supplemented with 300 μ M EDDHA and containing about 10⁶ c.f.u. ml⁻¹. Stock solutions of the following compounds were used as iron sources: 37 mM FeCl₃, 0.15 mM haemoglobin, 1 mM haemin, 0.3 mM ferrichrome and 46 mM Desferal.

For colony size experiments, appropriate dilutions of mid-exponential cultures grown in TY media were made. Dilutions were spotted with a replica plater in TY solid media or TY solid medium supplemented with 300 μ M EDDHA and 10 μ M haemin. Cells were grown for 5 days at 30 °C and colony sizes were recorded.

RNA purification. Wild-type and *hmuP* mutant strains were grown in M9 minimal medium supplemented with 300 μ M EDDHA. At mid-exponential phase (OD₆₂₀ 0.8–1.0), 20 ml of culture was treated with 4 ml RNaprotect (Qiagen) and harvested at 7000 r.p.m. at 4 °C for 10 min. Pellets were frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C. Total RNA was isolated using a hot-phenol procedure, as described elsewhere (Yang *et al.*, 2006). RNA samples were treated with RQ1 RNase-free DNase I (Promega) and purified using the clean-up procedure of the RNeasy Bacterial RNA Purification kit (Qiagen).

Determination of the transcription start site and RT-PCR. The transcription start site of the *hmuP* gene was determined by rapid amplification of 5' complementary DNA ends (5'-RACE) using a kit from Invitrogen according to the manufacturer's instructions. We used total RNA purified from cells grown in iron-limited media. A 5'-RACE amplification product of 465 bp was obtained. Conventional cloning methods were used to clone the fragment in the pGEM-T vector (Promega). The plasmid was sequenced and the transcriptional start site was determined by comparison with the *S. meliloti* 1021 published genome using the BLAST algorithm.

Co-transcription of *hmuPST* was assessed by RT-PCR using the primer sets HmuPF/GSP1 and HmuSF/HmuTR shown in Supplementary Table S1. cDNA was synthesized using the iScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad) with total RNA obtained from iron-starved cells as a template. A negative control in which no reverse transcriptase was included in the reverse transcription reaction was used as a template in order to evaluate genomic DNA contamination.

Quantitative real-time PCR (qPCR). Expression of the *shmR*, *rhrA*, *rhbE*, *hmuS*, *hmuT* and *SMc01515* genes was assessed by qPCR. Reverse transcription was carried out with total RNA using the iScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad). For real-time PCR, 0.02 μ g cDNA and 0.25 μ M of each primer (IDT DNA Technologies) were used in a 20 μ l reaction, using the iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad).

Primers used are listed in Supplementary Table S1. PCRs were run on an iCycler thermal cycler (Bio-Rad) using a 3 min hot start at 95 °C, and then 40 cycles with steps of 95 °C for 30 s, 56 °C for 30 s and 72 °C for 30 s. The generation of specific PCR products was confirmed by melting curve analysis. *gapA* (*SMc03979*) was used as a housekeeping gene control. Samples in which the reverse transcriptase was omitted in reverse-transcriptase reactions were used as negative controls. For relative quantification, the standard curve method was used. *S. meliloti* 1021 genomic DNA was used as the PCR template for standard curves for each gene. Relative starting quantities of mRNAs for each gene were calculated from the corresponding standard curve and were normalized to *gapA*. Every reaction was done in triplicate.

Bioinformatics analysis. Using the *S. meliloti* 1021 HmuP protein as query, the translated nucleotide database of NCBI was searched (tblastn). An expect value of 100 was used. Results were selected based on the following criteria: similarity along the HemP domain (from residues 10 to 46 in *S. meliloti* 1021); absence of gaps larger than two amino acids in region 20–46 (where the β -sheets are localized); GKLLITK motif conserved in at least four to five residues; Y22 and T27 conserved.

Plant assays. *Medicago sativa* cv. Creola was used for screening the symbiotic phenotype of the *hmuP* mutant. The wild-type strain was used as a control. Plant assays were done in nitrogen-free Jensen medium, as previously described (Platero *et al.*, 2004). Nitrogen-fixation efficiencies were estimated by determining plant dry weights 60 days after planting.

RESULTS

Identification of *hmuP* in a genetic screen for mutants deregulated in *shmR* gene expression

We previously demonstrated the iron responsiveness of the *shmR* promoter using a chromosomal transcriptional fusion *shmR::lacZ* in the *S. meliloti* SHMR mutant strain (Amarelle *et al.*, 2008). Colonies of *S. meliloti* SHMR are white when they are grown in TY solid medium supplemented with X-Gal and FeCl₃, while the colonies are blue in TY supplemented with X-Gal and EDDHA, as a result of the repression or induction of *shmR::lacZ* expression, respectively. Here, we used this construction as a tool to search for mutants that show deregulation of iron-dependent *shmR* expression. *S. meliloti* SHMR was mutagenized with Tn5-1063a and transconjugants were screened for loss of metal regulation in TY solid medium supplemented with FeCl₃ or EDDHA. From over 10 000 transconjugants analysed, one mutant named B20 was selected for further analyses. Colonies of B20 were white in TY medium supplemented with EDDHA and X-Gal, and this mutant presented a reduced β -galactosidase activity in TY EDDHA broth when compared with the reporter strain, indicating a loss in *shmR::lacZ* expression (Fig. 1).

The DNA sequence of the transposon-flanking region in the B20 mutant was determined by arbitrary PCR. The PCR fragment was sequenced and the results obtained from BLAST searches in the *S. meliloti* 1021 genome indicated that the tagged locus was *SMc01747*. The deduced product of *SMc01747* is a small protein (5.3 kDa) that

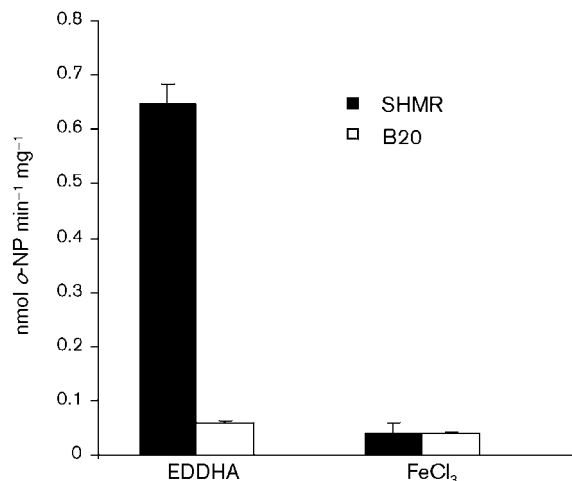


Fig. 1. β -Galactosidase activity in the SM1021 *shmR::lacZ* mutant (SHMR) and in its derivative mutant (B20). Cells were grown to early stationary phase in TY broth. One hundred-fold dilutions were made in TY supplemented with either 150 μ M EDDHA or 37 μ M FeCl₃ and grown for 48 h. β -Galactosidase activity is expressed as nmol *o*-nitrophenol min⁻¹ (mg protein)⁻¹. The data shown are the mean of two independent experiments done in triplicate. Error bars, 1 SD.

belongs to the HemP superfamily. An *hmuP/hemP* homologue has been shown to be involved in the utilization of haem as an iron source in *R. leguminosarum* (Wexler *et al.*, 2001), but the function of this protein is not known. Based on this homology, we designate *SMc01747* as *hmuP*. In the *S. meliloti* genome, *hmuP* is localized together with the *hmuS* gene and upstream of the *hmuTUV* cluster (Fig. 2). The function of the putative *hmuS* gene has not yet been described in *S. meliloti*. The *hmuTUV* cluster has recently been described as encoding an ABC transport system involved in haem, ferrichrome and ferrioxamine B transport in *S. meliloti* 2011 (Cuiv *et al.*, 2008).

The *hmuP* and *hmuS* genes are part of the *hmuPSTUV* transcriptional unit

The small intergenic space between the *hmuP* and *hmuS* genes suggested that both genes are part of the same transcriptional unit. On the other hand, a putative *rho*-independent transcriptional terminator downstream of the *hmuS* gene is indicated in the published *S. meliloti* 1021 genome, suggesting that *hmuPS* could be a transcriptional unit independent of the *hmuTUV* cluster. Here, we wanted to establish whether *hmuPSTUV* are independently transcribed. First, we performed a 5'-RACE, and we determined the transcription start site for *hmuP* as located 115 bp upstream of the initiation codon (Fig. 2). However, we were unable to determine the transcription start site for *hmuT*, suggesting that the *hmuT* gene could be cotranscribed together with the *hmuP* and *hmuS* genes. To assess this possibility, we employed an RT-PCR approach using

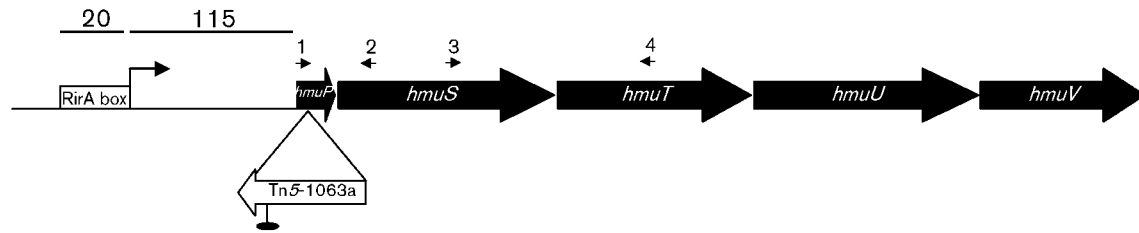


Fig. 2. Genetic organization of the *hmuP* gene in *S. meliloti* 1021. A black oval indicates a *rho*-independent transcriptional terminator. The Tn5-1063a insertion site and orientation are illustrated with a white arrow not to scale. The small numbered arrows indicate the positions of primers used for RT-PCR: HmuPF (1), GSP1 (2), HmuSF (3), HmuTR (4). The transcription start site of *hmuP* was determined by 5'-RACE. The bent arrow indicates the transcription start site and the numbers show the distance (bp) from it to the initiation codon (GTG) and to the putative RirA box.

different sets of primers. The locations of the primers used are shown in Fig. 2. The length of the products obtained indicates that the *hmuP* and *hmuS* genes as well as the *hmuS* and *hmuT* genes are transcribed in the same mRNA unit. No products could be detected when we used as a template a mock control in which no reverse transcriptase was included in the reverse transcription reaction (data not shown). The results obtained indicate that *hmuP*, *hmuS* and *hmuTUV* are part of the same transcriptional unit.

HmuP is essential for *shmR* expression and iron acquisition from haem compounds

Since the B20 mutant was obtained from a generalized mutagenesis in an *shmR* mutant context, the *hmuP*::Tn5-1063a mutation was transduced to the *S. meliloti* 1021 wild-type strain in order to obtain a mutant with a single transposon insertion in an *shmR*⁺ context. This mutant was named HMUP. To investigate *shmR* expression, we used the transcriptional gene fusion system reported by Humann *et al.* (2008) with the pRG1SMc02726 plasmid kindly provided by Michael L. Kahn, Washington State University, Pullman, WA, USA. With this approach, after integration of pRG1SMc02726 by homologous recombination, two functional copies of *shmR* are present; one is under the control of the native *shmR* promoter, which also drives the expression of the *gusA* and *gfp* reporter genes, and the other is expressed at a low and constitutive level from the tetracycline (*tet*) promoter located in pRG1SMc02726 (Fig. 3a). To evaluate the effect of *hmuP* disruption on *shmR* expression, this construction was integrated into *S. meliloti* 1021 wild-type and HMUP mutant strains.

As shown in Fig. 3(b), expression of the *shmR*::*gusA* reporter in iron-restricted media was drastically reduced in the HMUP::pRG1SMc02726 (pOT2) strain. In order to confirm that the lack of *shmR* expression was due to the lack of HmuP, we expressed *hmuP* *in trans*. Complementation of the HMUP::pRG1SMc02726 strain with the pOT-HmuP plasmid completely restored the expression of the *shmR*::*gusA* reporter. These results clearly demonstrate that HmuP is required for *shmR* gene expression.

Furthermore, the presence of multiple copies of *hmuP* in the SM1021::pRG1SMc02726 (pOT-HmuP) strain resulted in an 81% increase of *shmR*::*gusA* expression with respect to 1021::pRG1SMc02726 (pOT2) (Fig. 3b),

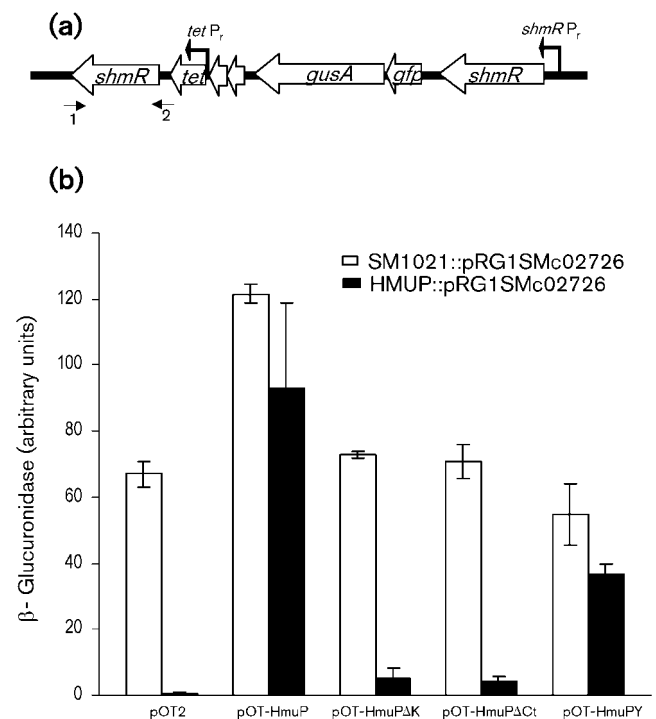


Fig. 3. *In vivo* effect of *hmuP* mutation on *shmR*::*gusA* activity. (a) The pRG1SMc02726 construction integrated into the SM1021 or HMUP genome. Small numbered arrows indicate the position of primers *shmR*forward (1) and 2030F (2). (b) Strains SM1021::pRG1SMc02726 and HMUP::pRG1SMc02726 containing the indicated pOT2 derivatives were grown until early stationary phase in M9 broth. One hundred-fold dilutions were made in M9 supplemented with 300 μ M EDDHA and grown for 48 h. β -Glucuronidase activity is expressed as β -glucuronidase arbitrary units. The data shown are the mean of two independent experiments done in triplicate. Error bars, 1 SD.

indicating that HmuP may act as a positive regulator of *shmR* gene expression.

We previously demonstrated that the *shmR* gene is necessary for iron acquisition from haem compounds (Amarelle *et al.*, 2008). Here, we wanted to evaluate whether *hmuP* disruption affects iron nutrition from haem and haem compounds. The *hmuP* mutant was unable to use either haem or haemoglobin as the sole iron source, but retained the ability to grow on FeCl_3 (Table 2, Fig. 4a). Complementation with the *hmuP* gene *in trans* completely restored the ability to use haem iron sources (Table 2, Fig. 4a), indicating that the observed phenotype was due to *hmuP* disruption. These results clearly demonstrate that HmuP is necessary for haem-mediated iron acquisition in *S. meliloti*.

Since *hmuP* is part of the *hmuPSTUV* transcriptional unit, the inability to use haemin as an iron source could be due in part to polar effects. By using qPCR we observed that mRNA levels for *hmuS* and *hmuT* were similar in the wild-type and the *hmuP* mutant strains, indicating that the transposon insertion had no detectable effect on the expression of downstream genes (Fig. 5). The absence of polar effects on downstream genes can be explained by the direction in which the transposon was inserted. In the HMUP mutant strain, the transcriptional terminator present in the Tn5-1063a construction is localized in the opposite strand of the *hmuP* transcriptional promoter, as illustrated in Fig. 2.

The observed impairment of the *hmuP* mutant strain in growth with haemin as sole iron source could be due to the loss not only of *shmR* expression but also of other HmuP-dependent factors involved in haemin utilization. To test this possibility we assessed the ability to use haemin as an

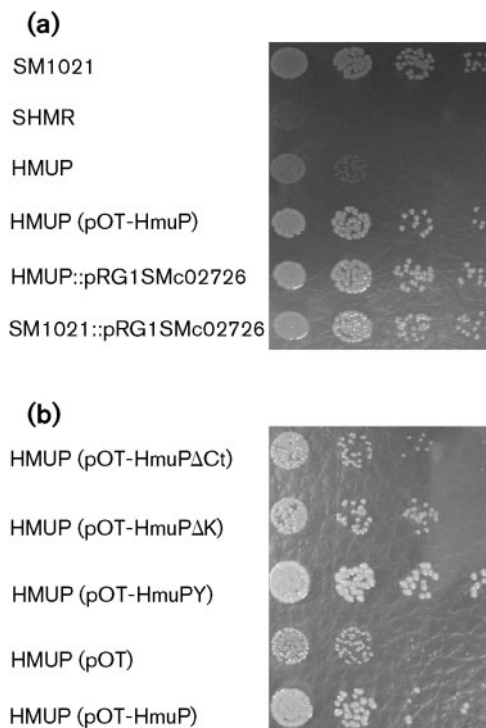


Fig. 4. Growth assays. Cells were grown in TY broth until early stationary phase. Appropriate dilutions were made in TY broth and then plated in TY solid media supplemented with 300 μM EDDHA and 10 μM haemin. Dilutions were also spotted in TY media, and all the strains displayed a similar growth pattern (data not shown). Cells were grown for 5 days and colony sizes were determined. The experiments were done in triplicate with similar results. (a) Effect of HmuP on the ability of *S. meliloti* 1021 to use haemin as an iron source. (b) Effect of *hmuP* mutations on HmuP activity.

Table 2. Assessment of the ability of *S. meliloti* strains to use different compounds as sole iron sources

Stock solutions were added to wells in TY medium supplemented with 300 μM EDDHA, containing about 10^6 c.f.u. ml^{-1} .

<i>S. meliloti</i> strain	Bacterial growth around wells containing different iron sources [mean diameter ± SD (cm)]*			
	370 nmol FeCl_3	5 nmol Hb†	20 nmol Hm†	456 nmol Desferal
SM1021	0.55 ± 0.05	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1	2 ± 0.2
SHMR	0.5 ± 0.1	0	0	ND‡
HMUP	0.5 ± 0.1	0	0	2.2 ± 0.1
HMUP (pOT-HmuP)	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1	2 ± 0.1
HMUP (pOT-HmuPΔCt)	0.55 ± 0.05	0	0	2 ± 0.2
HMUP (pOT-HmuPΔK)	0.8 ± 0.2	0.75 ± 0.1§	0.8 ± 0.1§	2 ± 0.1
HMUP (pOT-HmuPY)	0.45 ± 0.05	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.9 ± 0.1
SM1021::pRGSMc02726	0.45 ± 0.05	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	ND
HMUP::pRGSMc02726	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.75 ± 0.05	ND

*Results are the mean ± SD of three independent experiments.

†Hb, haemoglobin; Hm, haemin.

‡ND, Not determined.

§Haloes were fainter than the rest.

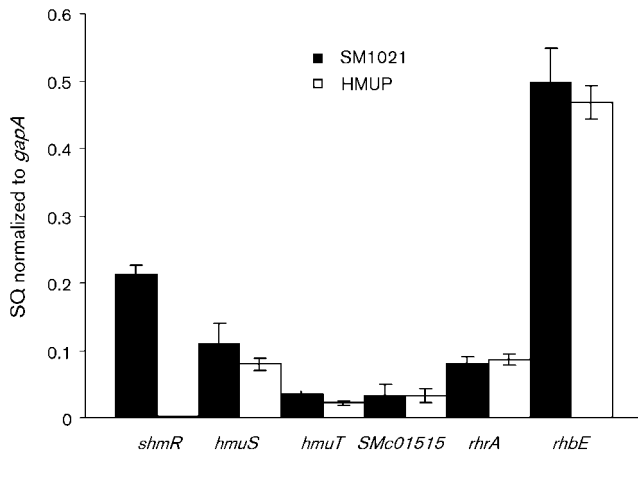


Fig. 5. Effect of HmuP on the expression of iron-regulated genes. mRNAs from wild-type (black bars) and *hmuP* mutant (white bars) cells grown in M9 minimal media supplemented with 300 μ M EDDHA were analysed by qPCR. The genes assessed are indicated below the bars. The data are expressed as the relative starting quantity (SQ) of mRNA normalized to the housekeeping gene *gapA*. The data are expressed as the mean of three replicates; error bars, 1 SD.

iron source of strain HMUP::pRG1SMc02726, which expresses the *shmR* gene at a low constitutive level from the *tet* promoter (Table 2, Fig. 4a). The results obtained demonstrate that constitutive expression of *shmR* completely restores the ability to use iron from haemin in an *hmuP* mutant context, indicating that no other defects in haemin transport and utilization exist in the *hmuP* mutant except the lack of ShmR.

HmuP is not required for the global response to iron limitation

In order to evaluate a possible effect of the *hmuP* mutation on other genes involved in iron uptake and metabolism, we compared by qPCR the expression of *shmR*, *rhrA*, *rhbE* and *SMc01515* genes in the wild-type and HMUP mutant strains grown in iron-restricted media. The *gapA* housekeeping gene was used as control. As shown in Fig. 5, expression of the *rhrA* and *rhbE* genes was not modified by the *hmuP* disruption. Siderophore quantification assays reinforced these results, as the siderophore production in iron-restricted media was similar in the wild-type and the *hmuP* mutant strain (data not shown). These observations suggest that HmuP is not involved in this iron-restriction response.

The expression of *SMc01515*, a putative gene encoding a TonB homologue, was similar in the wild-type and mutant strains (Fig. 5). *SMc01515* is adjacent to and transcribed in the opposite direction from *hmuP*. These results indicate that HmuP is not involved in *SMc01515* expression.

The *hmuTUV* gene cluster has recently been described as the ABC transport system involved in the utilization not only of haem but also of ferrichrome and ferrioxamine B in *S. meliloti* 2011 (Cuiv *et al.*, 2008). The utilization of Desferal for iron nutrition was not affected in the *hmuP* mutant strain (Table 2). Similar results were obtained when ferrichrome was included as the sole iron source (data not shown). These results indicate that the transposon insertion does not affect xenosiderophore internalization and corroborate our previous data showing that the *hmuP* mutation has no polar effect on *hmuUV* expression.

Wild-type and HMUP strains containing the pOT-HmuP_{pr} plasmid (*hmuP* presumptive promoter region fused to *gfpuv*) showed no GFP fluorescence difference when bacteria were grown in low-iron conditions (data not shown). This result agrees with our previous findings which show that the *hmuS* and *hmuT* genes, which are co-transcribed with *hmuP*, are expressed in the *hmuP* mutant (Fig. 5). These data demonstrate that HmuP is not involved in its own transcriptional regulation.

In sum, these results suggest that HmuP is not required for the global response to iron limitation.

HmuP is well conserved among proteobacteria

Using the BLAST algorithm with the deduced amino acid sequence of *S. meliloti* 1021 HmuP as a query, HmuP homologues were found mainly in the alpha-, beta- and gamma-proteobacteria, although some examples were also found in the delta- and epsilon-proteobacteria. As expected, HmuP from *S. meliloti* is more similar to other HmuP homologues from the alpha-proteobacteria, mainly among the Rhizobiales, having 81% identity with *R. leguminosarum* bv. *viciae* strain 3841, 66% with *Mesorhizobium loti* MAFF303099 and 44% with *Rhodopseudomonas palustris* CGA009. The alignment of the last 36 amino acid residues of the C terminus indicates a high conservation in this region (Supplementary Fig. S1). The presence of a KLILXK motif at the end of the region is highly conserved. The structure of the HmuP homologue in *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 has been determined by NMR (PDB ID: 2jra), showing that this protein is a dimer with four β -sheets and one small α -helix per monomer. According to the SWISS-MODEL SIB Service (Arnold *et al.*, 2006; Guex & Peitsch, 1997; Schwede *et al.*, 2003), the *S. meliloti* HmuP protein is structured in three β -sheets and one small α -helix. The C-terminal β -sheet has a well-conserved KLILXK motif, suggesting that this region is important for protein function (Supplementary Fig. S1).

The analysis of the genomic context of the *hmuP* homologues using GenCont (Hinrichs *et al.*, 2006) revealed that the *hmuP* gene is usually located near other genes related to iron or haem uptake and metabolism. Usually, it is located adjacent to *hmuTUV* in the alpha-proteobacteria, and also to *hmuS*, *tonB*, *exbB/exbD*, haem outer membrane receptors and bacterioferritin (data not shown). This

localization suggests that HmuP has a conserved role in haem and/or iron metabolism.

The C-terminal motif is essential for HmuP function

The high conservation of the KLILXK C-terminal motif in HmuP proteins suggests that it is important for HmuP function. To investigate this hypothesis, we mutagenized this motif by site-directed mutagenesis, and the mutated *hmuP* gene was used to complement the HMUP mutant *in trans*. When the *S. meliloti* HmuP GKLILNK motif or the C-terminal lysine was deleted (in pOT-HmuPΔCt and pOT-HmuPΔK, respectively), no significant *shmR::gusA* expression was observed (Fig. 3b). Furthermore, when an extra tyrosine was present at the C terminus (pOT-HmuPY), a partial complementation was obtained (Fig. 3b). These results show that the integrity of the C-terminal GKLILNK motif of HmuP is essential for transcriptional activation of the *shmR* gene. It is worth mentioning that the presence of mutagenized versions of *hmuP* *in trans* in the wild-type context did not affect expression of *shmR::gusA*, which means that these mutations are recessive with respect to the wild-type allele (Fig. 3b).

Subsequently, we evaluated by bioassays and growth assays the ability of the different mutagenized versions of HmuP to complement the *hmuP* mutant strain phenotype. The results obtained showed that the presence of pOT-HmuPY *in trans* was able to fully complement the *hmuP* mutant phenotype, restoring the ability to use haemin as iron source. The presence of pOT-HmuPΔK showed only a minor effect, while the presence of pOT-HmuPΔCt was unable to restore the use of haem-iron sources (Table 2, Fig. 4b). These observations were corroborated by using the toxic haemin analogue gallium protoporphyrin-IX (Ga-PPIX). Ga-PPIX was highly toxic for HMUP (pOT-HmuP) and for HMUP (pOT-HmuPY), but non-toxic for HMUP (pOT-HmuPΔCt). Toxicity was moderate for HMUP (pOT-HmuPΔK) (data not shown). A plausible explanation for the results obtained for the HMUP (pOT-HmuPΔK) strain could be that the small activation of *shmR* gene expression produced by the HmuP mutated protein results in a small but active haemin transport, although the expression is not enough to produce a detectable level of β -glucuronidase activity.

Altogether, these results support the conclusion that the GKLILNK C-terminal motif is required for HmuP-dependent expression of the haem receptor.

HmuP is not essential for nitrogen fixation

The *hmuP* mutant strain was able to develop nitrogen-fixing nodules in *Medicago sativa* cv. Creola plants, indicating that HmuP is not essential for symbiosis or nitrogen fixation in alfalfa under the conditions assayed (data not shown). These results agree with previously

reported data which show that the *shmR* gene is not necessary for nitrogen fixation (Amarelle *et al.*, 2008).

DISCUSSION

In this work, *hmuP* was found to be essential for transcriptional expression of the haemin receptor gene *shmR* in *S. meliloti* 1021. We found that an *S. meliloti hmuP* mutant was unable to express *shmR* by using transcriptional fusion analyses and qPCR (Figs 3 and 5). Not only does disruption of *hmuP* prevent transcriptional activation of *shmR* under iron-limited conditions, but multiple copies of *hmuP* result in increased transcriptional activation. In addition, we found that *shmR* expression was recovered by the presence of *hmuP* *in trans* (Fig. 3). These results were corroborated by growth analysis that showed that the *hmuP* mutant was unable to use haem and haem compounds as iron sources and that this phenotype was recovered by the presence of HmuP (Fig. 4, Table 2). Altogether, these results demonstrate that HmuP works under iron limitation to activate transcription of *shmR*. It has been demonstrated that the *shmR* gene is negatively regulated by iron via RirA (Chao *et al.*, 2005; Viguier *et al.*, 2005). RirA is the major iron-responsive regulator in *S. meliloti*, and the RirA regulon comprises numerous genes involved in iron transport. In particular, besides the *shmR* gene, different genes involved in rhizobactin synthesis and transport are also repressed by RirA when cells are grown in iron-sufficient conditions (Chao *et al.*, 2005; Viguier *et al.*, 2005). Interestingly, the rhizobactin synthesis and transport system responds to a second level of regulation, requiring the presence of the RhrA transcriptional activator under iron-limiting conditions. It has been established that RhrA belongs to the AraC-like family of transcriptional activators, although the induction signal and the mechanism of action of RhrA are still unknown (Lynch *et al.*, 2001). In addition, it seems to be a general rule that xenosiderophore receptors require different types of positive regulators for their expression. These results, together with our observations, suggest that the expression of genes involved in high-affinity iron transport requires not only the relief of RirA iron repression but also the positive action of a transcriptional regulator.

Furthermore, analysis of gene expression and siderophore production indicates that disruption of *hmuP* does not affect other genes related to the iron-restriction response (Fig. 5, Table 2). It is possible, however, that another role for *hmuP* exists but is masked by redundancy with other components. The fact that constitutive expression of *shmR* restores the ability to use haemin of an *hmuP* mutant indicates that it is not required for transcriptional activation of other haemin-related genes, and that it has no direct role as an effector in haemin-transport mechanisms. Our results strongly indicate that the main function of HmuP in *S. meliloti* 1021 is the regulation of *shmR* transcription.

In numerous bacterial genomes, *hmuP* homologues are located next to genes which are predicted to be involved in haemin transport, e.g. in *Y. pestis* the *hmuP* homologue is present in the *hmuPRSTUV* gene cluster, while in *Ralstonia solanacearum* it is in the *tonBexbB1exbD1hemP* genetic organization. Co-localization of *hmuP* with genes related to the iron-restriction response, together with the results obtained in this work, suggests that HmuP has a conserved role in haem and/or iron metabolism in bacteria.

Sequence alignment of HmuP homologues, as well as comparison with the NMR solution structure of the *Rhodospseudomonas palustris* CGA009 HmuP protein, revealed that certain amino acids localized within the predicted β -sheets are well conserved. Moreover, the C-terminal β -sheet presents a KLILXK motif highly conserved among the C termini of the HmuP homologues (Supplementary Fig. S1). Here, we demonstrate that the deletion of the conserved GKLILNK motif produces a non-functional HmuP protein, indicating that this motif is important for HmuP activity.

It is not possible from the data obtained here to conclude that HmuP functions as a direct positive transcriptional regulator, or whether it is an indirect regulator. The wide distribution of HmuP homologues among bacteria makes this regulator an interesting subject for further studies.

ACKNOWLEDGEMENTS

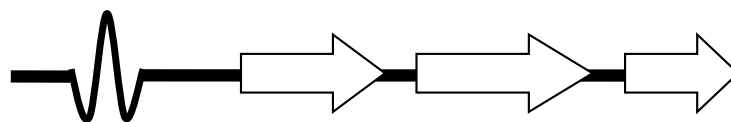
This research was supported by a grant from the NIH Fogarty International Research Collaboration, award R03 TW007353, to M.R.O'B., with E.F. as the foreign collaborator; by NIH grant GM067966 to M.R.O'B.; and by a grant from Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) and Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), Uruguay, to E.F. and F.N.

REFERENCES

- Allaway, D., Schofield, N. A., Leonard, M. E., Gilardoni, L., Finan, T. M. & Poole, P. S. (2001). Use of differential fluorescence induction and optical trapping to isolate environmentally induced genes. *Environ Microbiol* **3**, 397–406.
- Amarelle, V., O'Brian, M. R. & Fabiano, E. (2008). ShhR is essential for utilization of heme as a nutritional iron source in *Sinorhizobium meliloti*. *Appl Environ Microbiol* **74**, 6473–6475.
- Andrews, S. C., Robinson, A. K. & Rodriguez-Quinones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 215–237.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J. & Schwede, T. (2006). The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**, 195–201.
- Beringer, J. E. (1974). R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* **84**, 188–198.
- Chao, T. C., Becker, A., Buhrmester, J., Puhler, A. & Weidner, S. (2004). The *Sinorhizobium meliloti fur* gene regulates, with dependence on Mn(II), transcription of the *sitABCD* operon, encoding a metal-type transporter. *J Bacteriol* **186**, 3609–3620.
- Chao, T. C., Buhrmester, J., Hansmeier, N., Puhler, A. & Weidner, S. (2005). Role of the regulatory gene *rirA* in the transcriptional response of *Sinorhizobium meliloti* to iron limitation. *Appl Environ Microbiol* **71**, 5969–5982.
- Cuiv, P. O., Clarke, P., Lynch, D. & O'Connell, M. (2004). Identification of *rhtX* and *fptX*, novel genes encoding proteins that show homology and function in the utilization of the siderophores rhizobactin 1021 by *Sinorhizobium meliloti* and pyochelin by *Pseudomonas aeruginosa*, respectively. *J Bacteriol* **186**, 2996–3005.
- Cuiv, P. O., Keogh, D., Clarke, P. & O'Connell, M. (2008). The *hmuUV* genes of *Sinorhizobium meliloti* 2011 encode the permease and ATPase components of an ABC transport system for the utilization of both haem and the hydroxamate siderophores, ferrichrome and ferrioxamine B. *Mol Microbiol* **70**, 1261–1273.
- Diaz-Mireles, E., Wexler, M., Sawers, G., Bellini, D., Todd, J. D. & Johnston, A. W. (2004). The Fur-like protein Mur of *Rhizobium leguminosarum* is a Mn²⁺-responsive transcriptional regulator. *Microbiology* **150**, 1447–1456.
- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. & Helinski, D. R. (1980). Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 7347–7351.
- Finan, T. M., Hartweig, E., LeMieux, K., Bergman, K., Walker, G. C. & Signer, E. R. (1984). General transduction in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **159**, 120–124.
- Georgiadis, M. M., Komiya, H., Chakrabarti, P., Woo, D., Kornuc, J. J. & Rees, D. C. (1992). Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. *Science* **257**, 1653–1659.
- Griffitts, J. S. & Long, S. R. (2008). A symbiotic mutant of *Sinorhizobium meliloti* reveals a novel genetic pathway involving succinoglycan biosynthetic functions. *Mol Microbiol* **67**, 1292–1306.
- Guex, N. & Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**, 2714–2723.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557–580.
- Hennecke, H. (1992). *The Role of Respiration in Symbiotic Nitrogen Fixation*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Hinrichs, D., Wetten, M. & Meuwissen, T. H. (2006). An algorithm to compute optimal genetic contributions in selection programs with large numbers of candidates. *J Anim Sci* **84**, 3212–3218.
- Hohle, T. H. & O'Brian, M. R. (2009). The *mntH* gene encodes the major Mn²⁺ transporter in *Bradyrhizobium japonicum* and is regulated by manganese via the Fur protein. *Mol Microbiol* **72**, 399–409.
- Hornung, J. M., Jones, H. A. & Perry, R. D. (1996). The *hmu* locus of *Yersinia pestis* is essential for utilization of free haemin and haem – protein complexes as iron sources. *Mol Microbiol* **20**, 725–739.
- Humann, J. L., Schroeder, B. K., Mortimer, M. W., House, B. L., Yurgel, S. N., Maloney, S. C., Ward, K. L., Fallquist, H. M., Ziemkiewicz, H. T. & Kahn, M. L. (2008). Construction and expression of sugar kinase transcriptional gene fusions by using the *Sinorhizobium meliloti* ORFeome. *Appl Environ Microbiol* **74**, 6756–6765.
- Humann, J. L., Ziemkiewicz, H. T., Yurgel, S. N. & Kahn, M. L. (2009). Regulatory and DNA repair genes contribute to the desiccation resistance of *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. *Appl Environ Microbiol* **75**, 446–453.
- Jefferson, R. A., Burgess, S. M. & Hirsh, D. (1986). Beta-glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 8447–8451.
- Knobloch, J. K., Nedelmann, M., Kiel, K., Bartscht, K., Horstkotte, M. A., Dobinsky, S., Rohde, H. & Mack, D. (2003). Establishment of an

- arbitrary PCR for rapid identification of Tn917 insertion sites in *Staphylococcus epidermidis*: characterization of biofilm-negative and nonmucoid mutants. *Appl Environ Microbiol* **69**, 5812–5818.
- Lynch, D., O'Brien, J., Welch, T., Clarke, P., Cuiv, P. O., Crosa, J. H. & O'Connell, M. (2001). Genetic organization of the region encoding regulation, biosynthesis, and transport of rhizobactin 1021, a siderophore produced by *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **183**, 2576–2585.
- Meade, H. M., Long, S. R., Ruvkun, G. B., Brown, S. E. & Ausubel, F. M. (1982). Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J Bacteriol* **149**, 114–122.
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Ngok-Ngam, P., Ruangkiattikul, N., Mahavihakanont, A., Virgem, S. S., Sukchawalit, R. & Mongkolsuk, S. (2009). Roles of *Agrobacterium tumefaciens* RirA in iron regulation, oxidative stress response, and virulence. *J Bacteriol* **191**, 2083–2090.
- Noya, F., Arias, A. & Fabiano, E. (1997). Heme compounds as iron sources for nonpathogenic *Rhizobium* bacteria. *J Bacteriol* **179**, 3076–3078.
- Persmark, M., Pittman, P., Buyer, J. S., Schwyn, B., Gill, P. R., Jr & Neilands, J. B. (1993). Isolation and structure of rhizobactin 1021, a siderophore from the alfalfa symbiont *Rhizobium meliloti* 1021. *J Am Chem Soc* **115**, 3950–3956.
- Platero, R., Peixoto, L., O'Brian, M. R. & Fabiano, E. (2004). Fur is involved in manganese-dependent regulation of *mntA* (*sitA*) expression in *Sinorhizobium meliloti*. *Appl Environ Microbiol* **70**, 4349–4355.
- Poole, P. S., Blyth, A., Reid, C. J. & Walters, K. (1994). *myo*-Inositol catabolism and catabolite regulation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Microbiology* **140**, 2787–2795.
- Rees, D. C. & Howard, J. B. (2000). Nitrogenase: standing at the crossroads. *Curr Opin Chem Biol* **4**, 559–566.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sangwan, I. & O'Brian, M. R. (1992). Characterization of delta-aminolevulinic acid formation in soybean root nodules. *Plant Physiol* **98**, 1074–1079.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N. & Peitsch, M. C. (2003). SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* **31**, 3381–3385.
- Simon, R., Priefer, U. & Pühler, A. (1983). *Vector Plasmids for In-Vivo and In-Vitro Manipulations of Gram-Negative Bacteria*. Edited by A. Pühler. Berlin: Springer.
- Stojilkovic, I. & Hantke, K. (1994). Transport of haemin across the cytoplasmic membrane through a haemin-specific periplasmic binding-protein-dependent transport system in *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **13**, 719–732.
- Todd, J. D., Wexler, M., Sawers, G., Yeoman, K. H., Poole, P. S. & Johnston, A. W. (2002). RirA, an iron-responsive regulator in the symbiotic bacterium *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology* **148**, 4059–4071.
- Viguier, C., Cuiv, P. Ó., Clarke, P. & O'Connell, M. (2005). RirA is the iron response regulator of the rhizobactin 1021 biosynthesis and transport genes in *Sinorhizobium meliloti* 2011. *FEMS Microbiol Lett* **246**, 235–242.
- Wexler, M., Yeoman, K. H., Stevens, J. B., de Luca, N. G., Sawers, G. & Johnston, A. W. (2001). The *Rhizobium leguminosarum tonB* gene is required for the uptake of siderophore and haem as sources of iron. *Mol Microbiol* **41**, 801–816.
- Wolk, C. P., Cai, Y. & Panoff, J. M. (1991). Use of a transposon with luciferase as a reporter to identify environmentally responsive genes in a cyanobacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5355–5359.
- Yang, J., Sangwan, I., Lindemann, A., Hauser, F., Hennecke, H., Fischer, H. M. & O'Brian, M. R. (2006). *Bradyrhizobium japonicum* senses iron through the status of haem to regulate iron homeostasis and metabolism. *Mol Microbiol* **60**, 427–437.
- Yurgel, S. N. & Kahn, M. L. (2005). *Sinorhizobium meliloti dctA* mutants with partial ability to transport dicarboxylic acids. *J Bacteriol* **187**, 1161–1172.

Edited by: R. J. Maier



α	Sinmel	: VESHDTFR-GHNEILLISHDGAIYRMKITRQGKLLILNK
	Sinmed	: VESRDIFR-GQSEILLISHDGAIYRMKITRQGKLLILNK
	Rhileg	: VESADIFR-GTNEIMIRHDGLVYRDKITRQGKLLILNK
	Meslot	: LSSNTIFQ-GEHEIGIEHHGALYRDKITRQGKLLILNK
	Rhopal	: IDSREIFT-VDREIVIAHGDDRYRRLTSQNKLLILTK
	Rhobac	: YSAQDTTK-GADQAQIVLGDQTYTRITRAGKLLILTK
β	Niteur	: ISSENIFG-TGKEVLIQHRGEOYHRLTRNDKLLILTK
	Ralsol	: MTSEQIFG-GQNAVAIRHNGALYTRVTRFGKLLILTK
	Raleut	: VALDAIMR-GASTLPILHNGDVYTRVTRYGKLLILTK
	Burcen	: VNSDTILQ-GQSHISIAHNGETYQLRATRLGKLLILTK
	Lepcho	: VRSEDLR-GAQELLIDHQGACYRRLTAQGRLLILTK
	Decaro	: IDSGKILQ-GASAVEIEHAGQRYLIRVTRENKLLILTK
	Thiden	: VEADAFR-GHHEIVISHNCAHYRRLITKNGKLLILTK
	Chrvio	: LHSRQIFD-GGREVRIEHQGEIYRQLTRNGKLLILIK
	LimMED105	: LNTKNIFPVGSRERTIVHDNTEYRRLITAQGKLLILTK
	AzoBH72	: ISSAQILA-GRPCVTIDHQGVNYVIRATRAGKLLILTK
	γ	Esccol
Yerfre		: VNSEQILR-GHGVAFTIVHQGEQYQLRQTKAGKLLILTK
Acibau		: LHSNNIFA-LGREIRIMHAGEEYRRLTRNNRLLILTK
Halhal		: IDSATIFN-GGQRVLIHHRGEDYQLRATRQGKLLILTK
δ	Geomet	: ITAAEIMD-GEIEIITIVHAGEQYRRLITANNKLLILTK
ϵ	Sulden	: IDSKEIFK-GEKIVRIIHANQVYTRITCENKLLILTK

Fig. S1. Alignment of the last 36 aminoacidic residues (HemP domain) of some HmuP homologs from the alpha, beta, gamma, delta and epsilon Proteobacteria. Sequences were obtained by tblastn or blastp using the aminoacidic sequence of *S. meliloti* HmuP as query, and aligned with ClustalX (Thompson et al. 1997). Aminoacidic residues that are 100% conserved are shadowed in black and those conserved between 75 % and 100 % are shadowed in grey. The secondary structure (α helix and β -strands) in the NMR

solution structure of HmuP from *R. palustris* CGA009 (PDB accession code 2JRA) is indicated above. Species were abbreviated as follows (GenBank accession codes are indicated in parenthesis): Sinmel: *S. meliloti* 1021 (NP_386533.1); Sinmed: *Sinorhizobium medicae* WSM419 (YP_001328004.1); Rhileg: *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 (YP_769274.1); Meslot: *Mesorhizobium loti* MAFF303099 (NP_102806.1); Rhopal: *R. palustris* CGA009 (YP_782068.1); Rhobac: *Rhodobacteriales bacterium* HTCC2083 (EDZ44340.1); Niteur: *Nitrosomonas europaea* ATCC19718 (NP_841581.1); Ralsol: *Ralstonia solanacearum* GMI1000 (NP_520087.1); AzoBH72: *Azoarcus* sp. BH72 (YP_932122.1); Raleut: *Ralstonia eutropha* H16 (YP_726990.1); Burcen: *Burkholderia cenocepaea* PC184 (YP_002093712.1); Lepcho: *Leptothrix cholodnii* SP-6 (YP_001790600.1); Decaro: *Dechloromonas aromatica* RCB (YP_284343.1); Thiden: *Thiobacillus denitrificans* ATCC 25259 (YP_314483.1); Chrvio: *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 (NP_903565.1); LimMED105: *Limnobacter* sp. MED105 (ZP_01915876.1); Esccol: *E. coli* str. K-21 substr. MG1655 (NP_416220.1); Yerfre: *Yersinia frederiksenii* ATCC 33641 (ZP_00828888.1); Acibau: *Acinetobacter baumannii* ACICU (YP_001847144.1); Halhal: *Halorhodospira halophila* SL1 (YP_001001982.1); Geomet: *Geobacter metallireducens* GS-15 (gene not annotated); Sulden: *Sulfurimonas denitrificans* DSM 1251 (gene not annotated).

CAPÍTULO IV: La regulación ejercida por la proteína HmuP depende de la presencia de motivos conservados ubicados en la región 5'UTR del gen *shmR*

RESUMEN

En el Capítulo II demostramos que ShmR es el receptor de membrana externa involucrado en la adquisición de hemo y posteriormente en el Capítulo III determinamos que la expresión del gen *shmR*, además de estar sujeta a represión por RirA, depende de la activación mediada por la proteína HmuP. En este Capítulo nos propusimos evaluar el mecanismo de acción de la proteína HmuP. Mediante una aproximación *in silico* identificamos motivos conservados en la región promotora del gen *shmR*, los cuales se correlacionan en distintos genomas con la presencia de la proteína HmuP. Identificamos los sitios de inicio de la transcripción de *shmR* y comprobamos que los motivos encontrados se ubican en la región 5'UTR. Determinamos la importancia de estos motivos en la activación de la expresión de *shmR* mediante la modificación de nucleótidos puntuales y comprobamos *in vitro* e *in vivo* la capacidad de HmuP de unirse a secuencias de ADN que contengan estos motivos.

INTRODUCCIÓN

En α -Proteobacterias la regulación de la homeostasis de hierro es llevada a cabo principalmente por las proteínas Irr, RirA o ambas, mientras que la función del homólogo de la proteína Fur estaría circunscripta al mantenimiento de la homeostasis de manganeso (93–95, 105, 146, 147). En *S. meliloti*, RirA es el regulador central en respuesta a hierro, participando directa o indirectamente de la regulación de aproximadamente 200 genes (146). Dentro de los genes reprimidos en condiciones de disponibilidad de hierro de forma dependiente de RirA, se encuentran varios genes implicados en el transporte de hierro de alta afinidad. Uno de los sistemas sujetos a esta regulación es el mediado por el sideróforo endógeno rizobactina 1021. En este sistema,

la proteína RirA reprime tanto la síntesis como la adquisición del sideróforo, y además regula también la expresión de la proteína RhrA, un activador específico del sistema (146, 147). RhrA es un regulador transcripcional perteneciente a la familia AraC, siendo el mecanismo de acción de RhrA aún desconocido (133).

Interesantemente, reguladores de tipo AraC han sido reportados en otros microorganismos también como activadores de sistemas de alta afinidad por hierro (149–158). Ejemplo de reguladores de este tipo son la proteína PchR de *Pseudomonas aeruginosa* (155), YbtA de *Yersinia pestis* (152), AlcR y BfeR de *Bordetella* spp. (149, 159), DhbR de *Brucella abortus* (156), Btr de *B. subtilis* (158) y MpeR de *Neisseria gonorrhoeae* (157), todos ellos involucrados en la activación de los sistemas de adquisición de hierro mediado por sideróforos. Interesantemente estas proteínas activadoras requieren la presencia del sustrato a ser internalizado por el transportador que regulan, en este caso de los sideróforos, como señal para la activación de la expresión del sistema de transporte. Por otro lado, tanto las proteínas activadoras como los sistemas de transporte son reprimidos en presencia de hierro en forma dependiente de Fur (en los casos que éste sea el regulador global de la respuesta a hierro) o por RirA en *Brucella* (156, 159–161). Para los activadores Btr, DhbR y MpeR se determinó *in vitro* su capacidad de unirse a la región promotora del transportador sugiriendo un mecanismo de activación directo (156–158).

También se ha comprobado la activación de la expresión de sistemas de alta afinidad por hierro de forma dependiente de factores σ extracitoplasmáticos (ECF) (62, 141, 162–164). Esta activación implica, además de la participación del factor σ , la participación de una proteína anti- σ y de un receptor transductor de una señal externa. Un ejemplo de regulación de este tipo es el sistema de transporte de citrato férrico de *E. coli*, mediado por el receptor FecA. En condiciones de baja disponibilidad de hierro y en presencia de citrato férrico, FecA transduce una señal que es reconocida a nivel del periplasma por el factor anti- σ FecR y como consecuencia libera el ECF FecI, el cual activa la expresión del transportador *fecABCDE* [Revisado por Braun *et. al* (163) y Pressler *et al.* (165)]. Otro ejemplo es la regulación mediada por HasI y HasS del sistema Has de *S. marcescens* (62). En el sistema Has, el hemo extracelular es reconocido y unido por el hemóforo HasA, el cual lo entrega al receptor de membrana externa HasR. La unión de holo-HasA a HasR

dispara una cascada de señales que permite la liberación del factor sigma HasI de la acción del factor antisigma HasS. De esta manera, HasI activa la total transcripción del sistema (62, 63).

Estos sistemas de regulación son activos cuando la disponibilidad de hierro es baja. Cuando la concentración de hierro es más elevada, la proteína Fur unida al hierro reprime la expresión de los genes implicados en el transporte así como del sistema σ /anti- σ (62, 163).

En el Capítulo III demostramos que la proteína HmuP de *S. meliloti* tiene como función activar en forma directa o indirecta específicamente la expresión del gen *shmR* en condiciones de baja disponibilidad de hierro (148). El gen *shmR* está además sujeto a represión mediada por RirA (146, 147), sumando un ejemplo más de sistemas de alta afinidad por hierro que presentan una regulación dual.

Dado que HmuP no pertenece a la familia de reguladores AraC ni a la familia de ECF, previamente descritos como activadores de sistemas de adquisición de hierro de alta afinidad, la elucidación del mecanismo de acción de HmuP sería un importante y novedoso aporte.

OBJETIVO

Determinar cuál es el mecanismo de acción de la proteína HmuP de *S. meliloti* responsable de la activación de la expresión del gen *shmR*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Bacterias, plásmidos y condiciones de crecimiento. Las bacterias y los plásmidos utilizados en este trabajo se detallan en la Tabla 4.S1. Las cepas de *Escherichia coli* fueron crecidas en aerobiosis a 37 °C en medio Luria-Bertani (LB) (166) . Las cepas de *S. meliloti* fueron crecidas a 30 °C, ya sea en medio triptona extracto de levadura (TY)(167), medio TY suplementado con MgSO₄ 2,5 mM y CaCl₂ 2,5 mM (TYMC) o medio mínimo definido M9 (166) suplementado con glutamato 6 mM, metionina 200 μ M y biotina 1 μ M (M9S). Las condiciones de restricción de hierro se lograron con el agregado de ácido etilendiamino-di-*o*-hidroxifenilacético (EDDHA) y las condiciones de suficiencia de hierro con el agregado de FeCl₃. Las concentraciones micromolares de FeCl₃, EDDHA (abreviado

como E) y de hemina (Hm) utilizados en cada ensayo se indican con subíndices. Cuando fue requerido se agregó al medio kanamicina (Km) 50 µg/ml, neomicina (Nm) 100 µg/ml, estreptomicina (Sm) 100 µg/ml, gentamicina (Gm) 10 µg/ml o 5 µg/ml, ampicilina (Ap) 50 µg/ml o cloranfenicol (Cm) 25 µg/ml.

Generación de la doble mutante HMUP/ Δ rirA. Mediante la utilización del fago Φ M12 (168) se obtuvieron lisados de la mutante *hmuP*, que fueron utilizados para transducir la mutación *hmuP*::Tn5-1063a (169) a la cepa Δ rirA según la metodología descrita por Humann *et al.* (170). Brevemente, se creció la mutante *hmuP* en 5 ml de TYMC hasta una $DO_{600} = 0,3-0,4$ y se generaron lisados infectando con 2 µl del fago Φ M12 e incubando a 30 °C hasta que ocurrió la lisis completa. Los lisados fueron filtrados y diluidos (1:300, 1:900, 1:2700, 1:8100) y se utilizó 300 µl de cada dilución para infectar 300 µl de células Δ rirA previamente crecidas en medio TYMC hasta una $DO_{600} = 0,8$. Se realizó la infección durante 20 min a 30 °C e inmediatamente las células fueron lavadas dos veces con medio TY y plaqueadas en medio TY suplementado con Sm 100 µg/ml y Nm 100 µg/ml. Las transductantes fueron re-aisladas por lo menos dos veces de manera de evitar el arrastre de partículas virales.

Purificación de ARN. La cepa parental *S. meliloti* 1021 fue crecida en medio M9S suplementado con EDDHA 300 µM, EDDHA 300 µM y Hm 1 µM, EDDHA 300 µM y Hm 20 µM, o FeCl₃ 37 µM. A partir de 20 ml de un cultivo en fase exponencial ($DO_{620} = 0.8-1.0$), se agregaron 4 ml de RNAProtect (Qiagen) y se cosecharon las células por centrifugación de 10 min a 7.000 rpm y 4 °C. Las células fueron guardadas a -80 °C hasta su uso. El ARN total fue aislado utilizando un procedimiento con fenol ácido caliente, tal como se detalla en Yang *et al.* (171). Las muestras de ARN fueron tratadas con la DNasa I libre de RNAsas RQ1 (Promega) y purificadas utilizando el protocolo de limpieza del kit RNeasy Bacterial RNA Purification (Qiagen).

Determinación del sitio de inicio de la transcripción. El sitio de inicio de la transcripción del gen *shmR* fue determinado por mapeo de extensión de cebadores (5'-RACE) utilizando el kit de Invitrogen según las recomendaciones del fabricante. Los cebadores utilizados se detallan en la Tabla 4.S2. Se utilizó el ARN total purificado de las distintas condiciones de crecimiento detalladas anteriormente. Los amplicones obtenidos fueron clonados en el vector pGEM-T (Promega) y los plásmidos fueron secuenciados. Los sitios

de inicio de la transcripción se determinaron por comparación de las secuencias obtenidas con el genoma de *S. meliloti* 1021 utilizando el algoritmo BLAST.

PCR cuantitativa (qPCR). La expresión diferencial del transcripto *shmR* fue determinada por qPCR. La retro-transcripción fue llevada a cabo a partir de ARN total utilizando el kit iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad). Para la reacción de PCR, se utilizaron 0,02 µg de ADNc y 0,25 µM de cada cebador en un volumen final de 20 µl, utilizando el iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Los cebadores utilizados se detallan en la Tabla 4.S2. Para la reacción de PCR se utilizó el termociclador iCycler (Bio-Rad), un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min y posteriormente 40 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 56 °C y 30 s a 72 °C. La generación de productos específicos se confirmó mediante el análisis de las curvas de desnaturalización. El gen *smc03224*, que codifica para un ARNr, fue utilizado como control de expresión constitutiva. Como control negativo se utilizaron muestras donde la transcriptasa reversa no fue agregada en el proceso de retro-transcripción. Para la cuantificación relativa de cada gen se realizó una curva estándar utilizando ADN genómico de *S. meliloti* 1021 como molde en la reacción de PCR. Las cantidades iniciales relativas de ARNm para cada gen (SQ) fueron calculadas a partir de la curva estándar correspondiente y normalizada de acuerdo al producto obtenido para el gen *smc03224*. Cada reacción fue realizada por triplicado.

Análisis de la actividad de la región promotora del gen *shmR*.

Se realizaron distintas fusiones transcripcionales para evaluar la actividad de la región promotora, con 3 objetivos particulares: **i)** identificar la región activa; **ii)** evaluar el efecto de mutaciones dirigidas a nucleótidos conservados en los motivos encontrados; **iii)** evaluar el efecto del contexto génico.

i) Promotor mínimo necesario para la correcta expresión de *shmR*. Para determinar la región promotora mínima necesaria para la expresión de *shmR*, se construyeron distintas fusiones transcripcionales utilizando el gen *gfp-UV* del plásmido pOT2 (172) como reportero. Con esta finalidad, se amplificaron, a partir del ADN genómico de *S. meliloti* 1021, diferentes fragmentos de la región corriente arriba del gen *shmR*. Los tamaños de los fragmentos amplificados fueron de 176 pb, 139 pb, 141 pb, 120 pb o 103 pb utilizando los cebadores detallados en la Tabla 4.S2. Todos los amplicones fueron clonados en los sitios de restricción HindIII-XbaI del vector pOT2, delante del gen *gfp-UV*

carente de promotor, generando los plásmidos pOTprshmR(x), donde x hace referencia al tamaño en pb de la región clonada. Las construcciones fueron confirmadas por secuenciación. Los plásmidos pOTprshmR(x) contenidos en la cepa DH5 α fueron movilizados a la cepa *S. meliloti* 1021 mediante conjugación triparental utilizando la cepa DH5 α -pRK2013 como cepa colaboradora (173). Se seleccionaron aquellas colonias resistentes a Str100 μ g/ml y Gm 5 μ g/ml y la presencia del plásmido se confirmó por PCR. Las cepas de *S. meliloti* resultantes se denominaron SM1021-pOTprshmR(x).

ii) Efecto de mutaciones dirigidas a los motivos conservados en la expresión de *shmR*.

Para determinar la importancia del motivo encontrado en la regulación de la expresión del gen *shmR*, se realizaron modificaciones de nucleótidos específicos mediante mutagénesis dirigida utilizando el método del “mega-cebador”. Para la generación de las regiones promotoras modificadas se realizó una primera ronda de PCR utilizando cebadores conteniendo las sustituciones nucleotídicas deseadas junto con el cebador externo “lower”. El amplicón obtenido fue utilizado como cebador en una segunda ronda de PCR junto al cebador externo “upper”. Los cebadores utilizados se detallan en la Tabla 4.S2. Se generaron once regiones promotoras con bases modificadas que se denominaron BMx, donde x es un número arbitrario del 1 al 11. Los productos obtenidos fueron clonados en los sitios HindIII/XbaI delante del gen *gfp-UV* carente de promotor en el vector pOT2 generando los plásmidos pOTprshmR(BMx) y el correcto clonado de las regiones promotoras modificadas fue verificado por secuenciación. Los plásmidos fueron introducidos en *S. meliloti* 1021 por conjugación triparental como se mencionó anteriormente. Se seleccionaron aquellas colonias resistentes a Str 100 μ g/ml y Gm 5 μ g/ml y la presencia del plásmido se confirmó por PCR. Las cepas de *S. meliloti* resultantes se denominaron SM1021-pOTprshmR(BMx).

iii) Efecto del contexto genómico en la expresión de *shmR*. Para determinar el efecto del contexto genómico en la expresión del gen *shmR*, la construcción pOTprshmR(520) conteniendo una secuencia 520 pb de la región promotora del gen *shmR* con los motivos intactos fue transferida a los distintos contextos génicos. La secuencia de 520 pb se obtuvo por PCR utilizando los cebadores upper y lower (Tabla 4.S2). Mediante conjugación triparental se transfirió la construcción a las cepas SM1021, HMUP, Δ *rirA* y

HMUP/ Δ *rirA*. Se seleccionaron aquellas colonias resistentes a Str 100 μ g/ml y Gm 5 μ g/ml y la presencia del plásmido se confirmó por PCR.

Evaluación de la expresión de *gfp-UV*. Para la evaluación de la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP-UV), los cultivos celulares fueron crecidos hasta fase exponencial ($DO_{600} = 0,8-1$) en medio M9S y diluidos 100 veces en medio M9S suplementado con EDDHA 300 μ M o con $FeCl_3$ 37 μ M. Como control negativo se utilizó la cepa SM1021-pOT2. Como controles positivos se usaron la cepa SM1021-pOTpr*ShmR*(650), obtenida por nuestro grupo en un trabajo previo (174), o la cepa SM1021-pOTpr*ShmR*(520) obtenida en este trabajo (Tabla 4.S1) según se indica. Los cultivos fueron crecidos hasta fase exponencial y la expresión de la proteína GFP-UV se evaluó en el Varioskan Flash[®] (Thermo), utilizando un filtro de 390nm para la excitación y uno de 520 nm para la emisión. Se determinó la fluorescencia relativa (FR) como la emisión a 520 nm/ DO_{620nm} . Cada experimento fue repetido al menos tres veces de forma independiente.

Clonado, sobreexpresión y purificación de la proteína HmuP recombinante. Para el clonado y la sobreexpresión de la proteína HmuP de *S. meliloti* 1021 en *E. coli*, un fragmento de ADN de 2.054 pb conteniendo el gen *hmuP* y regiones flanqueantes fue amplificado a partir del genoma de *S. meliloti* 1021. El amplicón obtenido fue clonado en los sitios PstI/XhoI del vector pBlueScriptSK (pSK) (Stratagene), generando el plásmido pSK*hmuP*. Utilizando el plásmido pSK*hmuP* como molde, se amplificó el marco de lectura abierto *hmuP* sustituyendo el codón de inicio GTG por un ATG de manera de que sea traducido a metionina en *E. coli*. Los cebadores utilizados se detallan en la Tabla 4.S2. El producto obtenido se clonó en el sitio NdeI/BamHI del plásmido pET14b (Novagen), generando el plásmido pET14b-HmuP. El correcto clonado se verificó por secuenciación. Se transformaron células de *E. coli* BL21DE3 (pLysS) (Novagen) con el plásmido pET14b-HmuP y se seleccionaron las colonias resistentes a Ap 50 μ g/ml y Cm 25 μ g/ml. Se verificó la presencia del plásmido mediante PCR. Para la sobreexpresión y purificación de la proteína HmuP recombinante se utilizó la metodología descrita por Friedman *et al.* (175) con algunas modificaciones. Todos los buffers utilizados para la purificación de HmuP fueron suplementados con altas concentraciones de sal (NaCl 2M) de manera de eliminar interacciones inespecíficas entre HmuP y los ácidos nucleicos de

E. coli. Las fracciones conteniendo la proteína HmuP recombinante fueron equilibradas en buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 8,0, conteniendo NaCl 300 mM y glicerol 10 % (v/v). La correcta sobreexpresión y purificación fue verificada por SDS-PAGE. La proteína purificada fue almacenada a 4 °C hasta su uso. La integridad de la proteína purificada fue verificada por SELDI-TOF y mapeo peptídico. Para los ensayos de resonancia de plasmones de superficie se purificó la proteína por gel filtración utilizando la columna Superdex 75 y una plataforma de purificación ÄKTA.

Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA). Para evaluar la capacidad de la proteína HmuP recombinante de unirse a la región promotora del gen *shmR* se realizó la técnica de EMSA. Como sonda se utilizó un ADNsc sintético o un ADNdc generado por hibridación de las sondas simple cadena. Las sondas se detallan en la Tabla 4.S2. Las reacciones de unión se realizaron utilizando varias relaciones sonda:HmuP. En un volumen final de 20 µl, se incubó la reacción durante 20 min a 25 °C en buffer de unión (Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, DTT 1 mM, pH 7,5). Las reacciones se corrieron en un gel nativo de acrilamida 6 % en buffer Tris Borato 0,5X (Tris 0,045 M, Borato 0,045 M, pH 8,3), durante una hora a 20 mA. Los geles fueron revelados mediante la técnica de tinción con plata (176).

Resonancia de plasmones de superficie (SPR). Para determinar los parámetros de la interacción de HmuP con su secuencia blanco se utilizó el Biacore X100 con un chip de estreptavidina (BR-1003-98, GE Healthcare). Se utilizó un ADNdc biotinilado que tiene una porción de ADNsc (ancla), para unir la matriz al chip. Se diseñaron 2 matrices de ADNsc conteniendo cada una de ellas una secuencia que hibrida con la porción ADNsc del ancla, y otra secuencia que contiene la región promotora de *shmR* de interés. Se diseñaron 5 sondas de ADNsc capaces de hibridar distintas secuencias de la región promotora presente en la matriz, de manera de generar moldes de ADNdc donde la proteína HmuP se pueda unir. Las secuencias de las matrices y las sondas utilizadas se detallan en la Tabla 4.S2. Para la preparación de los ADNdc, se hibridó la matriz con exceso (2x) de cada una de las sondas en buffer His-Tag 1X (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, pH=8). La mezcla se desnaturalizó a 95 °C durante 5 min, se incubó 10 min a 65 °C para favorecer la hibridación y luego se dejó alcanzar temperatura ambiente lentamente y se almacenaron alícuotas a -20 °C hasta su uso. La unión de la proteína HmuP a las

sondas se evaluó en buffer NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 100 mM, pH=8. La inyección de una solución 50 nM del ancla se realizó a un flujo de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ en dos etapas sucesivas de 600 s cada una. La inyección de una solución 83 nM de la matriz se realizó a un flujo de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ durante 600 s y posteriormente se inyectaron las sondas a una concentración 83 nM en las mismas condiciones. La inyección de la proteína se realizó a un flujo de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ durante 180 s utilizando soluciones de HmuP 5,1 μM , 15 μM o 46 μM . Los resultados se expresan en unidades de respuesta (RU) y fueron normalizados a las RU presentadas por la unión del ancla al chip.

Co-Inmunoprecipitación (Co-IP). Se generaron anticuerpos anti-HmuP en conejo utilizando la proteína HmuP recombinante purificada como antígeno en el servicio del Laboratorio de Biotecnología del Instituto Polo Tecnológico. Se comprobó la especificidad del anticuerpo generado mediante western blot. Brevemente, se corrieron 4 geles desnaturalizantes de acrilamida 18 % conteniendo cada uno de ellos la proteína recombinante HmuP, extracto total de la cepa parental *S. meliloti* 1021 y extracto total de la cepa mutante *hmuP*. Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa las cuales se bloquearon durante 1 hora con una solución de leche en polvo 5 % (p/v) en TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH=8) y se incubaron 1 hora con el anticuerpo anti-HmuP diluido 200, 400 u 800 veces, o el suero pre-inmune diluido 200 veces como control negativo. Todas las diluciones fueron realizadas en buffer TBS. Se incubaron las membranas durante 1 hora con una dilución 1/3.000 del anticuerpo secundario (proteína A-fosfatasa alcalina P7488 SIGMA) en buffer TBS. Para el revelado de la membrana con el sustrato NBT/BCIP (azul de nitro tetrazolium/ 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato) se preparó una solución de NBT 30 mg/ml en N,N-dimetilformamida 70 % (v/v) y una solución de BCIP 15 mg/ml en N,N-dimetilformamida 100 %. Estos reactivos fueron diluidos 1/100 en buffer Tris 0,5 M, MgCl_2 0,5 mM, pH=9 y utilizados para el revelado.

Para la Co-IP, se partió de 9 ml de un cultivo de $\text{DO}_{600\text{nm}} = 3$ de *S. meliloti* 1021 o de la mutante *hmuP* crecidas en M9S con el agregado de EDDHA 150 μM . Se cosecharon las células por centrifugación de 10 min a 7.000 rpm y 4 °C, se resuspendieron en 9 ml de sales M9 1X (166) y se agregó 1 ml de buffer fosfato de sodio 0,1 M, pH=7,2 y 270 μl de formaldehído 38 %. El entrecruzamiento se llevó a cabo incubando la mezcla durante

15 min a 25 °C y posteriormente 45 min a 4 °C. Se cosecharon las células por centrifugación de 10 min a 7.000 rpm y 4 °C y se realizaron 2 lavados sucesivos con 10 ml de buffer PBS frío (Na₂HPO₄ 10 mM, NaCl 137 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, KCl 2,7 mM). Las células se resuspendieron en 500 µl de buffer de lisis (Tris 10 mM, EDTA 0,1 mM, lisozima 0,5 mg/ml, PMSF 1 mM, pH=8), se incubaron 15 min a 37 °C, se agregó 50 µl de SDS 10 % y se incubaron otros 5 min a 37 °C. Para la ruptura del ADN se sonicaron las mezclas de lisis durante 10 s a 5 % de amplitud y posteriormente se evaluó el tamaño del ADN obtenido por electroforesis en gel de agarosa 0,7 % de manera de corroborar la presencia de fragmentos de aproximadamente 600 pb. Se diluyeron las muestras al 10 % en buffer ChIP (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1 % (v/v), EDTA 5 mM, pH=7) con el agregado de PMSF 1 mM y se centrifugaron 15 min a 10.000 rpm y 4 °C. Alícuotas de 1 ml de sobrenadante fueron utilizadas para la posterior incubación con los anticuerpos y una alícuota de 30 µl (control de ADN total) se guardó a -20 °C hasta el momento de revertir el entrecruzamiento. Para eliminar interacciones inespecíficas debido al agente inmunoprecipitante, se incubaron las alícuotas de 1 ml de sobrenadante con 2,5 mg de proteína A-sepharosa hidratada previamente con 20 µl de buffer ChIP durante 1 h a 37 °C. Se centrifugaron 1 min a 2.000 rpm y 4 °C, y los sobrenadantes se incubaron durante 16 h a 4 °C con distintos volúmenes del anticuerpo anti-HmuP (2 µl, 10 µl, 25 µl y 50 µl) o con 50 µl de suero pre-inmune (control negativo). Para la recuperación del complejo ADN-proteína, se agregó a los sobrenadantes 6,25 mg de proteína A-sepharosa hidratada previamente con 50 µl de buffer ChIP durante 1 h a 37 °C, y se incubaron durante 1 h a 25 °C. Posteriormente se centrifugaron 1 min a 2.000 rpm y 4 °C, se descartó el sobrenadante y se lavó el complejo 3 veces con 1 ml de buffer IPL (igual al buffer ChIP pero con EDTA 1 mM), 1 vez con 1 ml de buffer IPH (igual a IPL pero con NaCl 500 mM) y 2 veces con 1 ml de buffer T₁₀E_{0,1} (Tris 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH=8). El complejo ADN-proteína se disoció de la sepharosa al incubarse con 200 µl de buffer de elución (SDS 1 %, NaHCO₃ 0,1 M) por 15 min a 25 °C. Posteriormente, se centrifugó 1 min a 2.000 rpm y 4 °C, y los sobrenadantes conteniendo el complejo ADN-proteína se disociaron con el agregado de 8 µl de NaCl 0,5 M e incubación durante 6 h a 65 °C. Los 30 µl del control de ADN total fueron disociados de la misma manera, previo agregado de buffer de elución hasta un volumen final de 200 µl. El ADN

inmunoprecipitado se purificó con el kit Wizard (Promega) y se utilizó como molde en reacciones de PCR utilizando los cebadores 176anti y 176sense detallados en la Tabla 4.S2. Como control positivo se utilizó el control de ADN total.

RESULTADOS

El gen *shmR* se transcribe a partir de dos sitios de inicio de la transcripción. El primer paso para la caracterización del promotor de *shmR* y de los sistemas regulatorios que gobiernan su expresión fue la determinación del sitio de inicio de la transcripción. Mediante mapeo de extensión de cebadores se determinó la presencia de dos sitios de inicio de la transcripción para el gen *shmR*. Uno de los transcritos (transcripto 1) comienza 104 pb corriente arriba del codón de inicio de la traducción correspondiéndole los posibles elementos -10 y -35, TTTCTTAT y TTGACA, respectivamente (Fig. 4.1). El otro transcripto (transcripto 2) comienza en la posición -76 con respecto al codón de inicio y en este caso el elemento -35 se solaparía al elemento -10 del transcripto 1, mientras que el elemento -10 estaría formado por AAATAGAT.

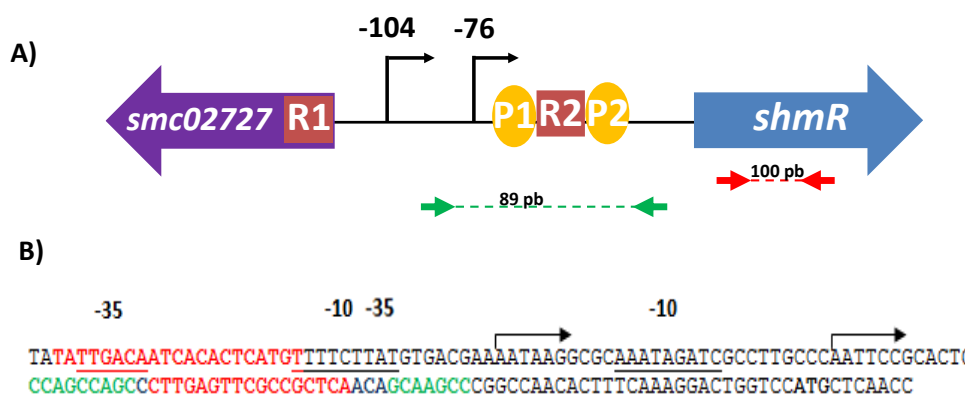


Fig. 4.1. Organización de la región promotora del gen *shmR* (no a escala). Las flechas negras indican la ubicación de los dos sitios de inicio de la transcripción. **A)** Los motivos conservados se esquematizan de la siguiente manera: los rectángulos rojos indican la ubicación de las cajas RirA (R1 y R2) y las esferas naranjas indican la ubicación de las cajas HmuP (P1 y P2). Los números indican la distancia en pb del sitio de inicio de la transcripción respecto al ATG. Las flechas verdes o rojas representan los cebadores utilizados para la cuantificación del transcripto iniciado a partir del -104 (transcripto 1) o a partir del -76 (transcripto 2), respectivamente; **B)** Los nucleótidos que componen las cajas RirA se muestran en rojo y para las cajas HmuP en verde. Los nucleótidos compartidos por ambos motivos se muestran en azul. Los posibles sitios de unión de la ARN polimerasa (-10 y -35) se muestran subrayados.

La presencia de dos sitios de inicio de la transcripción podría estar indicando una expresión diferencial de los transcritos dependiendo de las condiciones a las que la bacteria se vea sometida. Dado que la expresión de *shmR* responde a hierro, evaluamos la existencia de expresión diferencial mediante PCR cuantitativa de los distintos transcritos en función de la biodisponibilidad de hierro.

Considerando que el producto de amplificación obtenido a partir del juego de cebadores TSS2 (indicados con las flechas rojas en la Fig. 4.1) podría corresponderse tanto al transcripto 1 (que inicia en la posición -104) como al transcripto 2 (que inicia en la posición -76) su expresión se calculó de la siguiente manera: $SQ \text{ transcripto 2} = SQ \text{ (transcripto 1 + transcripto 2)} - SQ \text{ transcripto 1}$.

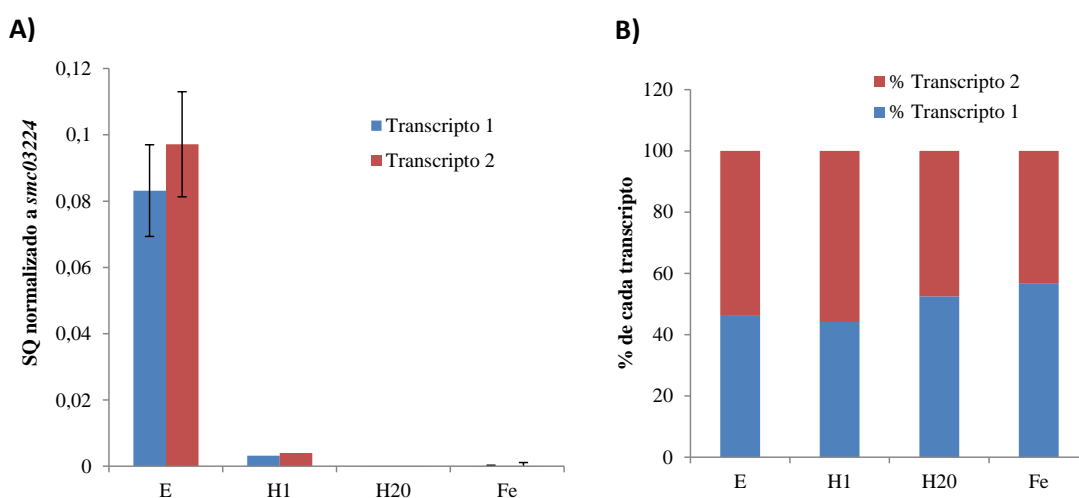


Fig. 4.2. Expresión de los distintos transcritos en función de la disponibilidad de hierro. E: en presencia de EDDHA 150 μ M; H1: Hm 1 μ M y EDDHA 150 μ M; H20: Hm 20 μ M y EDDHA 150 μ M; Fe: FeCl₃ 37 μ M. A) SQ normalizado a *smc03224*; B) Porcentaje de expresión de los transcritos en las distintas condiciones de disponibilidad de hierro.

Como se muestra en la figura 4.2, la expresión de ambos transcritos fue reprimida por la presencia de hierro o de hemina en el medio, corroborando lo demostrado anteriormente para el gen *shmR* (143, 146, 147, 177). Si asumimos que ambos transcritos tienen como producto final la expresión de *shmR*, podemos concluir que el

transcripto 1 y el transcripto 2 se encuentran en igual proporción presentando un patrón de expresión similar en respuesta a la disponibilidad de hierro.

Análisis *in silico* de la región corriente arriba de *shmR*. Utilizando los genomas publicados de Rhizobiales nuestro grupo realizó la búsqueda de motivos nucleotídicos conservados presentes en la región 5' de receptores de membrana externa involucrados en el transporte de hemo, homólogos a ShmR (Uriel Koziol, no publicado). Se encontraron dos motivos muy conservados presentes delante de los presuntos genes *shmR* (Fig. 4.3).

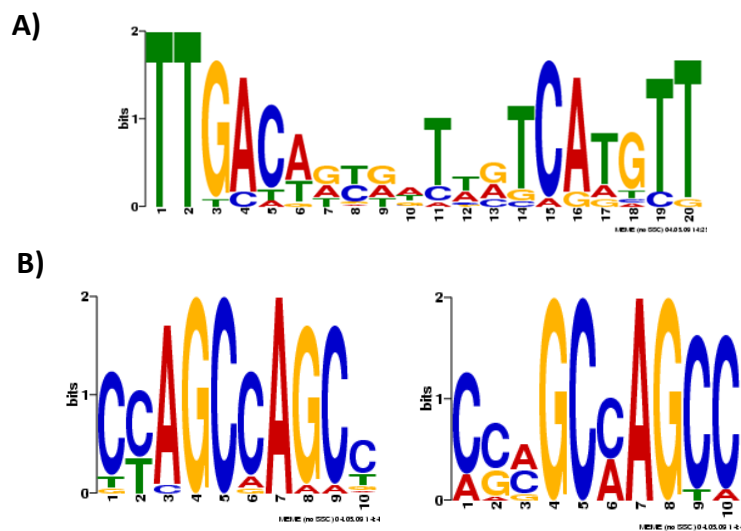


Fig. 4.3. Motivos conservados en la región promotora de presuntos genes *shmR* encontrados mediante análisis bioinformático. Los motivos fueron identificados utilizando la herramienta MEME (Koziol, no publicado).

Uno de estos motivos (Fig. 4.3A), coincide con la caja RirA ya descrita en α -Proteobacterias (5'-TGA-(N₉)-TCA-3') (95). Los nuevos motivos encontrados (Fig. 4.3B) están ampliamente distribuidos en Proteobacterias y se ubican en forma de tándem en la región promotora de receptores TonB-dependientes involucrados en la adquisición de hemo. Se encontró una correlación entre la presencia de los motivos y la presencia de un homólogo a *hmuP* en el genoma, sugiriendo fuertemente la vinculación de este motivo con HmuP (Uriel Koziol, no publicado). Se denominaron a estos motivos cajas

HmuP. Como se observa en la Fig. 4.1 en la región corriente arriba de *shmR* se encuentran dos cajas HmuP y ambas cajas están presentes en la región correspondiente a los transcritos del gen *shmR* flanqueando una caja RirA. Una segunda caja RirA se encuentra solapando el motivo -35 correspondiente al transcripto 1.

Teniendo en cuenta los resultados publicados por el grupo de Anke Becker (178) se realizó un mapeo *in silico* en la región genómica de *shmR*, ubicando a un pequeño ARN no codificante (ARNnc) denominado SmelC589 en la región líder del transcripto de *shmR* (Fig. 4.4). Este ARNnc de 115 bases se transcribe en la hebra menos, al igual que *shmR*, y su sitio de inicio de la transcripción coincide con el sitio de inicio de la transcripción del transcripto 1. La búsqueda de posibles terminadores transcripcionales luego de la región del ARNnc SmelC589 no dio resultados concluyentes (datos no mostrados), pero según los resultados obtenidos por RNA seq realizados por el grupo de Becker, se produciría un transcripto corto correspondiente a SmelC598, el cual inicia en el sitio -104 y termina luego de las once primeras bases del gen *shmR*.

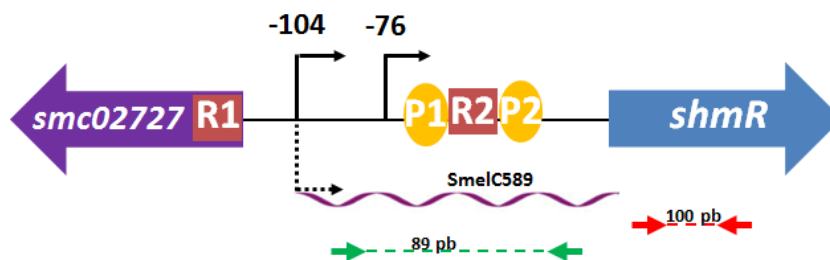


Fig. 4.4. Ubicación del ARNnc SmelC589 en la región promotora del gen *shmR*. Las flechas negras indican la ubicación de los dos sitios de inicio de la transcripción. La flecha punteada indica el sitio de inicio de la transcripción del ARNnc SmelC589. Los rectángulos rojos indican la ubicación de las cajas RirA (R1 y R2) y las esferas naranjas indican la ubicación de las cajas HmuP (P1 y P2). Los números indican la distancia en pb del sitio de inicio de la transcripción respecto al ATG. Las flechas verdes o rojas representan los cebadores utilizados para la cuantificación del transcripto iniciado a partir del -104 (transcripto 1) o a partir del -76 (transcripto 2), respectivamente.

Nucleótidos conservados dentro de las cajas HmuP son importantes para la actividad dependiente de hierro de la expresión de *shmR*. Una vez identificadas *in silico* las cajas HmuP nos planteamos construir mutaciones puntuales en los motivos conservados a fin de evaluar su importancia en la regulación de la expresión de *shmR*. En la figura 4.5 se indican los nucleótidos en los cuales se generaron mutaciones puntuales.

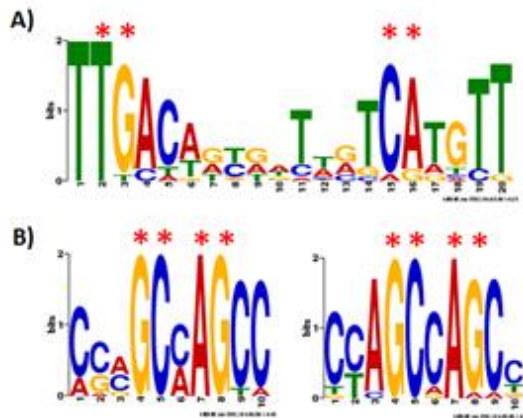


Fig. 4.5. Nucleótidos seleccionados dentro de los motivos conservados para la generación de mutaciones puntuales. A) caja RirA; B) cajas HmuP. HmuP1: izquierda, HmuP2: derecha. Con asteriscos rojos se indican las sustituciones que resultan de interés ya que permitirían modificar bases altamente conservadas en el motivo.

Las mutaciones se generaron a partir de una región de 520 pb ubicada corriente arriba de la secuencia codificante de *shmR*, la cual se detalla en la figura 4.6.

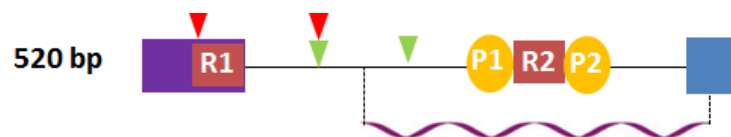


Fig. 4.6. Región promotora de utilizada para la generación de mutaciones puntuales. Se esquematiza la composición de la región promotora que se utilizó como molde para la generación de variantes en las cajas HmuP (círculos amarillos P1 o P2) y RirA (rectángulos rojos R1 o R2) mediante sustituciones nucleotídicas. Los triángulos verdes y rojos indican los posibles sitios de unión de la maquinaria transcripcional, secuencias -10 y -35 respectivamente. Esta construcción contiene parte de la secuencia codificante de *shmR* (azul) y de *smc02727* (violeta). Contiene además la secuencia completa del ARNnc SmelC589.

Se construyeron un total de 11 fragmentos de 520 pb, cada una de ellas conteniendo sustituciones de dos nucleótidos en los distintos motivos conservados (BM1-BM11). En la figura 4.7 y en la Tabla 4.1 se detallan los cambios realizados.

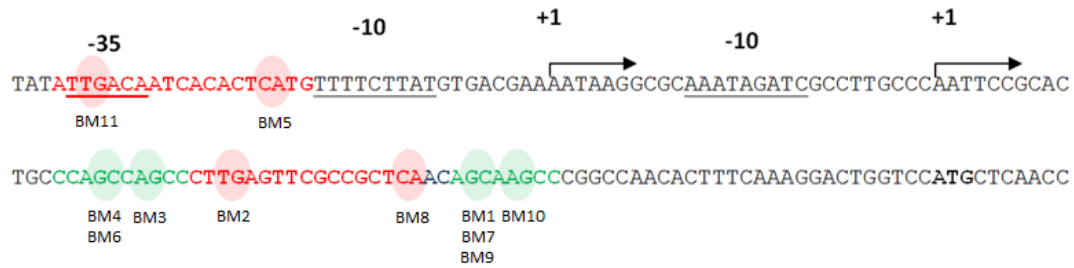


Fig. 4.7. Nucleótidos sometidos a sustituciones dentro de los motivos conservados encontrados. En letras rojas se muestran las cajas RirA, en verde las cajas HmuP y en azul los nucleótidos compartidos por ambos motivos. Los círculos rojos indican los nucleótidos de las cajas RirA que fueron modificados y los verdes las modificaciones en las cajas HmuP. Las secuencias subrayadas corresponden a los posibles sitios de reconocimiento de la maquinaria transcripcional. En negrita se muestra el sitio de inicio de la traducción de ShmR. Las flechas indican los sitios de inicio de la transcripción previamente determinados.

Tabla 4.1. Sustituciones nucleotídicas realizadas en los motivos conservados presentes en la región 5' de la secuencia codificante de *shmR*

Mutante dirigido ^a	RirA1 (R1)	HmuP1 (P1)	RirA2 (R2)	HmuP2 (P2)
BM1	N/M ^b	N/M	N/M	GC-AT ^c
BM2	N/M	N/M	TG-CA	N/M
BM3	N/M	AG-GT	N/M	N/M
BM4	N/M	GC-AT	N/M	N/M
BM5	CA-TC	N/M	N/M	N/M
BM6	N/M	GC-CG	N/M	N/M
BM7	N/M	N/M	N/M	GC-AT
BM8	N/M	N/M	CA-TC	N/M
BM9	N/M	N/M	N/M	GC-CG
BM10	N/M	N/M	N/M	AG-GT
BM11	TG-CA	N/M	N/M	N/M

^a Sustituciones realizadas en la región 5' de la secuencia codificante de *shmR*

^b N/M, no modificado

^c Las bases a la izquierda del guion fueron sustituidas por las bases a la derecha

Las secuencias modificadas fueron clonadas en el vector pOT2 e introducidas en *S. meliloti* 1021, de manera que el efecto de las sustituciones se pudiera evaluar mediante

la cuantificación de la fluorescencia de la proteína GFP-UV. A efectos prácticos, las cepas generadas [SM1021pOTprsh*mR*(BMx)] se abrevian según la mutación puntual que contiene (BM1-BM11).

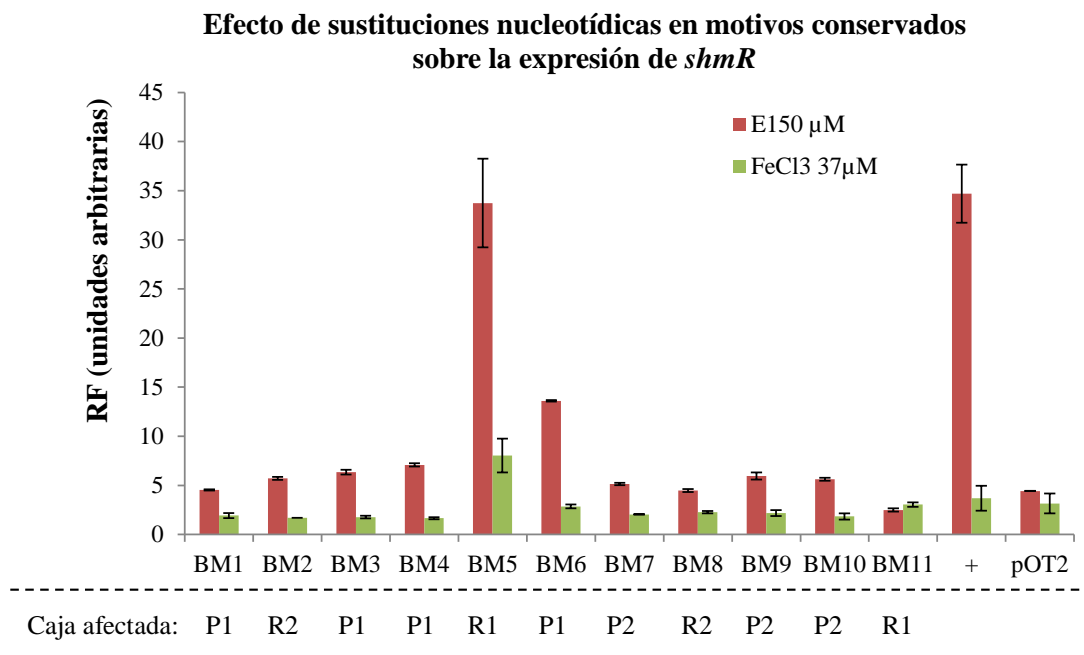


Fig. 4.8. Efecto de sustituciones nucleotídicas en los motivos conservados sobre la expresión de *shmR*. BM1-BM11, regiones promotoras con mutaciones puntuales detalladas en la Tabla 4.1; +, control positivo que corresponde a un fragmento del mismo tamaño que el de las mutantes puntuales pero con la secuencia original [pOTprsh*mR* (520)]; pOT2, control negativo. Debajo de la gráfica se resumen las cajas afectadas en cada una de las mutaciones puntuales realizadas. P1, caja HmuP1; P2, caja HmuP2; R1, caja rirA1; R2, caja rirA2. E, EDDHA.

Las mutaciones puntuales presentes en BM3, BM4 y BM6 contienen mutaciones en la caja HmuP1. Si bien éstas afectan la activación de la expresión de *shmR* en condiciones de baja disponibilidad de hierro, su expresión es mayor que la observada en el control negativo sugiriendo que la pérdida de expresión no es total. La represión mediada por hierro de la expresión de *shmR* se mantiene en estas mutaciones (Fig. 4.8).

La mutación introducida en la construcción BM6 provoca un fenotipo de expresión intermedio en ausencia de hierro. Esta construcción tiene las mismas dos bases sustituidas que BM4 pero mientras que en BM6 se sustituyeron dos bases fuertes por dos bases fuertes (GC-CG), en BM4 se sustituyeron las dos bases fuertes por dos bases

débiles (GC-AT). Estos resultados sugieren que la naturaleza de las bases introducidas es importante para la expresión del gen *shmR*.

Las mutaciones puntuales presentes BM1, BM7, BM9 y BM10, las cuales contienen mutaciones en la caja HmuP2, tienen como resultado un fenotipo de expresión similar al obtenido para las mutantes en la caja HmuP1. Hay una disminución importante, pero no una pérdida total, de la expresión de *shmR* en condiciones de baja disponibilidad de hierro, mientras que la represión por hierro se mantiene.

Estos resultados indican que ambas cajas, HmuP1 y HmuP2, son importantes para la activación de la expresión de *shmR* en ausencia de hierro y no son necesarias para la represión mediada por RirA. Estos resultados y la correlación de la presencia de las cajas HmuP con los receptores de hemo sugieren fuertemente que son necesarias para la activación dependiente de HmuP.

Las construcciones BM2 y BM8 corresponden a mutaciones en la caja RirA2. La ausencia de expresión en condiciones de disponibilidad de hierro indica que este motivo no es necesario para la represión por hierro mediada por RirA de la expresión del gen *shmR* como era de esperar. Por el contrario, estas mutaciones puntuales afectaron la activación de la expresión en ausencia de hierro sugiriendo que el motivo RirA2 participa en la activación.

Las construcciones BM5 y BM11 contienen mutaciones en la caja RirA1. El fenotipo de des-represión en presencia de hierro observado en la cepa que contiene la construcción BM5 corresponde con lo esperado para una alteración en la unión del represor RirA. Si bien la des-represión no es total, estos resultados indican que las bases alteradas son importantes para el mecanismo de acción de RirA. Sorprendentemente la construcción BM11 (que posee las mutaciones en el motivo -35 correspondiente al transcritto 1, motivo que se solapa con la caja RirA1) no sigue este patrón esperado, no obteniéndose expresión en ninguna de las dos condiciones de disponibilidad de hierro ensayadas. Por otro lado, no se observa la expresión mínima en condiciones de disponibilidad de hierro observada en las otras mutaciones, indicando ausencia total de expresión del gen *shmR*.

Una región de 176 pb es suficiente para mantener la actividad de la expresión dependiente de hierro. Para determinar la importancia de los distintos motivos en la regulación de la expresión del gen *shmR*, se construyeron las fusiones pOT-pr*shmR*(x). Estas construcciones tienen distintos fragmentos de la región que contiene al posible promotor de *shmR* fusionados al gen que codifica para la proteína verde fluorescente (*gfp-UV*). Estas regiones incluyen parte del 5'UTR del gen *shmR*. En la figura 4.9 se esquematizan las construcciones realizadas. Hasta el momento no se pudo clonar la región de 141 pb en el vector pOT2.

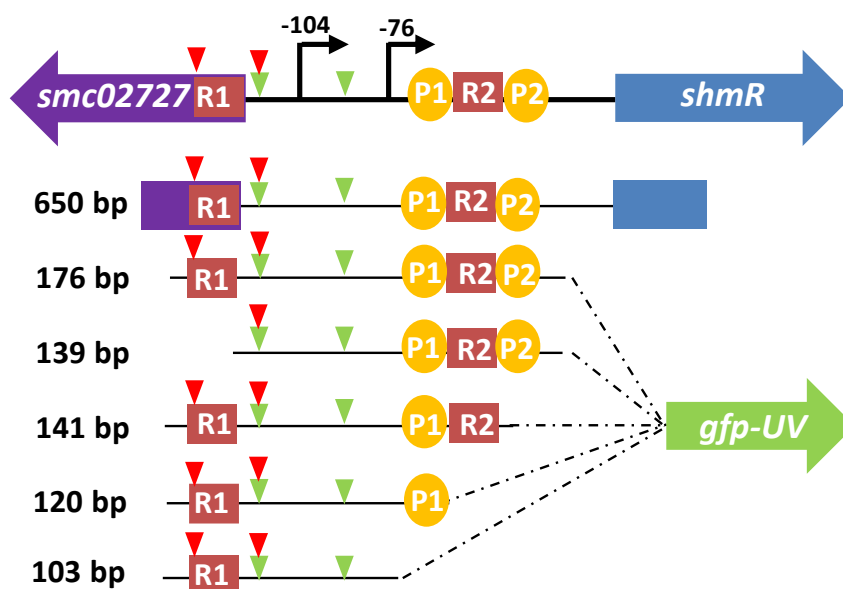


Fig. 4.9. Esquema de las fusiones realizadas para la determinación de la región promotora mínima necesaria para la regulación dependiente de hierro de *shmR*. La fusión de 650 pb, pOT-pr*shmR*(650), fue construida en un trabajo previo (177) y contiene todos los motivos en estudio, un fragmento de la región codificante de *shmR* y un fragmento de la región codificante del gen *smc02727*. La fusión pOT-pr*shmR*(176) contiene todos los motivos en estudio; pOT-pr*shmR*(139) carece de una de las cajas RirA, (R1); pOT-pr*shmR*(141) carece de una de las cajas HmuP, (P2); pOT-pr*shmR*(120) carece de una caja HmuP, (P2) y una caja RirA, (R2); pOT-pr*shmR*(103) carece de ambas cajas HmuP, (P1 y P2) y de una caja RirA, (R2). Los triángulos verdes y rojos indican los posibles sitios de unión de la maquinaria transcripcional, secuencias -10 y -35 respectivamente.

Los plásmidos conteniendo las fusiones fueron introducidos en *S. meliloti* 1021 [SM1021 pOTpr*shmR*(x)] y se determinó la expresión en condiciones de agregado o limitación de hierro.

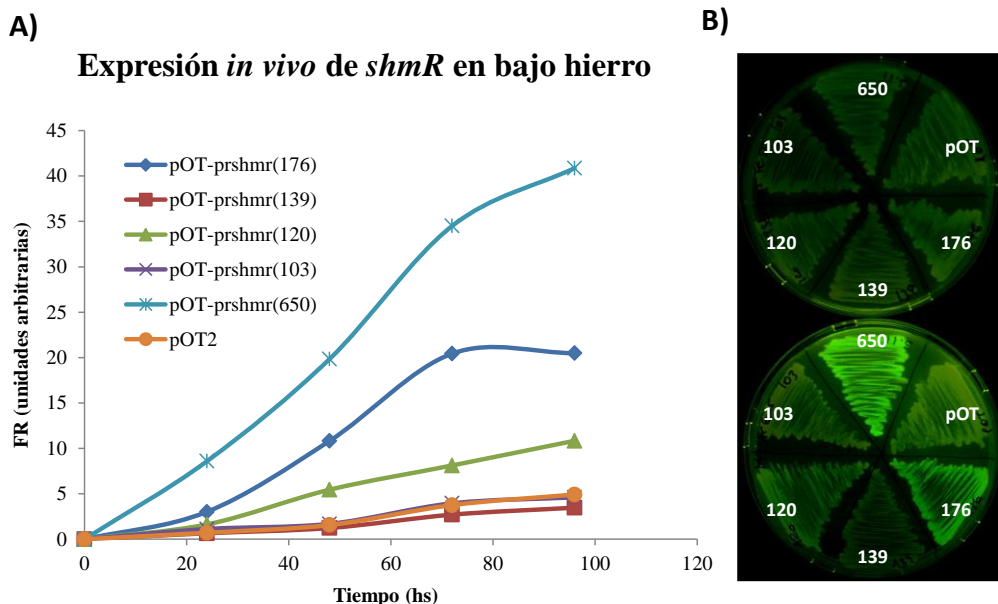


Fig. 4.10. Efecto de los motivos conservados en la expresión de *shmR* *in vivo*. Se evaluó la expresión de *shmR* indirectamente mediante la medida de la fluorescencia. **A)** Expresión medida en unidades relativas de fluorescencia (FR) en función del tiempo en células crecidas en condiciones de baja disponibilidad de hierro, con el agregado de EDDHA 150 μ M. Para simplificar, las distintas cepas de SM1021 ensayadas se nombran con el nombre del plásmido que contienen. **B)** Expresión en placas de medio TY, evidenciada bajo luz UV. Arriba condiciones con el agregado de FeCl_3 37 μ M al medio, abajo con el agregado de EDDHA 150 μ M. Las distintas fusiones se abrevian según el tamaño en pb del fragmento clonado.

Como se muestra en la figura 4.10, si bien la región de 176 pb es suficiente para que el promotor sea activo en condiciones de baja disponibilidad de hierro, los valores de FR alcanzados son menores que los obtenidos en la fusión que contiene un fragmento de 650 pb. Esta diferencia podría estar asociada a la menor longitud de la secuencia líder del transcripto o a la falta de la región 3' del SmelC589. La disminución en la expresión presentada por la construcción pOT-prshmr(120) la podemos asociar a la falta de una caja HmuP lo que sugeriría que ambas cajas son necesarias para una correcta expresión. Esto se confirma con la construcción pOT-prshmr(103), la cual pierde completamente la expresión al carecer de las dos cajas HmuP. La pérdida de expresión en la construcción pOT-prshmr(139) podría estar asociada a la pérdida de la caja RirA1 o a la pérdida del elemento -35 del transcripto 1.

En condiciones de disponibilidad de hierro la expresión de todas las fusiones fue similar a la del control pOT2, indicando que la represión se mantiene en todos los casos (Fig. 4.10 B y datos no mostrados). Este hecho sugiere que ninguno de los motivos es

necesario para la represión en contraposición a lo esperado para las construcciones carentes de las cajas RirA1 y/o RirA2.

El mecanismo de acción de HmuP es independiente de hierro y de RirA. Dada la presencia de las cajas RirA y los resultados obtenidos a partir de las construcciones realizadas, donde no se pudo asignar una función clara a la presencia de las cajas RirA, nos planteamos estudiar la expresión de GFP-UV en las mutantes *rirA* y *hmuP* de manera de determinar el efecto de la ausencia de estas proteínas en la regulación de la expresión de *shmR*. Con esta finalidad introdujimos la construcción pOTpr*shmR*(520) en los distintos contextos genómicos y evaluamos el efecto de los mismos en la actividad dependiente de hierro de la región clonada.

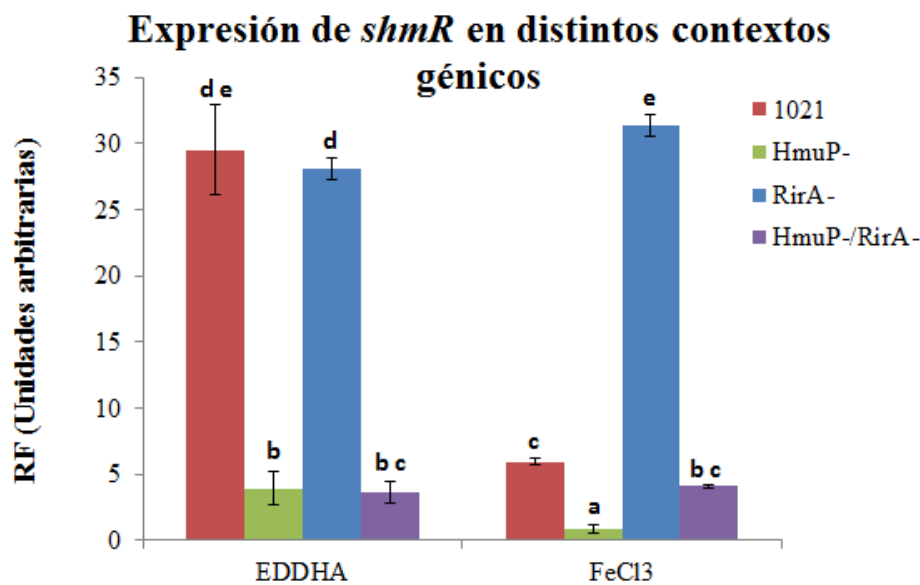


Fig. 4.11. Expresión de *shmR* en distintos contextos genómicos. La construcción pOTpr*shmR*(520) fue introducida en los distintos contextos genómicos y la expresión de *shmR* se determinó indirectamente mediante la medida fluorescencia de GFP. Los datos fueron normalizados utilizando pOT2 como control negativo de expresión. 1021, cepa parental; HmuP-, mutante *hmuP*; RirA-, mutante *rirA*; HmuP-/RirA-, doble mutante, *hmuP*, *rirA*.

Como se muestra en la figura 4.11, la cepa *S. meliloti* 1021 pOTpr*shmR*(520) presenta el perfil de expresión esperado para *shmR*, es decir activación en condiciones de baja disponibilidad de hierro y represión en presencia del metal. La ausencia de HmuP

(HmuP⁻) produce una pérdida de activación, lo que concuerda con el fenotipo de expresión previamente observado (169). En presencia de hierro y ausencia de HmuP se observa una leve diferencia con respecto a la condición sin hierro, posiblemente debido a un mayor efecto represor ejercido por la proteína RirA con hierro. La ausencia de RirA (RirA⁻) provoca la pérdida de la represión observada en condiciones de disponibilidad de hierro, fenotipo esperado para genes sujetos a represión por RirA y previamente reportado para la expresión del gen *shmR* (146, 147). La ausencia de RirA no tiene ningún efecto en la activación de la expresión de *shmR* en condiciones de baja disponibilidad de hierro, ya que la misma se mantiene en el contexto Δ *rirA*. Interesantemente, en la doble mutante carente de HmuP y de RirA el gen *shmR* no se expresa, indicando que la activación mediada por HmuP no depende de RirA. También es importante destacar que HmuP demostró ser indispensable para que se exprese el gen *shmR* independientemente de la condición de disponibilidad de hierro.

***In vitro* HmuP es capaz de unirse a las cajas HmuP identificadas.** Para comprobar si la proteína HmuP se une al ADN y en particular a regiones que contengan las cajas HmuP identificadas, se realizaron dos abordajes *in vitro*: resonancia de plasmones de superficie (SPR) y ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA). Para ello, se sobreexpresó y purificó la proteína HmuP de forma heteróloga. Se vio que co-purificaba con un ácido nucleico de *E. coli*, ya que el espectro de la proteína purificada presentaba un pico de absorción a 260 nm. Esto indica que HmuP es capaz de unir ácidos nucleicos presentes en *E. coli*, ya sea de forma específica o inespecífica, hecho que afectaría considerablemente los ensayos de unión de la proteína a las sondas de ADN. La presencia de ácidos nucleicos en la proteína purificada se corroboró mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con intercalante de ácidos nucleicos (datos no mostrados).

Para obtener la proteína HmuP libre de ácidos nucleicos se realizaron distintas aproximaciones de purificación, logrando finalmente la disociación del complejo utilizando una alta concentración de sal (NaCl 2M) en todas las etapas de purificación. La disociación del complejo HmuP-ácido nucleico se evidenció por la desaparición del pico de absorbancia a 260 nm y el aumento del pico a 280 nm. La proteína se purificó

por gel filtración y se comprobó su integridad e identidad mediante espectrometría de masa y mapeo peptídico. La figura 4.12 muestra los resultados obtenidos en las distintas etapas de purificación e identificación.

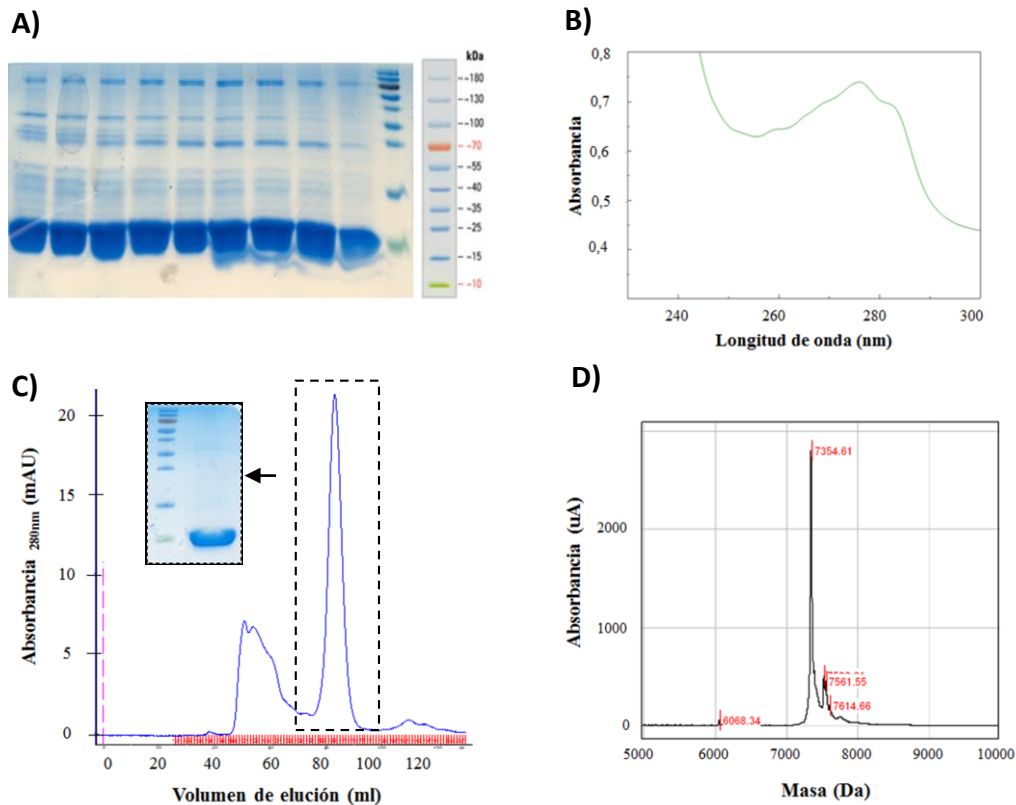


Fig. 4.12. Sobreexpresión y purificación de la proteína HmuP recombinante. **A)** SDS-PAGE de las fracciones obtenidas de la purificación de la proteína His-HmuP con columnas de Ni-agarosa y alta concentración de sal. Se observa una banda mayoritaria aproximadamente a la altura de la banda de 10 kDa, lo que concuerda con el tamaño calculado para la proteína recombinante HmuP (7,485 kDa). **B)** Espectro de barrido de la proteína HmuP purificada donde se verifica la ausencia del pico a 260nm posterior a la purificación. **C)** Purificación por gel filtración de la proteína recombinante HmuP. Se recolectó el pico mayoritario y se verificó su tamaño mediante SDS-PAGE (recuadro). **D)** Evaluación de la integridad de la proteína mediante SELDI-TOF. El Pico corresponde a la masa de la proteína HmuP recombinante sin la metionina N-terminal.

La masa observada corresponde a la esperada para la proteína recombinante HmuP sin la metionina inicial y la identificación por mapeo peptídico confirma su identidad (datos no mostrados). También se realizaron espectros de Dicroísmo Circular (DC) en el UV cercano y lejano de la proteína para inferir su correcto plegamiento. El espectro de DC observado en el UV cercano coincide con lo esperado para la presencia de los aminoácidos aromáticos tirosina y fenilalanina contenidos en la molécula de HmuP. Los

resultados del DC en el UV lejano indicarían que mayormente cuenta con hojas beta, lo que coincide con la estructura teórica previamente obtenida mediante modelado *in silico* (148).

Para la aproximación por SPR se diseñó una matriz de ADNsc conteniendo las cajas HmuP. Para generar los blancos de ADNdc se diseñaron 5 sondas, complementarias a distintas regiones de la matriz (Fig. 4.13).

Matriz corta:

GATTACGGATTCACTGGGGTGTTGGCCGGGCTTGCTGTTGAGCGGC**GA**ACTCAAGGGCTGGCTGGG
CAGTGCGGAATTG

Sonda 1: CTGCCCAGCCAGCCCTTGAGTTCGCCGCTCAACA**GCAAG**CCCGGC

Sonda 2: CTGCCCAGCCAGCCCTTGAG

Sonda 3: GCTCAACAGCAAGCCCGGC

Sonda 4: CCAGCCAGCCCTTGAGTTCGCCGCTCAACA**GCAAG**CC

Sonda 5: AATTCGCACTGCCAGCCAGCCGCTTGAGTTCGCCGCTCAACA**GCAAG**CCCGGCCAACA

Fig. 4.13. Secuencias diseñadas para la determinación *in vitro* de la unión de HmuP a las cajas HmuP por SPR. En rojo se muestran las cajas RirA, en verde las cajas HmuP y en azul los nucleótidos compartidos por ambas cajas. Subrayados se indican los nucleótidos con secuencia complementaria al ancla. Las secuencias de las sondas son complementarias a la secuencia de la matriz.

Se evaluó entonces la capacidad de la proteína HmuP de unirse a las sondas específicas diseñadas. En la figura 4.14 se esquematiza la técnica.

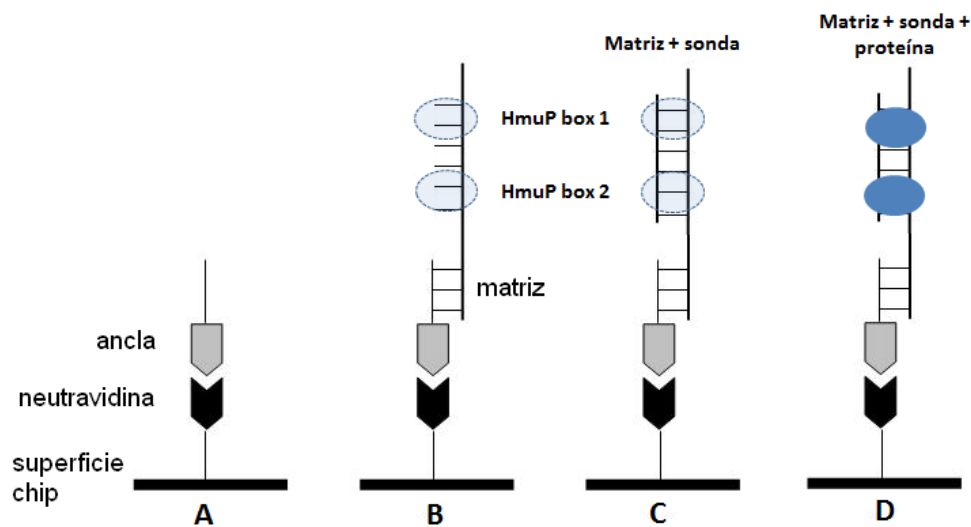


Fig. 4.14. Esquema representativo del procedimiento realizado para determinar la unión de la proteína a las cajas HmuP mediante SPR. En una primera instancia se une a un chip de neutravidina un oligonucleótido de 21 bases biotilado en el extremo 3' denominado ancla (A). En el siguiente paso se une la matriz al ancla, la cual es diseñada con una secuencia complementaria a las 21 bases y el resto de la secuencia complementaria a las sondas que se quieren ensayar (B). Posteriormente se unen las sondas, diseñadas con una secuencia complementaria a la matriz, de manera de generar el blanco deseado en forma de ADN doble cadena (C). Para ensayar la unión, se agrega la proteína y se evalúa la respuesta generada (D).

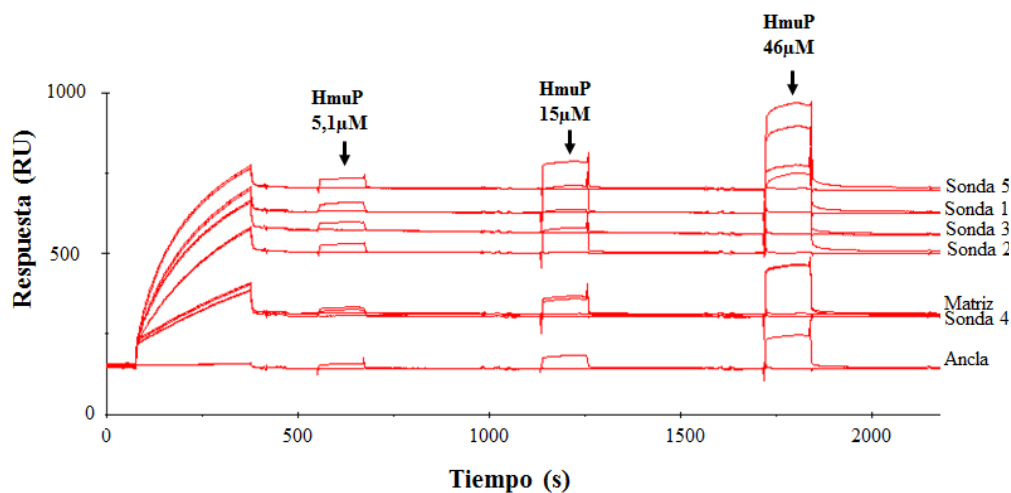


Fig. 4.15. Sensograma obtenido para la interacción de HmuP con las distintas sondas diseñadas. Se ensayó la unión de HmuP a las distintas sondas utilizando 3 concentraciones distintas de HmuP.

Como se muestra en la figura 4.15, el agregado de la proteína genera una respuesta en presencia de la matriz lo cual podría indicar que HmuP es capaz de unirse a la secuencia de ADNsc de la matriz. Otra explicación posible es que la matriz sea capaz de formar

homodímeros u horquillas, generando de esta manera posibles secuencias blanco de ADNdc que la proteína reconocería. De acuerdo a análisis *in silico*, la matriz es capaz de formar de forma espontánea estructuras secundarias estables donde se generarían secuencias de ADNdc parcial, conteniendo las cajas HmuP como se muestra en la Fig. 4.16.

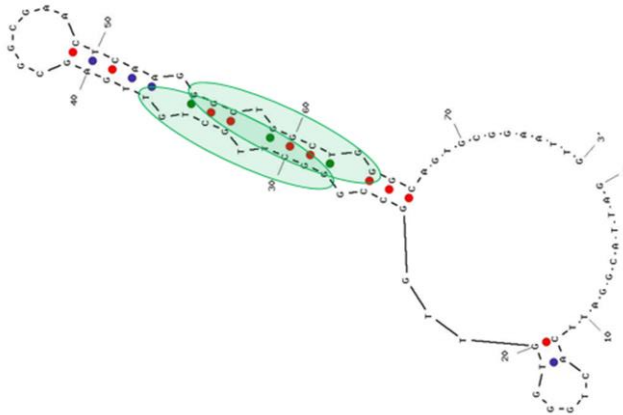


Fig. 4.16. Posible estructura secundaria formada por la matriz. La secuencia de la matriz podría formar una horquilla con un $\Delta G = -7,841 \text{ kcal/mol}^{-1}$ sugiriendo que podría darse espontáneamente. Los círculos verdes muestran las dos cajas HmuP, las cuales quedarían enfrentadas en una estructura de doble cadena parcial.

Se observó que la respuesta generada por la unión de HmuP es mayor en presencia de las sondas que de la matriz y que a su vez existen diferencias en la respuesta dependiendo la secuencia de las sondas (Fig. 4.17).

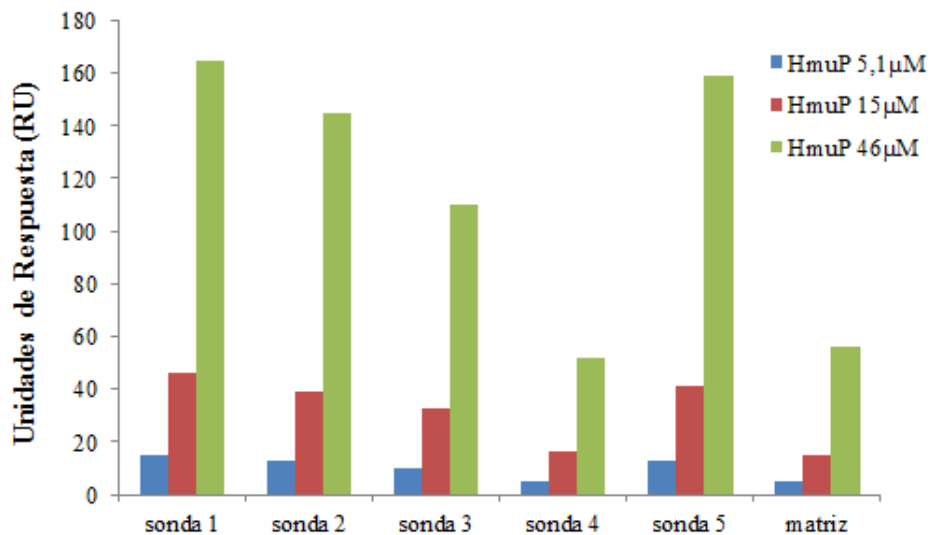


Fig. 4.17. Unión de HmuP a las distintas sondas diseñadas. Las unidades de respuesta fueron normalizadas con los valores de respuesta que presentó la unión de HmuP al ancla.

La mayor respuesta se detectó con las sondas 1 y 5, mientras que al emplear las sondas 2 y 3 la respuesta fue menor (Fig. 4.17). Estos resultados concuerdan con lo esperado, ya que las sondas 1 y 5 contienen las dos cajas HmuP, mientras que las sondas 2 y 3 solamente tienen una caja HmuP, HmuP1 y HmuP2 respectivamente. En este ensayo la sonda 4 presentó una baja unión a la matriz, por lo que sólo se observó la unión de HmuP a la matriz y no se pudo determinar la unión de HmuP a la sonda. Los datos obtenidos a partir de esta aproximación sugieren que HmuP es capaz de unirse a secuencias de ADN doble cadena que contengan las cajas HmuP aunque no se puede descartar la posibilidad que también se una a ADN simple cadena.

Como aproximación complementaria para determinar la unión de HmuP a las cajas HmuP se evaluó la capacidad de la proteína de generar un retardo en la movilidad electroforética de sondas de ADN_{dc} y ADN_{sc}, diseñadas considerando los posibles blancos de unión determinados *in silico*. La sonda diseñada contiene las dos cajas HmuP y la caja RirA2.

Sonda HmuPsc: AGTGTTGGCCGGGCTTGCTGTTGAGCGGCGAACTCAAGGGCTGGCTGGGCA

Como se muestra en la figura 4.18, no se aprecia un retardo significativo en la movilidad electroforética de la sonda. Sin embargo, la presencia de la proteína HmuP tiene como consecuencia una disminución en la concentración de la sonda libre como se observa al comparar los carriles J y F.

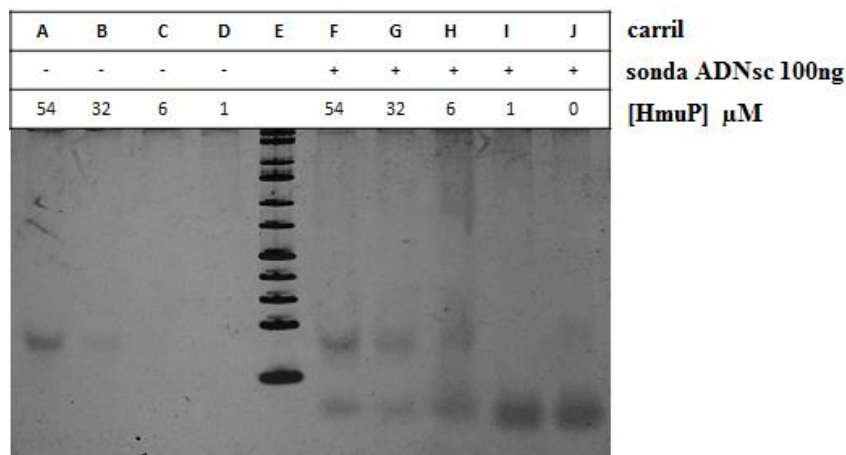


Fig. 4.18. Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA). Se evaluó la capacidad de la proteína de generar un retardo en la movilidad de una sonda de ADN_{sc} que contiene las cajas HmuP, posibles blancos de unión de la proteína.

Se observa también un leve aumento en la intensidad de la banda correspondiente a la proteína HmuP cuando la misma está en presencia del ADNsc (carriles A y F; B y G de Fig. 4.18) que podría indicar la formación de un complejo ADN-proteína. Cuando el ensayo se realizó utilizando como sonda la misma secuencia de nucleótidos pero en ADNdc los resultados fueron similares (datos no mostrados). Si bien estos resultados son preliminares y la resolución del ensayo no es apropiada, la incubación de las sondas (ADNdc o ADNsc) con la proteína HmuP genera una modificación del perfil electroforético de la sonda libre.

***In vivo* HmuP se une a motivos conservados.** Dado que los resultados obtenidos a partir de los geles de retardo de la movilidad electroforética no fueron concluyentes y la posibilidad que existan otros factores implicados en la unión de HmuP al ADN, se planteó una aproximación *in vivo*. Para ello, se generaron anticuerpos específicos anti-HmuP y se pusieron a punto las condiciones de co-inmunoprecipitación. Los ensayos se realizaron con células crecidas en TY o en M9 con el agregado de EDDHA 150 μ M, condiciones donde sabemos que la proteína HmuP activa la expresión del gen *shmR*. Se utilizaron los cebadores 176sense y 176anti que permiten amplificar la región representada en la figura 4.9, la cual contiene todos los motivos conservados.

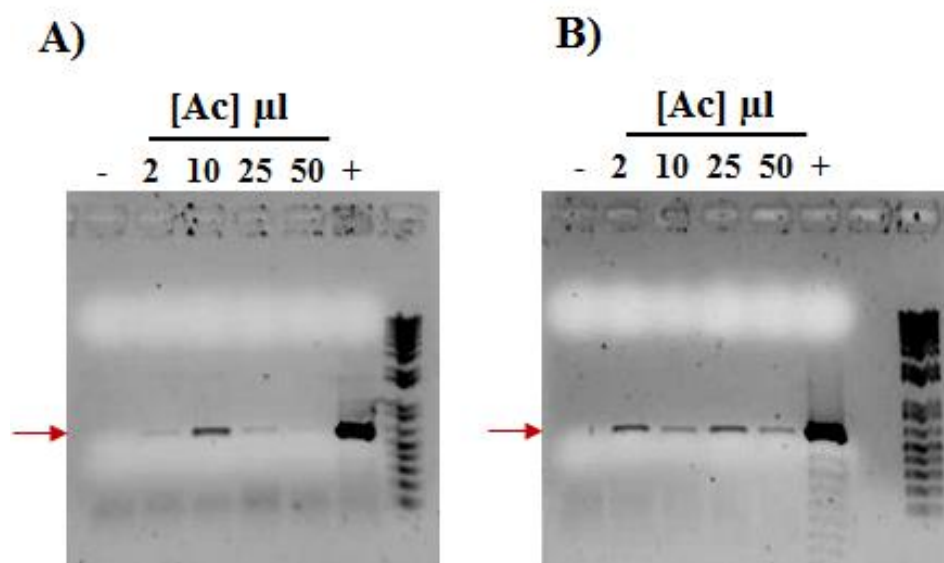


Fig. 4.19. Co-inmunoprecipitación. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos utilizando como molde el ADN que co-precipita con HmuP o con suero pre-inmune (-), o el ADN total previo a la inmunoprecipitación (+). **A)** Células crecidas en medio M9, **B)** Células crecidas en TY.

Como se muestra en la figura 4.19, se observa la amplificación en todas las condiciones independientemente de la cantidad de anticuerpo utilizado para la precipitación y en células crecidas en ambos medios de cultivo. Cuando el suero pre-inmune fue utilizado para la co-precipitación no hubo amplificación, confirmando la especificidad del anticuerpo. Estos resultados sugieren que HmuP es capaz de unirse a la región que contiene las cajas HmuP *in vivo*. También sugieren que el ácido nucleico que reconoce en estas condiciones es un ADNdc.

DISCUSIÓN

En este capítulo avanzamos en la determinación del mecanismo de acción de la proteína HmuP como activador de la expresión del gen *shmR*. Demostramos que en condiciones de baja disponibilidad de hierro existen dos transcritos de *shmR* que se expresan en relación 1:1 y que ambos están reprimidos en condiciones de hierro suficiente o en presencia de hemina en el medio de cultivo. La regulación dependiente de hierro y hemina concuerda con lo previamente reportado (143, 146, 147, 177).

Según lo publicado por el grupo de Anke Becker (178), en la región líder del transcripto 1 de *shmR* también se encuentra un pequeño ARN no codificante (ARNnc) denominado SmelC589, el cual inicia en el sitio -104 y termina luego de las once primeras bases del gen *shmR*. Teniendo en cuenta estos resultados, no podemos descartar que en las condiciones ensayadas también se esté expresando SmelC589 por lo que la cuantificación realizada del transcripto 1 en ese caso, sería la suma del transcripto que contiene *shmR* y del ARNnc. Por consiguiente, en ese escenario estaríamos sobreestimando el valor obtenido para el transcripto 1 con lo cual la relación calculada entre transcritos no sería la real. Para discriminar la expresión del transcripto que contiene *shmR* y de SmelC589 deberíamos utilizar otro juego de cebadores más apropiado para este objetivo.

Mediante análisis *in silico* determinamos la presencia de motivos conservados en la región 5' UTR del gen *shmR*, a los que denominamos cajas HmuP. Mediante la generación

de variantes de estos motivos por sustituciones nucleotídicas demostramos que las cajas HmuP1 y HmuP2 son importantes para la activación dependiente de HmuP del gen *shmR*. Estas modificaciones podrían estar impidiendo la correcta unión del regulador positivo a su secuencia blanco y como consecuencia no habría actividad. La importancia de las cajas HmuP concuerda con los datos obtenidos a partir de la construcción pOT-pr*shmR*(103), la cual provoca una pérdida completa de la expresión al carecer de las dos cajas HmuP, y con la construcción pOT-pr*shmR*(120), que resulta en una disminución en la expresión debido a la presencia de una sola caja HmuP. Es interesante también el hecho que sustituciones en los mismos nucleótidos de la caja HmuP1 (BM4 y BM6) tengan distinto efecto en la expresión del gen *shmR* dependiendo de la naturaleza de las bases sustituidas. Estos resultados y la ubicación de las cajas HmuP en la región 5'UTR podrían sugerir que HmuP ejerce su acción a nivel post-transcripcional y que la estructura secundaria del ARNm es importante para la regulación.

Mediante la generación de variantes en la caja RirA2 determinamos que ésta no es importante para que se reprima la expresión del gen *shmR* en presencia de hierro pero sí para su activación en ausencia de hierro. El hecho que la región corriente arriba del gen *shmR* presente dos cajas RirA, que una de ellas se ubique en la región 5'UTR, que la región intergénica entre *shmR* y el gen *smc02727* sea de 125 pb, y que *smc02727* esté regulado por RirA podría sugerir que el sitio RirA2 actúe en la represión de la expresión del gen *smc02727* y no de *shmR*. Para comprobar esta hipótesis deberíamos fusionar las regiones modificadas delante del gen reportero *gfp-UV* del plásmido pOT en sentido contrario al utilizado en este trabajo, de manera de evaluar la región promotora de *smc02727*. El rol de la caja RirA2 en la activación podría deberse a una función activadora directa del represor RirA, algo que no ha sido descrito hasta el momento. Otra posible explicación podría ser que RirA deba estar unido a su secuencia blanco para reclutar HmuP, sugiriendo la posibilidad de que ambas proteínas interactúen entre sí. También es posible que, dada la cercanía de las cajas HmuP con la caja RirA2, una modificación en la secuencia de RirA2 de alguna manera afecte la unión de la proteína HmuP a sus secuencias blanco.

A partir del análisis del fenotipo obtenido empleando las sustituciones realizadas en la caja RirA1 determinamos que: i) la caja RirA1 es importante para la represión por hierro mediada por RirA del gen *shmR*, lo cual concuerda con lo esperado; ii) la caja RirA1 es importante para la activación en condiciones de baja disponibilidad de hierro. Este último fenotipo se corresponde con lo observado en la construcción pOT-pr*shmR*(139) la cual carece de la caja RirA1. Si bien existen genes regulados positivamente por RirA, la presencia de las cajas RirA está asociada en general a una represión mediada por esta proteína lo que no explicaría este fenotipo. Una explicación más plausible para la ausencia de expresión sería que la maquinaria transcripcional no reconozca el sitio de unión al ADN debido a la ausencia o la modificación del sitio -35 correspondiente al transcritto 1 (que coincide con la caja RirA1). Esto sugeriría a la vez que el transcritto 2 de alguna manera se ve afectado por la ausencia del transcritto 1, ya que si bien contiene los sitios de reconocimiento de la ARN polimerasa correspondientes, no estaría presente. Otra explicación posible estaría asociada a la participación de SmelC589 en la activación de la expresión de *shmR*. La ausencia o la modificación de la secuencia -35 del transcritto 1 no sólo afectarían la expresión del transcritto 1, sino también la del ARNnc (originado a partir del mismo sitio de inicio de la transcripción). Se podría entonces hipotetizar que SmelC589 es necesario para que se produzca la expresión a partir del transcritto 2, o que de alguna manera favorezca la estabilidad del mismo. La participación de SmelC589 en la activación de la expresión de *shmR* también se podría inferir a partir de los resultados obtenidos con la construcción pOT-pr*shmR*(176). Si bien demostramos que el fragmento de 176 pb es suficiente para que el promotor sea activo en condiciones de baja disponibilidad de hierro, éste no alcanza la expresión obtenida en la fusión que contiene un fragmento de 650 pb. La construcción de 176 pb codificaría un ARNnc incompleto y de tener un papel regulatorio el mismo podría verse afectado.

Mediante la evaluación de la expresión del gen *shmR* en distintos contextos génicos pudimos determinar que la proteína RirA no es necesaria para la activación de la expresión del gen *shmR* en condiciones de baja disponibilidad de hierro. Este hecho sugiere que la ausencia de expresión del gen *shmR* asociada a la ausencia o a la modificación de la caja RirA1 no tiene relación con un posible rol activador de la proteína

RirA. De esta manera, la proteína RirA actúa únicamente como represor de la expresión del gen *shmR* en condiciones de disponibilidad de hierro, tal como ha sido previamente reportado (146, 147).

En el caso que la función de HmuP fuese la de inhibir la represión mediada por RirA, era de esperar que la doble mutante carente de HmuP y de RirA presentara una expresión significativa del gen *shmR*, sin embargo no fue ese el fenotipo observado. Esto demuestra que el mecanismo de activación mediada por HmuP no depende de RirA. Asimismo, los resultados de la expresión del gen *shmR* obtenidos en el contexto de la doble mutante indican que la presencia de HmuP es indispensable para que se exprese el gen *shmR* independientemente de la condición de disponibilidad de hierro, con lo cual HmuP no sería responsable de la percepción de hierro en el medio.

Teniendo en cuenta que la expresión de *hmuP* a su vez se encuentra reprimida por RirA en presencia de hierro (146) podemos proponer un modelo en el cual en presencia de hierro, hay muy poca concentración de HmuP y además hay una fuerte represión de la expresión de *shmR* mediada por la proteína RirA actuando sobre la caja RirA1. En ausencia de hierro, se levanta la represión mediada por RirA, se expresa HmuP, y su presencia, junto con las cajas HmuP, se hace necesaria para activar la transcripción o para estabilizar los transcriptos que contienen *shmR*. Este mecanismo podría estar mediado por la unión de la proteína a las cajas HmuP, ya que determinamos mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* que HmuP es capaz de unirse a cadenas de ácidos nucleicos que contengan las cajas HmuP, ya sea que éstas se encuentren en un ADNdc o un ADNsc. En el caso del ADNsc, mediante la formación de estructuras secundarias se podrían generar regiones de ADNdc parciales que contienen los sitios HmuP y la proteína podría reconocer estas regiones de ADNdc.

¿Es la proteína HmuP un activador transcripcional? El único mecanismo de activación descrito para factores de transcripción que se unen a la región 5'UTR está dado por inhibición de la acción de un represor [Revisado por van Hijum *et. al* (179)]. En un principio, la presencia de una caja RirA rodeada por dos cajas HmuP sugería que la activación de la expresión del gen *shmR* mediada por HmuP podría darse al evitar la represión ejercida por RirA. Sin embargo, demostramos que la caja RirA2 no es necesaria

para la represión mediada por RirA y por otro lado demostramos que la proteína HmuP es necesaria para la expresión de *shmR* independientemente de si la proteína RirA está presente o no. No podemos descartar que exista otro factor involucrado en la represión de la expresión de *shmR* y que HmuP actúe sobre éste.

¿Es la proteína HmuP un activador post-transcripcional? La presencia de las cajas HmuP dentro del transcripto abre las puertas a un posible mecanismo de acción mediado por la unión de la proteína HmuP al ARNm. Los mecanismos de activación mediados por proteínas de unión a ARN descritos incluyen [Revisado por Van Assche *et. al* (180)]: i) evitar la acción de ARNasas; ii) modular la estructura secundaria evitando la formación de un terminador transcripcional.

La estabilidad del ARN está determinada por elementos presentes en su secuencia primaria o secundaria, pero puede verse afectada por la acción de ARNasas. La ARNasa E es una endoribonucleasa que actúa sobre ARN simple cadena en su extremo 5' [Revisado por Mackie (181)]. Kaberdin (182) determinó una posible secuencia consenso para la unión de esta proteína, compuesta por 10 nt y la siguiente secuencia parcialmente degenerada: (G,A) (C,A) (X) (G) (G,U,A) * (A,U) (C,U) (X) (C,A) (C,A), donde X puede ser cualquier nucleótido y el asterisco indica el sitio de corte.

Analizando la región 5'UTR del gen *shmR*, pudimos identificar una posible secuencia de unión a la proteína ARNasaE: UGAGU*UCGCC. Interesantemente esta secuencia se encuentra rodeada por las cajas HmuP ya que coincide con parte de la caja RirA2 sugiriendo que la unión de HmuP podría afectar la unión de la ARNasaE y por lo tanto estabilizar el transcripto.

Por otro lado, si bien no se ha determinado la presencia de un terminador transcripcional en la región 5'UTR del gen *shmR*, no podemos descartar que el mecanismo de acción de HmuP implique una modulación de la estructura del ARNm que genere un anti-terminador, favoreciendo de esta manera la generación de transcripto.

La presencia del ARNnc SmelC589 en la región genómica de *shmR* y los resultados obtenidos en este trabajo nos hace plantearnos su posible participación en la regulación de *shmR*. Si bien los ARNnc habitualmente actúan sobre sus ARNm blanco mediante complementariedad de bases, dado que SmelC589 tiene la misma secuencia que la región 5'UTR del gen *shmR* este no sería el caso. Sin embargo, no podemos descartar un

mecanismo alternativo donde la proteína HmuP y SmelC589 actúen en conjunto. Dado que SmelC589 contiene también las cajas HmuP en su secuencia, sería posible que se forme un complejo SmelC589-HmuP el cual sea necesario para la expresión del transcripto de *shmR* o para su estabilidad.

Tabla 4.S1. Bacterias y plásmidos utilizados en este trabajo

Cepa o plásmido	Características relevantes	Referencia
<i>Sinorhizobium meliloti</i>		
SM1021	Derivado estreptomicina resistente de SU47 (Sm ^r)	(183)
HMUP	SM1021 <i>hmuP</i> : : Tn5-1063a (Sm ^r , Nm ^r)	(184)
Δ <i>rirA</i>	SM1021, Δ <i>rirA</i> (Sm ^r)	(185)
HMUP/ Δ <i>rirA</i>	SM1021 <i>hmuP</i> : : Tn5-1063a, Δ <i>rirA</i> (Sm ^r , Nm ^r)	Este trabajo
SM1021 pOT	SM1021 conteniendo el plásmido pOT2 (Sm ^r , Gm ^r)	(174)
RirA pOT	RirA conteniendo el plásmido pOT2 (Sm ^r , Gm ^r)	Este trabajo
SM1021 pOT- <i>prshM</i> R (650)	SM1021 conteniendo el plásmido pOT- <i>prshM</i> R (650) (Sm ^r , Gm ^r)	(174)
SM1021 pOT- <i>prshM</i> R (x)	SM1021 conteniendo el plásmido pOT- <i>prshM</i> R (x) (Sm ^r , Gm ^r)	Este trabajo
SM1021 pOT- <i>prshM</i> R (BMx)	SM1021 conteniendo alguno de los plásmido pOT- <i>prshM</i> R (BMx) donde x es un número del 1-11 que representa las distintas construcciones (Sm ^r , Gm ^r)	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	(186)
BL21DE3(pLysS)	F ⁻ <i>ompT gal dcm hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3) pLysS (Cm ^r)	Novagen
Plásmidos		
pBlueScript SK	Vector de clonado (Ap ^r)	Startagene
pRK2013	Replicon ColE1 con RK2 genes <i>tra</i> . Utilizado para la movilización de plásmidos incP e incQ (Km ^r)	(187)
pGEM-T	Vector de clonado para productos de PCR (Ap ^r)	Promega
pSK <i>hmuP</i>	pBlueScript SK conteniendo la secuencia codificante de <i>hmuP</i> (Ap ^r)	Este trabajo
pET14b	Vector de expresión inducible por IPTG. Confiere una colita 6x His-Tag en el extremo 5' (Ap ^r)	Novagen

pET14b-HmuP	pET14b conteniendo la secuencia codificante de <i>hmuP</i> (Ap ^r)	Este trabajo
pOT2	Plásmido de amplio rango de hospedero con <i>gfp</i> -UV sin región promotora. Derivado del pBBR1 (Gm ^r)	(172)
pOT-pr <i>shmR</i> (x)	pOT2 conteniendo fragmentos de tamaño variable de la región promotora del gen <i>shmR</i> , donde x indica los pb del fragmento clonado (Gm ^r)	Este trabajo
pOT-pr <i>shmR</i> (BM1)	pOT2 conteniendo una región de 520pb corriente arriba de <i>shmR</i> con la sustitución CG-AT en la caja HmuP2 (Gm ^r)	Este trabajo
pOT-pr <i>shmR</i> (BM2)	pOT2 conteniendo una región de 520pb corriente arriba de <i>shmR</i> con la sustitución TC-GA en la caja RirA2 (Gm ^r)	Este trabajo
pOT-pr <i>shmR</i> (BM3)	pOT2 conteniendo una región de 520pb corriente arriba de <i>shmR</i> con la sustitución AG-GT en la caja HmuP1 (Gm ^r)	Este trabajo
pOT-pr <i>shmR</i> (BM4)	pOT2 conteniendo una región de 520pb corriente arriba de <i>shmR</i> con la sustitución CG-AT en la caja HmuP1 (Gm ^r)	Este trabajo
pOT-pr <i>shmR</i> (BM5)	pOT2 conteniendo una región de 520pb corriente arriba de <i>shmR</i> con la sustitución CA-TC en la caja RirA1 (Gm ^r)	Este trabajo
pOT-pr <i>shmR</i> (BM6)	pOT2 conteniendo una región de 520pb corriente arriba de <i>shmR</i> con la sustitución GC-CG en la caja HmuP1 (Gm ^r)	Este trabajo
pOT-pr <i>shmR</i> (BM7)	pOT2 conteniendo una región de 520pb corriente arriba de <i>shmR</i> con la sustitución CA-TC en la caja HmuP2 (Gm ^r)	Este trabajo
pOT-pr <i>shmR</i> (BM8)	pOT2 conteniendo una región de 520pb corriente arriba de <i>shmR</i> con la sustitución CG-AT en la caja RirA2 (Gm ^r)	Este trabajo
pOT-pr <i>shmR</i> (BM9)	pOT2 conteniendo una región de 520pb corriente arriba de <i>shmR</i> con la sustitución GC-CG en la caja HmuP2 (Gm ^r)	Este trabajo
pOT-pr <i>shmR</i> (BM10)	pOT2 conteniendo una región de 520pb corriente arriba de <i>shmR</i> con la sustitución AG-GT en la caja HmuP2 (Gm ^r)	Este trabajo
pOT-pr <i>shmR</i> (BM11)	pOT2 conteniendo una región de 520pb corriente arriba de <i>shmR</i> con la sustitución TG-CA en la caja RirA1 (Gm ^r)	Este trabajo

Tabla 4.S2. Cebadores y sondas utilizados en este trabajo

Determinación del sitio de inicio de la transcripción de *shmR*

GSP2 shmR 5'-ACCTGCTTCTCCTCCAGGGTCTTT -3'

GSP1 shmR 5'-CGCGATGCATTTATCCCTGCGT -3'

qPCR

TSS1 Fw 5'-TTTGAAAGTGTGGCCGGGCTT-3'

TSS1 Rev 5'-CGCAAATAGATCGCCTTGCCCAAT-3'

TSS2 Fw 5'-ACGGTCGTGTGGCATTTCCTT-3'

TSS2 Rev 5'-TTGGCTTGACGGCAGCAATA -3'

Smc03224 Fw 5'-TCTACGGAATAACGCAGG-3'

Smc03224 Rev 5'-GTGTCTCAGTCCCAATGT-3'

Clonado de *hmuP* en pET14b

HmuP-NdeI 5'- GGAATTCCATATGGCGCCGCTGAACCG-3'

HmuP-BamHI 5'-CGGGATCCTACTTGTTCAGAATCAGCTTTGCC-3'

Construcción pOT-prshmR (x)

176sense 5'-CCCAAGCTTGATGGAGATGGAGATCGGACCC-3'

176anti 5'-GCTCTAGACATGGACCAGTCCTTTGAAAGTGTG-3'

139sense 5'-CCCAAGCTTCAATCACACTCATGTTTTCTTATGTGACG-3'

141anti 5'-GCTCTAGAGCTGTTGAGCGGCGAACTC-3'

120anti 5'-GCTCTAGAGGGCTGGCTGGGCAGTG-3'

103anti 5'-GCTCTAGACGGAATTGGGCAAGGCGAT-3'

SPR

Sonda 1 5'-CTGCCAGCCAGCCCTTGAGTTCGCCGCTCAACAGCAAGCCCGGC-3'

Sonda 2 5'-CTGCCAGCCAGCCCTTGAG-3'

Sonda 3 5'-GCTCAACAGCAAGCCCGGC-3'

Sonda 4 5'-CCAGCCAGCCCTTGAGTTCGCCGCTCAACAGCAAGCC-3'

Sonda 5 5'-AATCCGCACTGCCAGCCAGCCCTTGAGTTCGCCGCTCAACAGCAAGCCCGGCCAACA-3'

Matriz larga

GATTACGGATTCACTGGGGTTGAGCATGGACCAGTCCTTTGAAAGTGTTGGCCGGGCTTGCTGTTGAGCG
GCGAACTCAAGGGCTGGCTGGCAGTGCAGGAATTGGGCAAGGCGATCTATTTGCGCCTTATT

Matriz corta

GATTACGGATTCACTGGGGTTGGGCCGGGCTTGCTGTTGAGCGGCGAACTCAAGGGCTGGCTGGG
CAGTGCAGGAATTG

Mutantes puntuales

Upper 5'-CCCAAGCTTCGAGGGTCGCGCCAAAGG-3'

Lower 5'-GCTCTAGAGCGACGATCTTCTTCAGCACGGTC-3'

RirA box1 TG-CA 5'-CCCCTAGATTTATATCAACAATCACACTCATG-3'

RirA box1 CA-TC 5'-GACAATCACACTTCTGTTTTCTTATGTG-3'

HmuP box1 GC-AT 5'-CCGCACTGCCAATCAGCCCTTGAGTTC-3'

HmuP box1 AG-GT 5'-GCACTGCCAGCCGTCCCTTGAGTTCG-3'

RirA box2 TG-CA 5'-CCAGCCAGCCCTCAAGTTCGCCGCTCAAC-3'

RirA box2 CA-TC 5'-CTTGAGTTCGCCGCTTACAGCAAGCCCGG-3'

HmuP box2 GC-AT 5'-GTTCCGCCGCTCAACAATAAGCCCGGCCAACAC-3'

HmuP box2 AG-GT 5'-CCGCTCAACAGCAGTCCCGGCCAACACTTTC-3'

EMSA

Sonda HmuPsc 5'-AGTGTGGCCGGGCTTGCTGTTGAGCGGCGAACTCAAGGGCTGGCTGGGCA-3'

Sonda HmuPrc 5'-TGCCAGCCAGCCCTTGAGTTCGCCGCTCAACAGCAAGCCCGGCCAACACT-3'

CAPÍTULO V: HmuQ y HmuS de *Sinorhizobium meliloti* degradan hemo *in vitro* y participan del metabolismo de hemo *in vivo*

Vanesa Amarelle, Federico Rosconi, Juan Manuel Lázaro-Martínez, Graciela Buldain, Francisco Noya, Mark R. O'Brian y Elena Fabiano (2016). HmuS and HmuQ of *Ensifer/Sinorhizobium meliloti* degrade Heme *In Vitro* and Participate in Heme Metabolism *In Vivo*. BioMetals.

RESUMEN

S. meliloti es capaz de utilizar compuestos hemínicos como fuente de hierro, lo que implica que el hemo debe ser transportado al interior celular y el hierro debe quedar disponible para su uso. El transporte de hemo a través de las membranas está mediado por el receptor de membrana externa ShmR, caracterizado en el Capítulo II, la proteína periplásmica HmuT y el transportador de tipo ABC HmuUV (134). En este capítulo no planteamos conocer cómo se libera el hierro a partir del hemo en el citosol. Mediante análisis *in silico* del genoma de *S. meliloti* 1021 identificamos dos proteínas con homología a proteínas degradadoras de hemo: HmuQ y HmuS. Mediante ensayos *in vitro*, determinamos la capacidad de ambas proteínas de unir hemo en una estequiometría 1:1 y de degradarlo en presencia de un agente reductor. Identificamos los productos de degradación generados, en el caso de HmuQ el isómero biliverdina IX- δ y en el caso de HmuS, los isómeros IX- β y IX- δ . Demostramos que la expresión de los genes *hmuQ* y *hmuS* está regulada por hierro y hemina en forma dependiente de la proteína RirA, y mediante la construcción de mutantes demostramos la importancia de ambas proteínas para el metabolismo de hemo de la bacteria.

OBJETIVO

Identificar enzimas con actividad degradadora de hemo en *S. meliloti* 1021. Evaluar la relevancia de estas enzimas en la fisiología de la bacteria y en la asociación con la planta hospedera.

PRINCIPALES RESULTADOS Y CONCLUSIONES

En este Capítulo nos planteamos identificar y caracterizar proteínas con posible actividad hemo-oxigenasa. Mediante una aproximación *in silico* determinamos que el gen *hmuQ*, que presenta homología con monooxigenasas de antibióticos, y el gen *hmuS*, que presenta homología con proteínas degradadoras de hemo, podrían ser buenos candidatos para codificar para enzimas con actividad hemo-oxigenasa o al menos degradadoras de hemo. Ambas proteínas fueron expresadas de forma heteróloga y se evaluó su capacidad de unir y degradar hemo *in vitro*. Demostramos que ambas proteínas son capaces de unir hemo con una estequiometría y afinidad similar a las reportadas para otras hemo-oxigenasas (1:1). Determinamos que los productos de degradación generados por ambas proteínas presentan distinta regioespecificidad ya que producen distintos isómeros de biliverdina. Mientras que HmuS degrada el hemo produciendo β y δ -biliverdina, HmuQ produce sólo el isómero δ -biliverdina. Evaluamos la expresión en respuesta a hierro y hemo de ambas proteínas *in vivo* y determinamos que la expresión de los genes *hmuQ* y *hmuS* es reprimida por hierro y hemo en forma dependiente de RirA. Evaluamos la importancia de ambas proteínas en la fisiología de *S. meliloti* 1021 en vida libre y en simbiosis. Los resultados obtenidos indican que tanto HmuQ como HmuS son importantes pero no esenciales para la utilización de hemo como fuente de hierro, sugiriendo la presencia de mecanismos alternativos de liberación de hierro a partir de hemo. Demostramos que HmuS es necesaria para tolerar altas concentraciones de hemo. Ninguna de las dos proteínas es necesaria para el establecimiento de una simbiosis efectiva ni para la fijación biológica de nitrógeno. Esto sugiere que el bacteroide no utiliza el hemo como fuente de hierro nutricional o que posee un mecanismo alternativo suficiente para suministrar el hierro hemínico en las etapas simbióticas.

Contribución personal al trabajo. En este trabajo fui responsable de la mayoría de las actividades prácticas. Federico Rosconi realizó parte de las construcciones plasmídicas. Juan Manuel Lázaro Martínez y Graciela Buldain sintetizaron los isómeros de biliverdina. Participé activamente de la interpretación y discusión de los resultados, así como de la redacción del manuscrito.

Financiación. Este trabajo fue financiado por la ANII (FCE_2009_1_2564 y POS_2011_1_555) y PEDECIBA.

HmuS and HmuQ of *Ensifer/Sinorhizobium meliloti* degrade heme in vitro and participate in heme metabolism in vivo

Vanesa Amarelle · Federico Rosconi · Juan Manuel Lázaro-Martínez ·
Graciela Buldain · Francisco Noya · Mark R. O'Brian · Elena Fabiano

Received: 17 February 2016 / Accepted: 19 February 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract *Ensifer meliloti* is a nitrogen-fixing symbiont of the alfalfa legume able to use heme as an iron source. The transport mechanism involved in heme acquisition in *E. meliloti* has been identified and characterized, but the fate of heme once inside the cell is not known. *In silico* analysis of *E. meliloti* 1021 genome revealed no canonical heme oxygenases although two genes encoding putative heme degrading enzymes, *smc01518* and *hmuS*, were identified. *SMc01518* is similar to HmuQ of *Bradyrhizobium japonicum*, which is weakly homologous to the *Staphylococcus aureus* IsdG heme-degrading monooxygenase, whereas HmuS is homolog to *Pseudomonas aeruginosa* PhuS, a protein reported as a heme chaperone and as a heme degrading enzyme. Recombinant HmuQ and HmuS were able to bind hemin with a 1:1

stoichiometry and displayed a K_d value of 5 and 4 μM , respectively. HmuS degrades heme in vitro to the biliverdin isomers IX- β and IX- δ in an equimolar ratio. The HmuQ recombinant protein degrades heme to biliverdin IX- δ only. Additionally, in this work we demonstrate that *humS* and *hmuQ* gene expression is regulated by iron and heme in a RirA dependent manner and that both proteins are involved in heme metabolism in *E. meliloti* in vivo.

Keywords Rhizobia · Heme-oxygenase · Iron metabolism · Heme · *E. meliloti* · Heme-degradation

Introduction

Ensifer meliloti belongs to the group of rhizobia, whose most conspicuous characteristic is the ability to establish symbiotic association with legumes and carry out nitrogen fixation. Rhizobia are normally present in different habitats (e.g. soil, rhizosphere, plant host) where free iron is usually mostly inaccessible due to low solubility, organic binding or immobilization. *E. meliloti* and many other bacteria possess different high affinity iron acquisition systems that share common traits: are maximally expressed when iron is scarce and, involve the presence of TonB-dependent outer membrane receptors and ABC transporters (O'Brian and Fabiano 2010). In *E. meliloti* strain 1021, these systems include the production and

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10534-016-9919-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

V. Amarelle · F. Rosconi · F. Noya · E. Fabiano (✉)
Biochemical and Microbial Genomics Department,
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable,
MEC, Montevideo, Uruguay
e-mail: efabiano@iibce.edu.uy

J. M. Lázaro-Martínez · G. Buldain
CONICET and Faculty of Pharmacy and Biochemistry,
Universidad de Buenos Aires, Aires, Argentina

M. R. O'Brian
State University of New York at Buffalo, New York, USA

51 secretion of the rhizobactin 1021 siderophore, the
 52 hijacking of xenosiderophores (ferrichrome and fer-
 53 rioxamine B) and the acquisition of iron from heme
 54 compounds (Cuiv et al. 2008; Noya et al. 1997;
 55 Persmark et al. 1993). For many years, transport and
 56 degradation of heme as a mechanism to acquire iron
 57 was thought to be exclusive to pathogens. However,
 58 our group discovered that rhizobia and other non-
 59 pathogenic bacteria can use heme or hemoglobin as
 60 iron sources (Noya et al. 1997). Subsequently, genes
 61 involved in heme transport were identified in
 62 *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium legumi-*
 63 *nosarum* and *E. meliloti* (Amarelle et al. 2008;
 64 Battistoni et al. 2002; Nienaber et al. 2001; Wexler
 65 et al. 2001). Notably, while the use of xenosidero-
 66 phores was found to be a variable trait, heme
 67 transport systems are present in all the rhizobia strains
 68 studied so far. Moreover, rhizobia heme transport
 69 systems are present in the chromosome and not in
 70 plasmids, suggesting its importance for the metabo-
 71 lism of these bacteria (O'Brian and Fabiano 2010).

72 The outer membrane heme-receptor involved in the
 73 internalization of heme, hemoglobin and leghe-
 74 moglobin in *E. meliloti* is ShmR (Amarelle et al.
 75 2008; Battistoni et al. 2002) and HmuTUV is the ABC
 76 transporter required, among other functions, for heme
 77 uptake (Cuiv et al. 2008). Expression of the *E. meliloti*
 78 *shmR* gene under iron limitation involves the loss of
 79 the repression exerted by RirA (Rhizobial iron regu-
 80 lator) (Chao et al. 2005; Viguier et al. 2005) as well as
 81 the activation mediated by the HmuP protein (Amar-
 82 elle et al. 2010). RirA is the primary iron-responsive
 83 transcriptional regulator in *E. meliloti*, while the Fur
 84 homolog, renamed as Mur, is mainly involved in the
 85 control of manganese homeostasis (Chao et al. 2005;
 86 Diaz-Mireles et al. 2004; Platero et al. 2004). The fate
 87 of exogenous heme once inside *E. meliloti* cytosol is
 88 unknown.

89 Different enzymes and mechanisms allowing iron
 90 release from heme have been described in bacteria
 91 (Benson and Rivera 2013; Wilks and Ikeda-Saito
 92 2014). In *Corynebacterium diphtheria*, the pioneering
 93 work of Schmitt (1997) and Wilks and Schmitt (1998)
 94 demonstrated that once heme is taken up by bacterial
 95 cell, the tetrapyrrole ring is cleaved by heme oxyge-
 96 nases (HOs) in order to release iron. HOs are
 97 ubiquitous enzymes that degrade heme to biliverdin
 98 IX- α , iron and carbon monoxide, using O₂ and a
 99 reductant such as NADPH cytochrome P450 reductase

100 for oxidation (Benson and Rivera 2013; Montellano
 101 2000). Bacterial heme oxygenases have limited
 102 sequence similarity to each other but are structurally
 103 and mechanistically similar to those of the eukaryotic
 104 HO (Hirotsu et al. 2004; Schuller et al. 1999, 2001;
 105 Wilks and Ikeda-Saito 2014).

106 A novel class of heme-degrading enzyme, IsdG
 107 (Iron-regulated surface determinant) structurally unre-
 108 lated to canonical HOs, was discovered in *Staphylo-*
 109 *coccus aureus* (Reniere et al. 2010; Skaar et al. 2004;
 110 Wu et al. 2005). Homologous to this heme-degrading
 111 enzyme, which belongs to the group of the antibiotic
 112 biosynthesis monooxygenase family (ABM), were
 113 also found in a limited number of gram-positive and
 114 gram-negative bacteria (Ojeda et al. 2012; Park et al.
 115 2014; Puri and O'Brian 2006; Skaar et al. 2006).
 116 Interestingly, some members of this group of enzymes
 117 such as IsdG and IsdI of *S. aureus* and HmoB of
 118 *Bacillus subtilis*, catalyze the degradation of heme to
 119 staphylobilins (15-oxo biliverdin IX- β and 5-oxo-
 120 biliverdin IX- δ) and formaldehyde rather than to
 121 biliverdin and CO (Matsui et al. 2013; Park et al. 2014;
 122 Reniere et al. 2010). In *Mycobacterium tuberculosis*,
 123 the IsdG homolog named MhuD, catalyzes heme
 124 degradation producing a novel heme catabolite,
 125 mycobilin, without the release of CO or formaldehyde,
 126 and retaining the *meso*-carbon of the porphyrin ring as
 127 an aldehyde (Nambu et al. 2013). In *B. japonicum*, two
 128 heme-degrading enzymes belonging to the ABM
 129 group of enzymes, HmuQ and HmuD, have been
 130 described. HmuQ has weak homology with *S. aureus*
 131 IsdG, being biliverdin the heme degradation product
 132 (Puri and O'Brian 2006).

133 The *hemS* (or *hmuS*) gene is annotated as a "heme
 134 degrading enzyme" in the genome databases although
 135 this activity has been demonstrated only for few
 136 bacteria. Particularly, this activity has been reported
 137 for ChuS in *Escherichia coli* and PhuS in *Pseu-*
 138 *domonas aeruginosa* (Lee et al. 2014; Suits et al.
 139 2005). The crystal structure of ChuS from *E. coli*
 140 O157:H7 has been characterized and presents a
 141 different folding structure than that of known mam-
 142 malian and bacterial HOs (Suits et al. 2005). Addi-
 143 tionally, iron release from heme without tetrapyrrole
 144 ring disruption was found in *E. coli* (Letoffe et al.
 145 2009; Turlin et al. 2014).

146 HO function has been associated with cellular
 147 signaling, antioxidant defense and biosynthesis of
 148 light-sensing bilins. HO also participates in the use of

149 heme as nutritional iron source in numerous bacteria
150 (Benson and Rivera 2013; Frankenberg-Dinkel 2004).

151 Here we report the identification and characteriza-
152 tion of two enzymes from *E. meliloti* 1021 with heme
153 degrading activity in vitro: HmuQ and HmuS. We
154 demonstrate that both proteins bind heme, are capable
155 of degrading this compound and produce biliverdin.
156 Moreover we demonstrate that *humQ* and *hmuS* gene
157 expression is regulated by iron and heme, and that both
158 proteins are involved in heme metabolism in *E.*
159 *meliloti* in vivo.

160 Materials and methods

161 Bacteria, plasmids and growth conditions

162 Bacteria and plasmids used in this study are listed in
163 Table 1. *E. coli* strains were grown aerobically at 37 °C
164 in Luria–Bertani (LB) medium or 2xYT medium
165 (Sambrook et al. 1989). *E. meliloti* strains were grown
166 at 30 °C in tryptone-yeast extract medium (TY)
167 (Beringer 1974), defined minimal medium M9 (Sam-
168 brook et al. 1989) supplemented with 6 mM glutamate,
169 200 µM methionine and 1 µM biotin (M9S) or LB
170 medium supplemented with 2.5 mM MgSO₄ and
171 2.5 mM CaCl₂ (LBMC). Low iron conditions were
172 obtained by supplementation with ethylenediamine-di-
173 *o*-hydroxyphenylacetic acid (EDDHA) and high iron
174 conditions were obtained by adding FeCl₃ to the media.
175 The micromolar concentrations of FeCl₃, EDDHA
176 (abbreviated as E) and hemin (Hm) used for each assay
177 are indicated with subscripts When required, 50 µg/ml
178 kanamycin (Km), 100 µg/ml neomycin (Nm), 100 µg/
179 ml streptomycin (Sm), 10 µg/ml gentamycin (Gm) (for
180 *E. coli*), 5 µg/ml gentamycin (for *E. meliloti*), 50 µg/ml
181 ampicillin (Ap) or 25 µg/ml chloramphenicol (Cm) were
182 added to the media.

183 Construction of Sm1021-VAQ and Sm1021-VAS 184 mutants

185 To generate an *hmuQ* mutant (Sm1021-VAQ), a
186 2350 bp DNA fragment containing the *hmuQ* gene
187 and flanking regions was amplified from *E. meliloti*
188 1021 genome using primers 5'-CGTAACCCCAAAC-
189 GAACCTGTCC-3' and 5'-CACCGTGGAAGTGTTCGC
190 TGCT-3'. The fragment obtained was digested with PstI/
191 XhoI and cloned in pBlueScriptSK (pSK) (Stratagene)

obtaining plasmid pSK*hmuQ*. To interrupt the *hmuQ*
gene, the *lacZ*-Gm^r cassette of pAB2001 (Becker et al.
1995) was cloned in the EcoRI site of pSK*hmuQ*
generating pSK*hmuQ*::*lacZ*-Gm^r. Cloning in the correct
orientation was confirmed by restriction mapping. The
hmuQ::*lacZ*-Gm^r fragment was sub-cloned in the
BamHI site of pK18mobSacB (pK18) (Schafer et al.
1994) obtaining plasmid pK18*hmuQ*::*lacZ*-Gm^r which
was then mobilized into *E. meliloti* 1021 by triparental
mating using DH5α-pRK2013 (Figurski and Helinski
1979) as a helper strain. Colonies Sm^r, Gm^r and able to
grow in 15 % (w/v) sucrose (Suc^r) were selected and the
mutation was confirmed by Southern blot hybridization.

To obtain an *hmuS* mutant (Sm1021-VAS), a
2054 bp DNA fragment containing the *hmuS* gene
and flanking regions was amplified from *E. meliloti*
1021 genome using primers 5'-ATAGGATCCAC-
GAAGGTCAACTTGCA-3' and 5'-TCTGGATC-
CAAGGGAATGTTTCGCCCTC-3'. BamHI restrictions
sites are underlined. The amplicon was cloned at the
EcoRV site of pSK obtaining plasmid pSK*hmuS*. An
in-frame deletion of *hmuS* gene was done by inverse
PCR using primers 5'-ATAGATATCGGTGGGGC-
GAATGCT-3' and 5'-ATAGATATCGTTCGCGGCCCT-
GATGGTG-3' and pSK*hmuS* as template. EcoRV
restriction sites are underlined. PCR product was
digested with EcoRV and autoligated in order to
obtain plasmid pSK*hmuS*Δ. The *hmuS* deleted gene
was cloned in the BamHI site of pK18 in order to
generate plasmid pK18*hmuS*Δ which was then mobi-
lized into *E. meliloti* 1021 and Sm1021-VAQ strains
by triparental mating as previously described, in order
to generate Sm1021-VAS mutant and Sm1021-VAQS
double mutant, respectively. Sm^r and Suc^r colonies
were selected and the mutations were confirmed by
PCR.

In order to have the *hmuQ* and *hmuS* genes mutated
in a background where no endogenous siderophore is
produced, mutation in the *rhrA* gene of strain Sm1021-
H38 (Platero et al. 2003) was transduced with phage
ΦM12 (Finan et al. 1984) to the Sm1021-VAQ,
Sm1021-VAS and Sm1021-VAQS mutant strains.
Transductions were done as previously described
(Finan et al. 1984). Briefly, ΦM12 lysates of
Sm1021-H38 mutant were generated by growing
Sm1021-H38 in LBMC, culture diluted to an OD_{600nm}
of 0.3–0.4 in LBMC was incubated with ΦM12 at
30 °C until complete lysis occur. Lysates were filtered
and diluted in order to infect Sm1021-VAQ, Sm1021-

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this work

Strain or plasmid	Relevant characteristics	References
<i>E. meliloti</i>		
Sm1021	Streptomycin derivative of wild-type strain SU47 (Sm ^r)	(Meade et al. 1982)
Sm1021-H38	Sm1021 <i>hrhA</i> ::Tn5-1063a. Siderophore deficient strain (Nm ^r , Sm ^r)	(Platero et al. 2003)
Sm1021-VAQ	Sm1021 <i>hmuQ</i> :: <i>lacZ</i> -Gm ^r (Sm ^r , Gm ^r)	This work
Sm1021-VAS	Sm1021 Δ <i>hmuS</i> (Sm ^r)	This work
Sm1021-VAQS	Sm1021 <i>hmuQ</i> :: <i>lacZ</i> -Gm ^r ; <i>hmuS</i> (Sm ^r , Gm ^r)	This work
Sm1021-H38VAQ	Sm1021-H38 <i>hmuQ</i> :: <i>lacZ</i> -Gm ^r (Nm ^r , Sm ^r , Gm ^r)	This work
Sm1021-H38VAS	Sm1021-H38 Δ <i>hmuS</i> (Nm ^r , Sm ^r)	This work
Sm1021-H38VAQS	Sm1021-H38 <i>hmuQ</i> :: <i>lacZ</i> -Gm ^r ; <i>hmuS</i> (Nm ^r , Sm ^r , Gm ^r)	This work
Sm1021-TR2	Sm1021, Δ <i>rirA</i> (Sm ^r)	(Chao et al. 2005)
Sm1021-TR2VAQ	Sm1021-TR2, <i>hmuQ</i> :: <i>lacZ</i> -Gm ^r (Sm ^r , Gm ^r)	This work
Sm1021 (pOT)	Sm1021 containing plasmid pOT1 (Sm ^r , Gm ^r)	(Platero et al. 2003)
Sm1021-TR2 (pOT)	Sm1021-TR2 containing plasmid pOT1 (Sm ^r , Gm ^r)	This work
Sm1021 (pOT-pr <i>hmuS</i>)	Sm1021 containing plasmid pOT-pr <i>hmuS</i> (Sm ^r , Gm ^r)	This work
Sm1021-TR2 (pOT-pr <i>hmuS</i>)	Sm1021-TR2 containing plasmid pOT-pr <i>hmuS</i> (Sm ^r , Gm ^r)	This work
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	(Hanahan 1983)
BL21DE3(pLysS)	F ⁻ <i>ompT gal dcm hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3) pLysS (Cm ^r)	Novagen
Plasmids		
pBlueScript SK	Cloning vector (Ap ^r)	Startagene
pAB2001	Carrying <i>lacZ</i> -Gm ^r promoter-probe cassette (Gm ^r , Ap ^r)	(Becker et al. 1995)
pRK2013	ColE1 replicon with RK2 <i>tra</i> genes. Used for mobilizing incP and incQ plasmids (Km ^r)	(Ditta et al. 1980)
pK18mobSacB	Broad host range mobilizable vector. Non replicative in <i>E. meliloti</i> , <i>sacB</i> , <i>oriV</i> (Km ^r)	(Schafer et al. 1994)
pSK <i>hmuQ</i>	pBlueScript SK containing <i>hmuQ</i> coding sequence (Ap ^r)	This work
pSK <i>hmuS</i>	pBlueScript SK containing <i>hmuS</i> coding sequence (Ap ^r)	This work
pSK <i>hmuQ</i> :: <i>lacZ</i> -Gm ^r	pBlueScript SK containing <i>hmuQ</i> coding sequence interrupted with <i>lacZ</i> -Gm ^r cassette of pAB2001 (Ap ^r , Gm ^r)	This work
pK18 <i>hmuQ</i> :: <i>lacZ</i> -Gm ^r	pK18mobSacB containing <i>hmuQ</i> coding sequence interrupted with <i>lacZ</i> -Gm ^r cassette of pAB2001 (Km ^r , Gm ^r)	This work
pSK <i>hmuS</i> if	pBlueScript SK containing <i>hmuS</i> coding sequence with an in-frame deletion (Ap ^r)	This work
pK18 <i>hmuS</i> if	pK18mobSacB containing <i>hmuS</i> coding sequence with an in-frame deletion (Km ^r)	This work
pSK-pr <i>hmuS</i>	pBlueScript SK containing the promoter region of <i>hmuS</i> (Ap ^r)	This work
pET14b	IPTG-inducible expression vector with a 6 \times his tag at 5' end (Ap ^r)	Novagen
pET14b-HmuQ	pET14b containing <i>hmuQ</i> coding sequence (Ap ^r)	This work
pET14b-HmuS	pET14b containing <i>hmuS</i> coding sequence (Ap ^r)	This work
pOT1	Wide host range <i>gfp</i> -UV promoter-probe plasmid, derivative of pBBR1 (Gm ^r)	(Allaway et al. 2001)
pOT-pr <i>hmuS</i>	pOT1 containing the promoter region of <i>hmuS</i> (Gm ^r)	This work

241 VAS and Sm1021-VAQS cells previously grown in
242 LBMC to an OD_{600nm} of 0.8. Infection was carried on
243 for 20 min, cells were immediately washed twice with
244 TY and plated on TY supplemented with Sm and Nm.
245 Transductants were re-streaked twice in order to avoid
246 phage contamination.

247 With the aim to obtain the *hmuQ* gene mutated in a
248 background where the global iron regulator *RirA* is not
249 present, the *hmuQ* mutation of Sm1021-VAQ strain
250 was transduced with phage ΦM12 to the *rirA* mutant
251 strain. Transduction was performed as above-men-
252 tioned and Sm^r and Gm^r colonies were selected.

253 Growth assays

254 For colony size experiments, appropriate dilutions of
255 mid-exponential (OD_{620nm} of 0.8–1) cultures grown in
256 TY media were made. Dilutions were spotted with a
257 replica plater in TY solid medium, TY supplemented
258 with 150 μM EDDHA (TYE₁₅₀) or TY supplemented
259 with 150 μM EDDHA and either 1 μM hemin
260 (TYE₁₅₀Hm₁), 10 μM hemin (TYE₁₅₀Hm₁₀) or
261 50 μM hemin (TYE₁₅₀Hm₅₀). Cells were grown
262 5 days at 30 °C and colony sizes were recorded. For
263 growth experiments in liquid media, cells were grown
264 in M9S until mid-exponential phase (OD_{620nm} of
265 0.8–1). 50-fold dilutions were done in M9S liquid
266 medium supplemented with 300 μM EDDHA,
267 300 μM EDDHA and different concentrations of
268 hemin, or 37 μM FeCl₃. Cultures were incubated with
269 shaking at 30 °C and growth was determined as
270 optical density at 600 nm using a Varioskan Flash[®]
271 (Thermo).

272 Expression of *hmuQ* and *hmuS* genes

273 Three different approaches were performed:

274 i. RNA purification and real-time qPCR. Expression
275 of *hmuQ* and *hmuS* genes was assessed by
276 quantitative real-time PCR (qPCR). For RNA
277 isolation, mid-exponential phase cultures of *E.*
278 *meliloti* 1021 grown in M9S supplemented with
279 300 μM EDDHA, 300 μM EDDHA and 1 μM
280 Hm, 300 μM EDDHA and 20 μM Hm or 37 μM
281 FeCl₃ were used. RNA purification was per-
282 formed as described elsewhere (Amarelle et al.
283 2010). Reverse transcription was carried out with
284 total RNA using the iScript cDNA Synthesis Kit

(Bio-Rad). Conditions used for real-time PCR
285 were as mentioned elsewhere (Amarelle et al.
286 2010). Primers used for *hmuQ* quantification were
287 5'-TACTTCGCCATGAACCGTTTCCGT-3' and
288 5'-CGCAGCAGATGGAATTCGATGAAG-3'
289 and for *hmuS* quantification were 5'-AATGGCGG
290 CGTCATCCAGATTCAT-3' and 5'-GCAGATG-
291 CAGATGGAAGGTTTCCGT-3'. The generation of
292 specific PCR products was confirmed by melting
293 curve analysis. Gene *smc03224*, a 16S rDNA, was
294 used as a control using primers 5'-GTGTCTCAGT
295 CCCAATGT-3' and 5'-TCTACGGAATAACG-
296 CAGG-3' previously described (Dominguez-Fer-
297 reras et al. 2006). Reactions without reverse
298 transcriptase addition were used as negative
299 controls. For relative quantification, the standard
300 curve method was performed using *E. meliloti*
301 1021 genomic DNA as PCR template. The data
302 are expressed as the relative starting quantities
303 (SQ) of mRNA normalized to *smc03224* and
304 presented as the average from three independent
305 determinations.

306
307 ii. B-galactosidase transcriptional fusion. The tran-
308 scriptional fusion with the promoterless cassette
309 *lacZ-Gm^r*, generated as a result of Sm1021-VAQ
310 mutant construction, was used also in the case of
311 *hmuQ* gene expression. β-galactosidase activity
312 was assessed in the Sm1021-VAQ mutant and in
313 *rirA/hmuQ* double mutant. *E. meliloti* 1021
314 parental strain and *rirA* mutant strain were used
315 as controls. Mid-exponential phase cultures
316 grown in M9S medium were diluted 100-fold in
317 M9S medium supplemented with either 37 μM
318 FeCl₃, 300 μM EDDHA, 300 μM EDDHA plus
319 1 μM Hm or 300 μM EDDHA plus 20 μM Hm.
320 Mid-exponential phase cultures were used for β-
321 galactosidase assay, performed according to the
322 kinetic protocol described by Thibodeau et al.
323 (Thibodeau et al. 2004). Briefly, cells were lysed
324 with 1 % (v/v) triton X-100, 1 % (w/v) Sarkosyl
325 and 1 mg/ml of lysozyme for 15 min at room
326 temperature. An aliquot of 40 μl was transfer to a
327 Nunc F-bottom 96 well plate and 130 μl of Z
328 buffer (Miller 1972) with 0.27 % (v/v) β-mercap-
329 toethanol was added, and the plate was loaded in a
330 Varioskan Flash[®] (Thermo) for substrate dispens-
331 ing. Plate was incubated 10 min at 30 °C, 30 μl of
332 4 mg/ml *o*-Nitrophenyl β-D-galactopyranoside
333 (ONPG) in Z buffer was added to each well, and

334	the absorbance at 420 nm was recorded every	Each experiment was repeated independently	382
335	2 min over a period of one hour. The maximum	three times.	383
336	rate ($\Delta\text{Abs}/\Delta\text{min}$) was measured and the enzy-		
337	matic activity, expressed as nmoles of o-Nitro-		
338	phenol produced per min per optical density at		
339	620 nm per ml, was determined. Each experiment		
340	was performed independently three times.		
341	iii. GFP-UV promoter fusion. In order to evaluate the		
342	activity of the promoter region corresponding to		
343	<i>hmuS</i> gene, a plasmid-borne transcriptional fusion		
344	with <i>gfp-UV</i> was constructed. For this purpose, a		
345	464 bp DNA fragment containing <i>hmuPSTUV</i>		
346	promoter region was amplified from <i>E. meliloti</i>		
347	1021 genome by PCR using primers 5'-		
348	GGCCTTTCTGATCGAAGAGCACG-3' and 5'-		
349	CAGCGGCCACGGTTTG-3'. The amplicon		
350	was cloned at the EcoRV site of pBSK generating		
351	plasmid pSK- <i>prhmuS</i> . Correct orientation was		
352	confirmed by restriction mapping. A HindIII-XbaI		
353	fragment was subcloned in plasmid pOT1 (All-		
354	away et al. 2001) generating plasmid pOT-		
355	<i>prhmuS</i> . Plasmid pOT- <i>prhmuS</i> and the pOT1		
356	vector were mobilized into <i>E. meliloti</i> 1021		
357	parental and <i>rirA</i> mutant strains by triparental		
358	mating in order to generate Sm1021 (pOT-		
359	<i>prhmuS</i>), Sm1021-TR2 (pOT- <i>prhmuS</i>) and		
360	Sm1021-TR2 (pOT1) strains. Plasmid presence		
361	in the Sm ^r and Gm ^r obtained colonies was		
362	confirmed by PCR. Previously constructed		
363	Sm1021 (pOT1) (Platero et al. 2004) was used		
364	as negative control. Cells were grown until mid-		
365	exponential phase in M9S medium and diluted		
366	100-fold in M9S medium supplemented with		
367	either 300 μM EDDHA, 300 μM EDDHA plus		
368	1 μM Hm, 300 μM EDDHA plus 20 μM Hm or		
369	37 μM FeCl ₃ . Expression of the green fluorescent		
370	protein (GFP-UV) was evaluated in a Varioskan		
371	Flash [®] (Thermo) using a 405 nm excitation filter		
372	and 505 nm emission filter. Quantitative relative		
373	fluorescence (RF) was determined according the		
374	method of Allaway et al. (Allaway et al. 2001)		
375	expressed as fluorescence emission at 505 nm/		
376	OD _{620nm} . RF values calculated for <i>hmuS</i> promoter		
377	fusions in <i>E. meliloti</i> 1021 parental and <i>rirA</i>		
378	mutant strains were normalized to the RF values		
379	obtained for control strains Sm1021 (pOT1) and		
380	Sm1021-TR2 (pOT1) respectively. Results are the		
381	mean of three replicates in the same experiment.		
		Cloning, overexpression and purification of HmuQ	384
		and HmuS	385
		Using pSK <i>hmuQ</i> or pSK <i>hmuS</i> plasmids as template,	386
		<i>hmuQ</i> or <i>hmuS</i> open reading frames were amplified by	387
		PCR. For <i>hmuQ</i> amplification, primers 5'-TCGGATC-	388
		CATCTCAACAGGCCTGAG-3' and 5'-GCAATTC-	389
		TATGTACTTCGCCATG-3' were used. For <i>hmuS</i>	390
		amplification, primers 5'-GGGAATTCATATGAC-	391
		GATGACTGAG-3' and 5'-CGCGGATCCGCCGTT-	392
		CATCATCACTT-3' were used. Restriction sites	393
		included in the primers are underlined. Products	394
		obtained were cloned in the NdeI and BamHI sites	395
		of pET14b (Novagen) generating plasmids pET14b-	396
		HmuQ and pET14b-HmuS. <i>E. coli</i> BL21DE3(pLysS)	397
		(Novagen) strain was transformed with each of these	398
		plasmids. Overexpression and purification of HmuQ	399
		and HmuS recombinant proteins was performed as	400
		described by Friedman et al. (Friedman and O'Brian	401
		2004). Correct overexpression and purification were	402
		confirmed by SDS-PAGE. Fractions containing	403
		HmuQ protein were equilibrated with 50 mM phos-	404
		phate buffer, pH 8.0, containing 300 mM NaCl and	405
		10 % (v/v) glycerol. Fractions containing HmuS	406
		protein were equilibrated with 100 mM phosphate	407
		buffer, pH 8.0, and 10 % (v/v) glycerol. Aliquots of	408
		10 μM solution of proteins were stored at -80 °C for	409
		further use.	410
		Heme binding and heme degradation assays	411
		Heme binding and heme degradation assays were	412
		performed as detailed elsewhere (Puri and O'Brian	413
		2006). To determine the stoichiometry of heme	414
		binding to HmuQ or HmuS, spectra were recorded	415
		after each heme addition. Absorption at 413 nm was	416
		plotted versus the heme concentration.	417
		Heme degradation was determined spectrophoto-	418
		metrically as the decrease in the heme absorbance in	419
		the presence of the protein and either ascorbate or	420
		human NADPH-cytochrome P450 reductase (Cal-	421
		biochem) as reductant. A heme degradation control	422
		without enzyme in similar conditions was also	423
		performed.	424

- 425 Detection of biliverdin as HmuQ or HmuS reaction
426 products
- 427 Heme degradation reactions were made as mentioned
428 above. A mixture without HmuQ/HmuS protein was
429 used as a negative control to monitor heme degrada-
430 tion without enzymes (Hm control). Product extrac-
431 tion and HPLC–MS analysis were performed as
432 described by Puri et al. (Puri and O'Brian 2006).
- 433 Detection of dimethyl-esterified biliverdin isomers
434 as HmuQ or HmuS reaction products
- 435 Product extraction and esterification was performed as
436 described elsewhere (Wang et al. 2004). Dimethyl-
437 esterified HmuQ and HmuS products were dissolved
438 in CH₂Cl₂ and subsequently diluted in 0.1 % (v/v)
439 formic acid in acetonitrile, 1/2 and 1/20 respectively.
440 Samples were loaded in a C₁₈ phenomenex luna
441 analytical HPLC column and a 1 ml/min flow of 0.1 %
442 (v/v) formic acid in acetonitrile was applied. The
443 gradient of acetonitrile (v/v) used was: 30 % acetoni-
444 trile 5 min, from 30 to 80 % 35 min, from 80 to 95 %
445 5 min, 95 % 5 min, from 95 to 30 % 5 min and
446 maintained at 30 % during 5 min.
- 447 Dimethyl-esterified biliverdin isomers of the IX
448 series, obtained as previously described (Bonnett and
449 McDonagh 1973), were suspended in 0.1 % (v/v)
450 formic acid in acetonitrile and used as a standards.
- 451 **Results**
- 452 In silico studies
- 453 We have previously shown that heme is used as an iron
454 source by *E. meliloti* 1021 and that the ShmR outer
455 membrane protein is required for heme transport
456 (Amarelle et al. 2008; Battistoni et al. 2002; Noya
457 et al. 1997). Here, we wanted to identify HO-encoding
458 genes in *E. meliloti* in order to evaluate their roles in
459 iron release from the tetrapyrrole ring. The analysis of
460 *E. meliloti* 1021 genome revealed no canonical HOs in
461 its genome, although two putative genes encoding
462 heme degrading enzymes, *smc01518* and *hmuS*, were
463 identified. SMC01518 showed sequence similarity to
464 the ABM group of enzymes to which IsdG-family of
465 monooxygenases belong. The SMC01518 predicted
466 protein has 50 and 59 % sequence identity (SI) with *B.*
japonicum HmuD and HmuQ, respectively, and 35 %
SI with *S. aureus* IsdG with only 42 % of coverage.
Based on this homology and on data described below,
we renamed *smc01518* as *hmuQ*.
- The *hmuS* gene is annotated as a putative gene
encoding a hemin transport protein in the *E. meliloti*
genome. It is clustered together with genes involved in
heme, Ferrichrome and Ferrioxamine B transport
(*hmuTUV*) and in the regulation of *shmR* expression
(*hmuP*) (Fig. S1) (Amarelle et al. 2010; Cuiv et al.
2008). The HmuS amino acid predicted sequence has a
45 % SI with PhuS of *P. aeruginosa* and 37 % SI with
both ChuS of *E. coli* and HemS of *Yersinia entero-*
colitica. These orthologs of *E. meliloti* HmuS have
been reported to be involved in heme metabolism,
either acting as a heme-degrading enzyme or as a
heme chaperone and heme oxygenase titratable regu-
lator of heme uptake (Lee et al. 2014; O'Neill and
Wilks 2013; Stojiljkovic and Hantke 1994; Suits et al.
2005). Thus, we decided to characterize *hmuQ* and
hmuS of *E. meliloti* in order to assess their roles in
heme degradation.
- HmuQ and HmuS bind one heme per molecule
and catalyze heme degradation
- Recombinant *E. meliloti* HmuQ and HmuS were
overexpressed in *E. coli* as N-terminal His₆-tag fusion
proteins and purified by affinity chromatography. Both
proteins migrated on sodium dodecyl sulfate–poly-
acrylamide gel electrophoresis according to their
calculated molecular masses as his₆-tag fusions,
13,924 Da for HmuQ and 41,441 Da for HmuS
(Fig. S2). Heme binding capability of 10 μM HmuQ
and 10 μM HmuS was assessed spectrophotometri-
cally (Fig. 1a, b respectively). Both proteins displayed
a Soret peak at 413 nm. When proteins were titrated
with increasing amounts of heme, the Soret peak
absorbance increased, showing an inflection point at
10 μM hemin (Fig. 1a, b, insets). The data indicate a
single site of heme binding for each one of the
proteins. Spectroscopic analyses indicate that HmuQ
has a K_d of 5.1 ± 1.2 μM and HmuS a K_d of
4.4 ± 0.7 μM.
- With the aim at determining heme degradation
activity of HmuQ and HmuS, a single turnover assay
was performed in the presence of catalase. Catalase is
required to avoid the possible molecular oxygen-
mediated couple oxidation of heme in the presence of

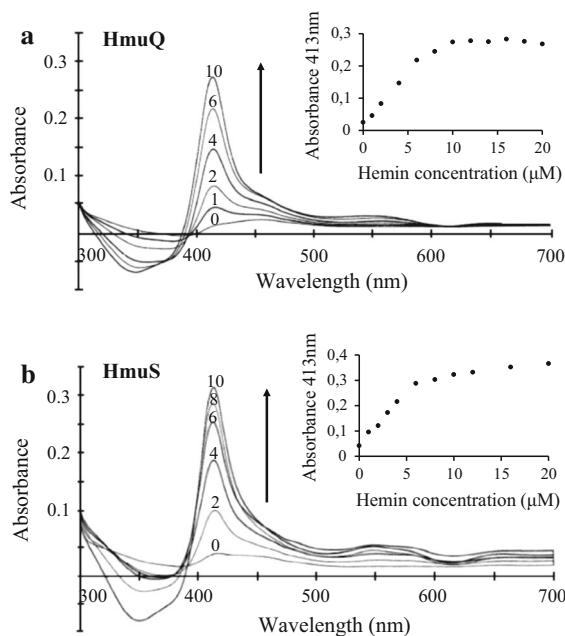


Fig. 1 Hemin binding assays. Absorption spectra of recombinant HmuQ (a) and HmuS (b) proteins in the presence of increasing concentrations of hemin are shown. The sample and reference cuvettes were titrated with increasing hemin concentrations as described in the text, and the spectrum was recorded after each addition. The sample cuvette also contained 10 μM of either recombinant protein HmuQ or HmuS. Numbers over the spectra indicate increasing amounts of hemin (μM). The arrow indicates an increase in absorption with increasing amounts of added hemin. In the insets, the absorption at 413 nm displayed by each protein in the binding assays was plotted against hemin concentrations. Data shown in this figure are from a single experiment representative of at least three independent assays

free H_2O_2 (Sigman et al. 2001). As the *in vivo* electron donor of bacterial heme oxygenases is not known and, taking into account previous works on bacterial heme oxygenases (Frankenberg-Dinkel 2004; Puri and O'Brian 2006; Unno et al. 2007; Zhu et al. 2000), ascorbate or NADPH-cytochrome P450 reductase were used as reductants in the *in vitro* assays. Analysis of HmuQ-heme and HmuS-heme complexes in the presence of ascorbic acid showed a decrease in the Soret peak at 409 nm as a function of time as expected for a heme-degrading enzyme. As shown in Fig. 2a, b, HmuS-heme degradation was faster than HmuQ-heme degradation while heme in the absence of enzymes showed no significant spectral change during the time of the assay (Fig. S3). HmuQ-heme and HmuS-heme complexes were also incubated with NADPH-cytochrome P450 reductase, and in these assays,

degradation of heme was monitored spectrophotometrically with the addition of 10 μM increments of NADPH. A decrease in the Soret peak at 409 nm was also observed; nonetheless, in this condition, no significant differences between HmuQ and HmuS activities were detected (Fig. 2c, d). An increase in a peak at 340 nm was observed corresponding to absorption of NADPH, presumably because the substrate became depleted and the NADPH was not completely oxidized. Taken together, results presented here clearly show that HmuQ and HmuS proteins catalyze heme degradation *in vitro* using either ascorbate or NADPH-cytochrome P450 reductase as reductants.

Biliverdin is produced from HmuQ- and HmuS-catalyzed heme degradation

The HmuQ and HmuS products were analyzed by HPLC-MS. Commercialized biliverdin IX- α was used as a standard (Fig. 3a), and a main peak with a retention time (RT) of 6.48–7.85 was identified. A reaction without enzymes was used as a control and biliverdin was not detected in this reaction (Fig. 3b). Products obtained after HmuQ-catalyzed reaction gave one peak with the same atomic mass as biliverdin ($m/z = 583.2$) (Fig. 3c) with a RT of 5.96–6.16. Degradation products of HmuS displayed two peaks with the same atomic mass to biliverdin (Fig. 3d). These two peaks showed retention times of 6.44–6.64 and 6.05–6.27, demonstrating that HmuS-dependent heme degradation yields two biliverdin isomers. These results indicate that heme degradation products catalyzed by HmuQ and HmuS are biliverdins and suggest that the isomers produced are not biliverdin IX- α . From the relative abundance (RA) of biliverdin isomers obtained, we can conclude that heme degradation catalyzed by HmuS produces 3.3 times more biliverdin than HmuQ when ascorbate was used as reductant.

In order to identify the biliverdin isomers produced by heme degradation by HmuQ and HmuS, the dimethyl esters of biliverdin IX- α , IX- β , IX- γ and IX- δ , obtained by chemical oxidation of Fe(III)-protoporphyrin IX dimethyl ester, were used as standards for the HPLC analysis (Fig. S4a). The dimethyl-esterified derivatives of the products obtained from HmuQ and HmuS catalysis were co-injected with each one of the four isomers. The HmuQ

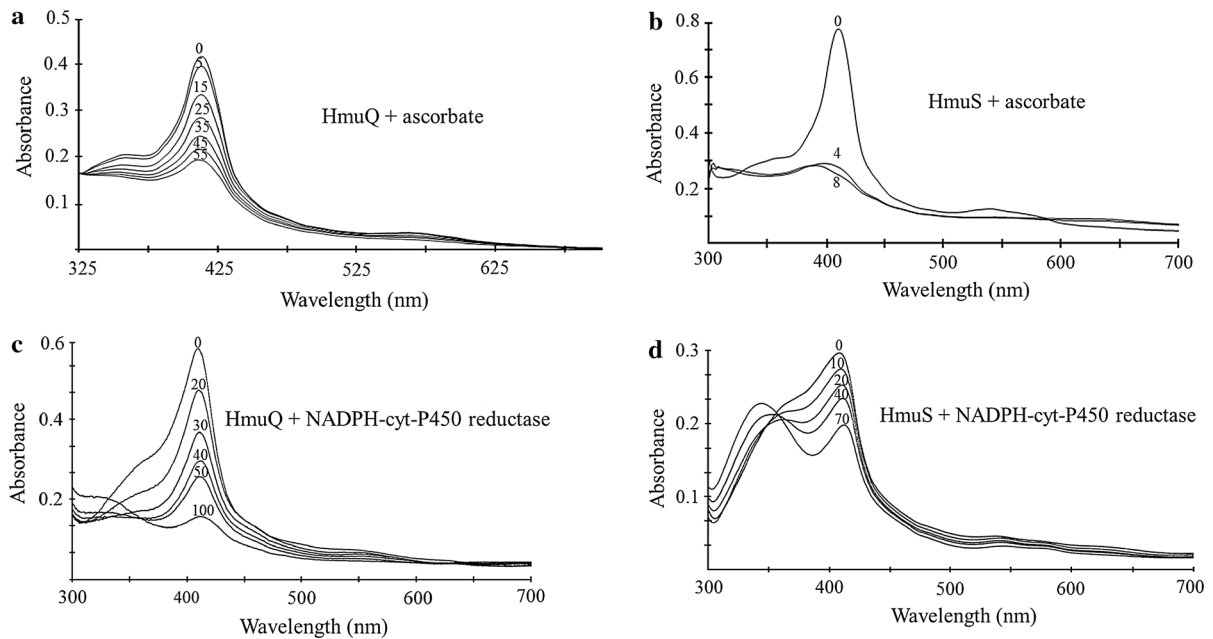


Fig. 2 Spectroscopic analysis of heme degradation by HmuQ and HmuS. Degradation of 8 μM hemin by 10 μM HmuQ (a and c) and 10 μM HmuS (b and d) in the presence of catalase was initiated by the addition of 10 mM ascorbic acid (a and b) or 10 μM NADPH (c and d). Spectra were recorded at different

time intervals. Numbers over the spectra indicate either time (a and b) or NADPH micromolar concentration (c and d). Data shown in this figure are from a single experiment representative of at least three independent assays

578 heme degradation product co-eluted with biliverdin
579 IX- δ dimethyl ester (Fig. S4b). The dimethyl-esteri-
580 fied derivatives of the products obtained from the
581 oxidation of heme by HmuS showed two peaks, one of
582 them eluted together with biliverdin IX- β dimethyl
583 ester and the other with biliverdin IX- δ dimethyl ester
584 (Fig. S4c). Thus, these observations demonstrate that
585 heme is oxidized by HmuQ to produce biliverdin IX- δ
586 while HmuS catalyzes heme oxidation with the
587 production of two different biliverdin isomers (bili-
588 verdin IX- β and biliverdin IX- δ).

589 The expression of *hmuQ* and *hmuS* genes respond
590 to iron and hemin

591 In a previous report, Chao et al. (2004) described
592 *hmuPSTUV* to be iron regulated in a RirA-dependent
593 manner, which is consistent with the presence of a
594 putative RirA box in the promoter region reported by
595 Rodionov et al. (Rodionov et al. 2006). Also, the ORFs
596 *smc01514*, *smc01516*, *smc01517* and *hmuQ* were
597 reported to have a similar RirA-dependent regulation

pattern (Chao et al. 2005). In order to evaluate the role
598 of heme in the regulation of *hmuQ* and *hmuS*, we
599 compared by qPCR the expression of both genes in
600 cells grown in different conditions of iron and heme
601 availability. The *smc03224* gene encoding 16S rDNA
602 was used as a constitutive control gene. As shown in
603 Fig. 4, *hmuQ* and *hmuS* genes were expressed in iron
604 restricted medium and repressed in iron sufficient
605 conditions. Expression of both genes was inversely
606 correlated with the heme concentration of growth
607 medium in presence of the free-iron chelator EDDHA.
608 In addition, *hmuS* gene expression was almost two
609 times higher than *hmuQ* gene expression in medium
610 with 300 μM EDDHA and 1 μM hemin.
611

To determine if *hmuS* regulation depends on RirA,
612 a plasmid-borne *hmuS*-GFP-UV promoter fusion was
613 introduced in the parental and in the *rirA* mutant
614 strains, and GFP activity was measured (Fig. S5a).
615 Repression of *hmuS* by iron or heme was lost in a *rirA*
616 mutant background, demonstrating that this repression
617 is mediated by the RirA protein. A similar regulatory
618 pattern was observed for *hmuQ* (Fig. S5b).
619

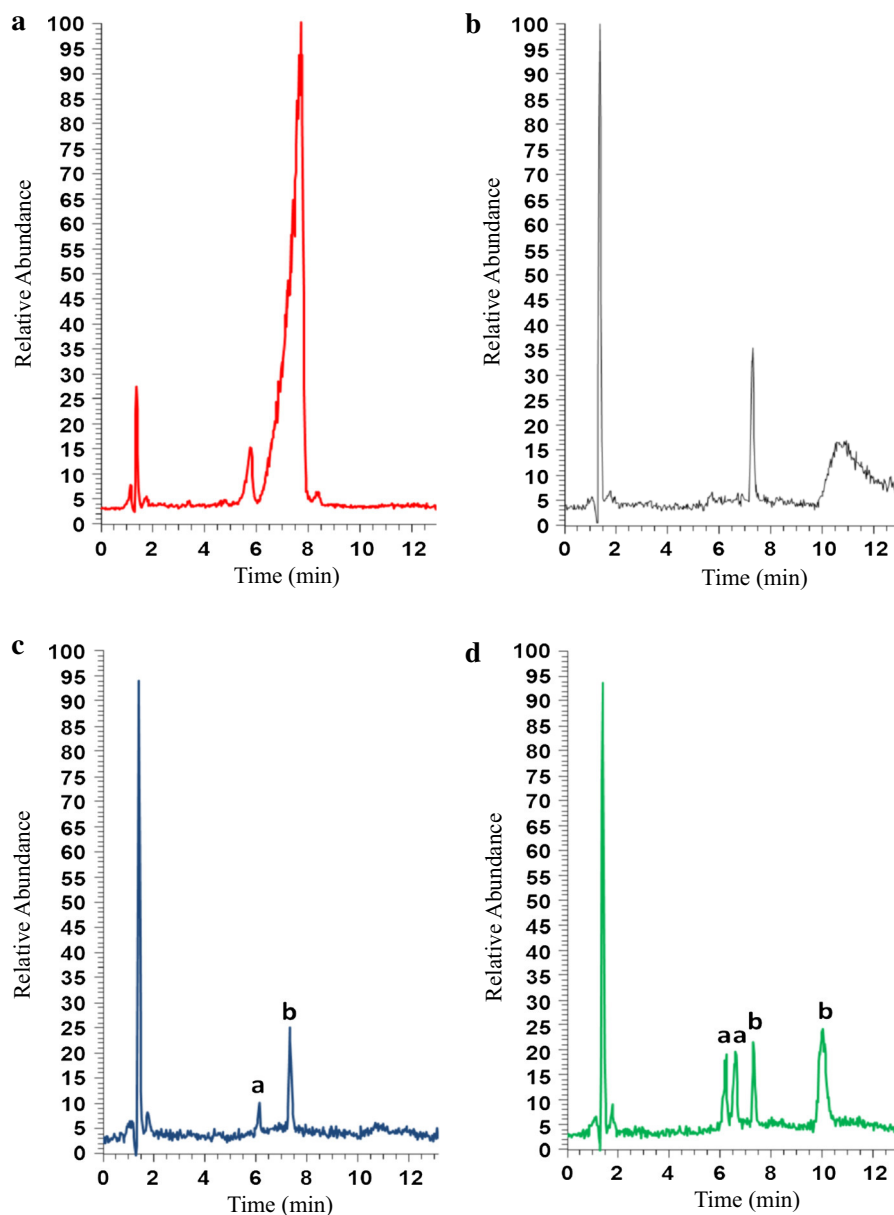


Fig. 3 HPLC–MS analysis of the heme degradation products of HmuQ and HmuS. Purified recombinant HmuQ and HmuS were assayed for heme oxygenase activity. The reaction products were extracted and analyzed by HPLC-MS using biliverdin IX- α as standard. Chromatograms of biliverdin IX- α (a), products from the control reaction without HmuS or HmuQ proteins

(b) and, heme degradation products of HmuQ (c) or HmuS (d) are shown. Letter “a” over the peaks indicates those peaks displaying the same atomic mass than biliverdin IX ($m/z = 583.2$) and letter “b” indicates those peaks with the same atomic mass than peaks present in the control reaction shown in b

620 HmuQ and HmuS are important for heme iron
621 utilization by *E. meliloti*

622 To test the role of HmuQ and HmuS in *E. meliloti*
623 physiology, we constructed isogenic *hmuQ* and *hmuS*

624 mutants (Sm1021-VAQ and Sm1021-VAS, respec- 624
625 tively) and an *hmuQ*, *hmuS* double mutant (Sm1021- 625
626 VAQS). Sm1021-VAS and Sm1021-VAQS mutant 626
627 strains displayed smaller colony sizes than the parental 627
628 strain and the Sm1021-VAQ mutant strain, when 628

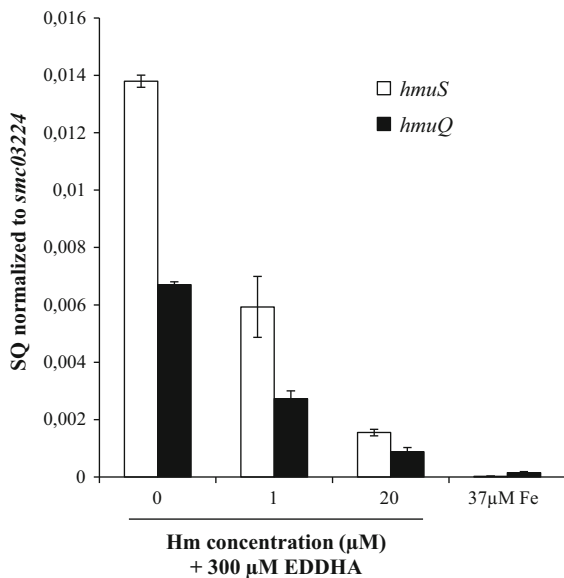


Fig. 4 Effect of iron availability on the expression of *hmuQ* and *hmuS* genes. mRNA from wild type cells grown in M9S minimal media supplemented with either 300 µM EDDHA, 300 µM EDDHA and 1 µM hemin, 300 µM EDDHA and 20 µM hemin or 37 µM FeCl₃ were analyzed by qPCR. *hmuQ* and *hmuS* genes were assessed. The data are expressed as the relative starting quantity (SQ) of mRNA normalized to the housekeeping gene *smc03224*. The data are expressed as the mean of three replicates; error bars, 1 SD

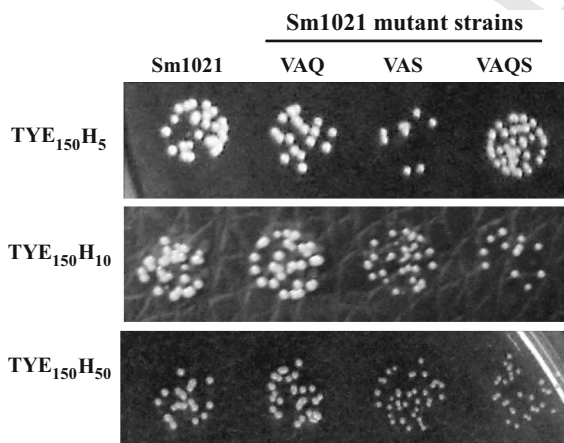


Fig. 5 Growth assays. Cells were grown in TY broth until early stationary phase. Appropriate dilutions were made in TY broth and then plated in TY solid media supplemented with 150 µM EDDHA and either 5, 10 or 50 µM hemin and incubated for 5 days. The experiments were done in triplicate with similar results

10 µM hemin was added to the medium (Fig. 5). In the presence of 50 µM hemin all the strains exhibited smaller colony sizes, indicative of heme toxicity, but the effect was more pronounced in the Sm1021-VAS and Sm1021-VAQS mutant strains, suggesting a role of *hmuS* in heme detoxification.

Taking into account that iron scavenging by the siderophore produced by *E. meliloti* may interfere with heme-dependent phenotypes, growth experiments were also performed using the Rhizobactin 1021-deficient mutant strain, Sm1021-H38, as a genetic background. The *rhrA* mutation present in the Sm1021-H38 mutant strain was transduced to the *hmuQ*, *hmuS* and *hmuQS* backgrounds as detailed in materials and methods section, generating mutant strains Sm1021-H38VAQ, Sm1021-H38VAS and Sm1021-H38VAQS. Addition of hemin in the range of 0.5–50 µM clearly improved Sm1021-H38 growth in iron chelated medium (Fig. 6), with maximal growth observed with 5 µM hemin. The Sm1021-H38VAQ mutant strain, displayed a lower growth than the Sm1021-H38 strain in the range of 1 µM to 30 µM hemin. The Sm1021-H38VAS and the Sm1021-H38VAQS mutants presented a similar growth defect being more pronounced at hemin concentrations in the range of 10–50 µM.

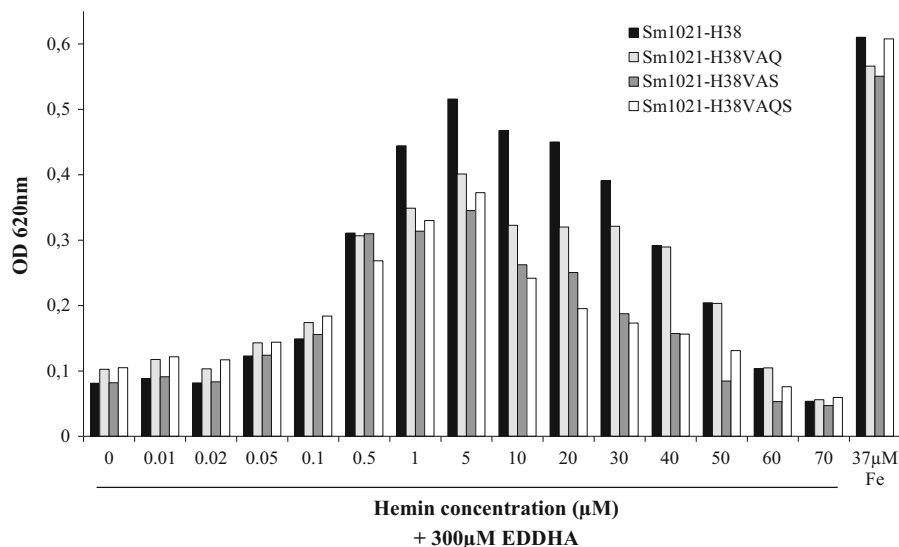
Results obtained here suggest that HmuQ and HmuS participate in heme utilization as an iron source at least when heme is present in the range of 0.5–40 µM. Nonetheless, the triple mutant Sm1021-H38VAQS was still able to grow in iron-chelated medium supplemented with hemin suggesting the presence of a third heme degrading enzyme or of another mechanism involved in iron release from heme.

Moreover, results presented in Fig. 5 together with results shown in Fig. 6 indicate that hemin concentrations higher than 50 µM, impaired bacterial growth of the parental strain (colony size on solid medium and OD_{620nm} in liquid medium) and that this effect is more pronounced in the *hmuS* mutant. These observations suggest a role for HmuS in heme detoxification.

Discussion

In this work, we conducted a biochemical and physiological approach to characterize two

Fig. 6 Growth assays. *E. meliloti* 1021-H38 mutant strain and its derivative mutants *E. meliloti* 1021-H38VAQ, *E. meliloti* 1021-H38VAS and *E. meliloti* 1021-H38VAQS were grown in M9S minimal medium supplemented with 300 μ M EDDHA or 300 μ M EDDHA with increasing concentrations of hemin. M9S minimal medium supplemented with 37 μ M FeCl₃ was used as a positive growth control. The experiment was done independently two times with similar results



673 presumptive heme degrading enzymes in *E. meliloti*
 674 1021. By in vitro assays, we demonstrate that both
 675 HmuQ and HmuS recombinant proteins bind heme
 676 with a 1:1 stoichiometry (Fig. 1) a common feature for
 677 heme oxygenases, IsdG-like monooxygenases and
 678 PhuS homologs. Moreover, HmuQ and HmuS affin-
 679 ities for heme (5 and 4 μ M, respectively) were similar
 680 to those previously reported for other heme oxyge-
 681 nases (Gisk et al. 2012; Skaar et al. 2004). Interest-
 682 ingly, we found that heme is oxidized by *E. meliloti*
 683 HmuS to biliverdin IX- β and biliverdin IX- δ a
 684 characteristic previously reported for HemO (formerly
 685 PigA) a heme oxygenase of *P. aeruginosa* and
 686 probably for *Vibrio cholerae* HutZ (Gisk et al. 2012;
 687 Ratliff et al. 2001; Uchida et al. 2012; Wegele et al.
 688 2004). However, *E. meliloti* HmuS is not homolog to
 689 HemO or to HutZ, but has 45 % SI with the PhuS
 690 protein of *P. aeruginosa*. Different functions have
 691 been reported for *P. aeruginosa* PhuS: acting as a
 692 heme-chaperone for its delivery to HemO, as a HemO
 693 titratable regulator of heme uptake (O'Neill and Wilks
 694 2013), or as a heme degrading enzyme (Lee et al.
 695 2014). Lee et al. (Lee et al. 2014) indicate that in vitro,
 696 heme degradation by PhuS produces verdoheme as an
 697 intermediate in the heme breakdown pathway by
 698 canonical heme oxygenases. Those authors suggest
 699 that in vivo, PhuS might act not only as a heme
 700 trafficking protein, but also as a pre-heme oxygenase
 701 in charge of a first step of heme breakdown,
 702 subsequently delivering the verdoheme for further
 703 processing by HemO. *In vitro* heme-degradation by *E.*

meliloti HmuS, in the presence of ascorbate was very
 efficient being almost all the heme degraded in few
 minutes (Fig. 2b). However, whether HmuS is a heme
 oxygenase, and/or a heme trafficking protein in vivo,
 remains to be determined.

Concerning HmuQ, its closest homologs belong to
 the group of the IsdG family of monooxygenases,
 displaying 59 % SI with the HmuQ from *B. japoni-*
icum. When ascorbate was used as a reductant, heme
 degradation by HmuQ was almost ten times slower
 than HmuS-catalyzed reaction (Fig. 2a, b). Native
 reductant for HmuQ activity is not known and perhaps
 this low performance of HmuQ is due to the fact that
 ascorbate might not be an appropriate reductant. An
 alternative explanation could be that HmuQ heme-
 degrading activity requires a chaperone involved in
 either heme delivery to HmuQ or in facilitating the
 dissociation of the degradation product from the
 protein. The product of heme degradation catalyzed
 by HmuQ is biliverdin IX- δ isomer. This compound
 has also been reported as the heme-degradation
 product of HugZ, a novel heme oxygenase from
Helicobacter pylori, different from the IsdG family of
 heme-degrading monooxygenase (Guo et al. 2008; Hu
 et al. 2011). The finding that different biliverdin
 isomers could be obtained as a result of heme
 degradation, open the question whether these heme
 metabolites have unique bacterial functions.

In order to determine the conditions required for
hmuS and *hmuQ* expression in vivo, we evaluated their
 expression under iron sufficient, iron deprived and

735 iron deprived medium supplemented with different
736 hemin concentrations. We found that both *hmuQ* and
737 *hmuS* genes are repressed by iron and also by hemin.
738 Previously, Rodionov et al. (Rodionov et al. 2006)
739 described the presence of a putative RirA box in the
740 promoter region of *hmuPSTUV* operon and Chao et al.
741 (Chao et al. 2005) demonstrated that *hmuSTUV* and
742 *hmuQ* are iron regulated in a RirA dependent manner.
743 Results presented here are in accordance with these
744 data, and additionally show that *hmuS* and *hmuQ*
745 expression is also repressed by heme in a RirA
746 dependent way.

747 It is considered that HOs are able to provide
748 nutritional iron from heme, although this physiologi-
749 cal role is difficult to establish because the heme
750 oxygenase mutants usually display a subtle phenotype.
751 Data presented here show that in *E. meliloti*, growth of
752 *hmuS* and *hmuQ* mutants was impaired in iron-limited
753 medium supplemented with hemin as iron source
754 (Fig. 6). These data, together with the fact that *hmuS*
755 and *hmuQ* genes are maximally expressed under iron-
756 deprived conditions (Fig. 4), suggest that both HmuQ
757 and HmuS proteins are important for the use of heme
758 as iron source under iron-limiting conditions. Finally,
759 we consider the possibility that HmuS and/or HmuQ
760 might also be involved in counteract heme toxicity.
761 We found that *hmuS* mutant, but not *hmuQ* mutant,
762 was sensitive to heme concentrations higher than
763 50 μM (Figs. 5, 6) indicating that HmuS participate in
764 avoiding heme toxicity.

765 **Acknowledgments** The authors thank Marcela Martínez from
766 the Analytical Platform of IIBCE for her valuable help with the
767 HPLC analysis. This work was partially supported by ANII
768 (FCE_2009_1_2564 and POS_2011_1_555), PEDECIBA-
769 Uruguay, GB and JMLM are supported by UBACyT
770 2013-2016/043BA and MO by NIH Grant R01 GM099667.
771

772 References

773 Allaway D, Schofield NA, Leonard ME, Gilardoni L, Finan TM,
774 Poole PS (2001) Use of differential fluorescence induction
775 and optical trapping to isolate environmentally induced
776 genes. *Environ Microbiol* 3:397–406
777 Amarelle V, O'Brian MR, Fabiano E (2008) ShmR is essential for
778 utilization of heme as a nutritional iron source in *Sinorhi-*
779 *zobium meliloti*. *Appl Environ Microbiol* 74:6473–6475
780 Amarelle V, Koziol U, Rosconi F, Noya F, O'Brian MR,
781 Fabiano E (2010) A new small regulatory protein, HmuP,

modulates haemin acquisition in *Sinorhizobium meliloti*.
Microbiology 156:1873–1882 782
Battistoni F, Platero R, Duran R, Cervenansky C, Battistoni J,
Arias A, Fabiano E (2002) Identification of an iron-regu-
lated, hemin-binding outer membrane protein in *Sinorhi-*
zobium meliloti. *Appl Environ Microbiol* 68:5877–5881 783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841

Becker A, Schmidt M, Jager W, Puhler A (1995) New gen-
tamicin-resistance and lacZ promoter-probe cassettes
suitable for insertion mutagenesis and generation of tran-
scriptional fusions. *Gene* 162:37–39

Benson DR, Rivera M (2013) Heme uptake and metabolism in
bacteria Met ions. *Life Sci* 12:279–332

Beringer JE (1974) R factor transfer in *Rhizobium legumi-*
nosarum. *J Gen Microbiol* 84:188–198

Bonnett R, McDonagh AF (1973) The meso-reactivity of por-
phyrins and related compounds. VI. Oxidative cleavage of
the haem system. The four isomeric biliverdins of the IX
series. *J Chem Soc Perkin 1* 9:881–888

Chao TC, Buhrmester J, Hansmeier N, Puhler A, Weidner S
(2005) Role of the regulatory gene *rirA* in the transcrip-
tional response of *Sinorhizobium meliloti* to iron limitation.
Appl Environ Microbiol 71:5969–5982

Cuiv PO, Keogh D, Clarke P, O'Connell M (2008) The *hmuUV*
genes of *Sinorhizobium meliloti* 2011 encode the permease
and ATPase components of an ABC transport system for
the utilization of both haem and the hydroxamate side-
rophores, ferrichrome and ferrioxamine B. *Mol Microbiol*
70:1261–1273

Diaz-Mireles E, Wexler M, Sawers G, Bellini D, Todd JD,
Johnston AW (2004) The fur-like protein mur of *Rhizo-*
bium leguminosarum is a Mn²⁺-responsive transcriptional
regulator. *Microbiology* 150:1447–1456

Ditta G, Stanfield S, Corbin D, Helinski DR (1980) Broad host
range DNA cloning system for gram-negative bacteria:
construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc*
Natl Acad Sci U S A 77:7347–7351

Dominguez-Ferreras A, Perez-Arnedo R, Becker A, Olivares J,
Soto MJ, Sanjuan J (2006) Transcriptome profiling reveals
the importance of plasmid pSymB for osmoadaptation of
Sinorhizobium meliloti. *J Bacteriol* 188:7617–7625

Figurski DH, Helinski DR (1979) Replication of an origin-
containing derivative of plasmid RK2 dependent on a
plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci U S*
A 76:1648–1652

Finan TM, Hartweig E, LeMieux K, Bergman K, Walker GC,
Signer ER (1984) General transduction in *Rhizobium*
meliloti. *J Bacteriol* 159:120–124

Frankenberg-Dinkel N (2004) Bacterial heme oxygenases.
Antioxid Redox Signal 6:825–834

Friedman YE, O'Brian MR (2004) The ferric uptake regulator
(Fur) protein from *Bradyrhizobium japonicum* is an iron-
responsive transcriptional repressor in vitro. *J Biol Chem*
279:32100–32105

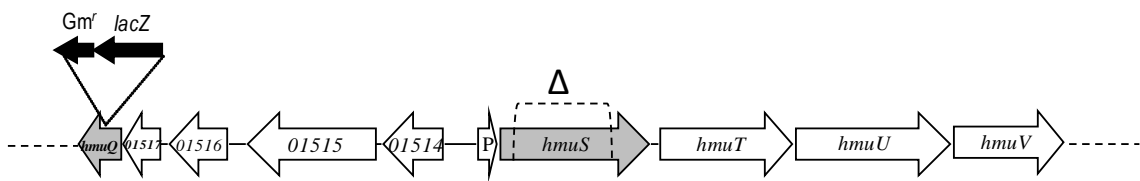
Gisk B, Wiethaus J, Aras M, Frankenberg-Dinkel N (2012)
Variable composition of heme oxygenases with different
regiospecificities in *Pseudomonas* species. *Arch Microbiol*
194:597–606

Guo Y et al (2008) Functional identification of HugZ, a heme
oxygenase from *Helicobacter pylori*. *BMC Microbiol*
8:226

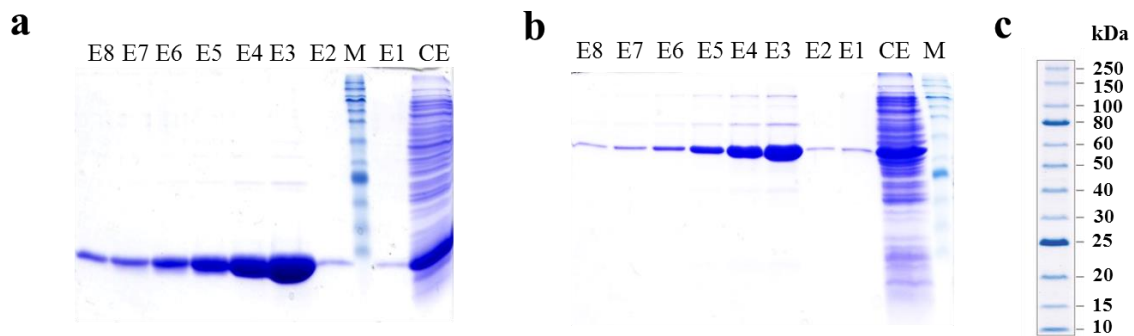
- 842 Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli*
843 with plasmids. *J Mol Biol* 166:557–580
- 844 Hirotsu S et al (2004) The crystal structures of the ferric and
845 ferrous forms of the heme complex of HmuO, a heme
846 oxygenase of *Corynebacterium diphtheriae*. *J Biol Chem*
847 279:11937–11947
- 848 Hu Y et al (2011) Crystal structure of HugZ, a novel heme
849 oxygenase from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem*
850 286:1537–1544
- 851 Lee MJ, Schep D, McLaughlin B, Kaufmann M, Jia Z (2014)
852 Structural analysis and identification of PhuS as a heme-
853 degrading enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol*
854 *Biol* 426:1936–1946
- 855 Letoffe S, Heuck G, Delepelaire P, Lange N, Wandersman C
856 (2009) Bacteria capture iron from heme by keeping tetra-
857 pyrrol skeleton intact. *Proc Natl Acad Sci U S A*
858 106:11719–11724
- 859 Matsui T, Nambu S, Ono Y, Goulding CW, Tsumoto K, Ikeda-
860 Saito M (2013) Heme degradation by *Staphylococcus*
861 *aureus* IsdG and IsdI liberates formaldehyde rather than
862 carbon monoxide. *Biochemistry* 52:3025–3027
- 863 Meade HM, Long SR, Ruvkun GB, Brown SE, Ausubel FM
864 (1982) Physical and genetic characterization of symbiotic
865 and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by
866 transposon Tn5 mutagenesis. *J Bacteriol* 149:114–122
- 867 Miller JH (1972) Experiments in molecular genetics. Cold
868 Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor
- 869 Montellano PR (2000) The mechanism of heme oxygenase. *Curr*
870 *Opin Chem Biol* 4:221–227
- 871 Nambu S, Matsui T, Goulding CW, Takahashi S, Ikeda-Saito M
872 (2013) A new way to degrade heme: the *Mycobacterium*
873 *tuberculosis* enzyme MhuD catalyzes heme degradation
874 without generating CO. *J Biol Chem* 288:10101–10109
- 875 Nienaber A, Hennecke H, Fischer HM (2001) Discovery of a
876 haem uptake system in the soil bacterium *Bradyrhizobium*
877 *japonicum*. *Mol Microbiol* 41:787–800
- 878 Noya F, Arias A, Fabiano E (1997) Heme compounds as iron
879 sources for nonpathogenic *Rhizobium* bacteria. *J Bacteriol*
880 179:3076–3078
- 881 O'Brian MR, Fabiano E (2010) Mechanisms and regulation of
882 iron homeostasis in the rhizobia. In: Cornelis P, Andrews
883 SC (eds) Iron uptake and homeostasis in microorganisms.
884 Caister Academic Press, Caister
- 885 Ojeda JF, Martinson DA, Menscher EA, Roop RM 2nd (2012) The
886 *bhuQ* gene encodes a heme oxygenase that contributes to the
887 ability of *Brucella abortus* 2308 to use heme as an iron source
888 and is regulated by Irr. *J Bacteriol* 194:4052–4058
- 889 O'Neill MJ, Wilks A (2013) The *P. aeruginosa* heme binding
890 protein PhuS is a heme oxygenase titratable regulator of
891 heme uptake. *ACS Chem Biol* 8:1794–1802
- 892 Park S, Kim D, Jang I, Oh HB, Choe J (2014) Structural and
893 biochemical study of *Bacillus subtilis* HmoB in complex
894 with heme. *Biochem Biophys Res Commun* 446:286–291
- 895 Persmark M, Pittman P, Buyer JS, Schwyn B, Gill PR, Neilands
896 JB (1993) Isolation and structure of rhizobactin 1021, a
897 siderophore from the alfalfa symbiont *Rhizobium meliloti*.
898 *J Am Chem Soc* 115:3950–3956
- 899 Platero RA, Jaureguy M, Battistoni FJ, Fabiano ER (2003)
900 Mutations in *sitB* and *sitD* genes affect manganese-growth
901 requirements in *Sinorhizobium meliloti*. *FEMS Microbiol*
902 *Lett* 218:65–70
- Platero R, Peixoto L, O'Brian MR, Fabiano E (2004) Fur is
involved in manganese-dependent regulation of *mntA*
(*sitA*) expression in *Sinorhizobium meliloti*. *Appl Environ*
Microbiol 70:4349–4355
- Puri S, O'Brian MR (2006) The *hmuQ* and *hmuD* genes from
Bradyrhizobium japonicum encode heme-degrading
enzymes. *J Bacteriol* 188:6476–6482
- Ratliff M, Zhu W, Deshmukh R, Wilks A, Stojiljkovic I (2001)
Homologues of neisserial heme oxygenase in gram-negative
bacteria: degradation of heme by the product of the *pigA* gene
of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 183:6394–6403
- Reniere ML et al (2010) The IsdG-family of haem oxygenases
degrades haem to a novel chromophore. *Mol Microbiol*
75:1529–1538
- Rodionov DA, Gelfand MS, Todd JD, Curson AR, Johnston AW
(2006) Computational reconstruction of iron- and man-
gane-se-responsive transcriptional networks in alpha-pro-
teobacteria. *PLoS Comput Biol* 2:e163
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a
laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold
Spring Harbor
- Schafer A, Tauch A, Jager W, Kalinowski J, Thierbach G,
Puhler A (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning
vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18
and pK19: selection of defined deletions in the chromo-
some of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145:69–73
- Schmitt MP (1997) Utilization of host iron sources by *Co-*
rynebacterium diphtheriae: identification of a gene whose
product is homologous to eukaryotic heme oxygenases and
is required for acquisition of iron from heme and hemo-
globin. *J Bacteriol* 179:838–845
- Schuller DJ, Wilks A, de Ortiz Montellano PR, Poulos TL
(1999) Crystal structure of human heme oxygenase-1. *Nat*
Struct Biol 6:860–867
- Schuller DJ, Zhu W, Stojiljkovic I, Wilks A, Poulos TL (2001)
Crystal structure of heme oxygenase from the gram-nega-
tive pathogen *Neisseria meningitidis* and a comparison
with mammalian heme oxygenase-1. *Biochemistry*
40:11552–11558
- Sigman JA, Wang X, Lu Y (2001) Coupled oxidation of heme
by myoglobin is mediated by exogenous peroxide. *J Am*
Chem Soc 123:6945–6946
- Skaar EP, Gaspar AH, Schneewind O (2004) IsdG and IsdI,
heme-degrading enzymes in the cytoplasm of *Staphylo-*
coccus aureus. *J Biol Chem* 279:436–443
- Skaar EP, Gaspar AH, Schneewind O (2006) *Bacillus anthracis*
IsdG, a heme-degrading monooxygenase. *J Bacteriol*
188:1071–1080
- Stojiljkovic I, Hantke K (1994) Transport of haemin across the
cytoplasmic membrane through a haemin-specific
periplasmic binding-protein-dependent transport system in
Yersinia enterocolitica. *Mol Microbiol* 13:719–732
- Suits MD, Pal GP, Nakatsu K, Matte A, Cygler M, Jia Z (2005)
Identification of an *Escherichia coli* O157:H7 heme oxy-
genase with tandem functional repeats. *Proc Natl Acad Sci*
U S A 102:16955–16960
- Thibodeau SA, Fang R, Joung JK (2004) High-throughput beta-
galactosidase assay for bacterial cell-based reporter sys-
tems. *Biotechniques* 36:410–415
- Turlin E, Heuck G, Simoes Brandao MI, Szili N, Mellin JR,
Lange N, Wandersman C (2014) Protoporphyrin (PPIX)

964	efflux by the MacAB-TolC pump in <i>Escherichia coli</i> .	982
965	Microbiol Open 3:849–859	983
966	Uchida T, Sekine Y, Matsui T, Ikeda-Saito M, Ishimori K	984
967	(2012) A heme degradation enzyme, HutZ, from <i>Vibrio</i>	985
968	<i>cholerae</i> . Chem Commun (Camb) 48:6741–6743	986
969	Unno M, Matsui T, Ikeda-Saito M (2007) Structure and catalytic	987
970	mechanism of heme oxygenase. Nat Prod Rep 24:553–570	988
971	Viguiet C, Cuiv PO, Clarke P, O'Connell M (2011) RirA is the	989
972	iron response regulator of the rhizobactin 1021 biosyn-	990
973	thesis and transport genes in <i>Sinorhizobium meliloti</i> . FEMS	991
974	Microbiol Lett 246:235–242	992
975	Wang J et al (2004) Human heme oxygenase oxidation of 5- and	993
976	15-phenylhemes. J Biol Chem 279:42593–42604	994
977	Wegele R, Tasler R, Zeng Y, Rivera M, Frankenberg-Dinkel N	995
978	(2004) The heme oxygenase(s)-phytochrome system of	996
979	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> . J Biol Chem 279:45791–45802	997
980	Wexler M, Yeoman KH, Stevens JB, de Luca NG, Sawers G,	998
981	Johnston AW (2001) The <i>Rhizobium leguminosarum tonB</i>	999
	gene is required for the uptake of siderophore and haem as	1000
	sources of iron. Mol Microbiol 41:801–816	
	Wilks A, Ikeda-Saito M (2014) Heme utilization by pathogenic	
	bacteria: not all pathways lead to biliverdin. Acc Chem Res	
	47:2291–2298	
	Wilks A, Schmitt MP (1998) Expression and characterization of	
	a heme oxygenase (Hmu O) from <i>Corynebacterium diph-</i>	
	<i>theriae</i> . Iron acquisition requires oxidative cleavage of the	
	heme macrocycle. J Biol Chem 273:837–841	
	Wu R, Skaar EP, Zhang R, Joachimiak G, Gornicki P, Sch-	
	neewind O, Joachimiak A (2005) <i>Staphylococcus aureus</i>	
	IsdG and IsdI, heme-degrading enzymes with structural	
	similarity to monooxygenases. J Biol Chem 280:	
	2840–2846	
	Zhu W, Wilks A, Stojiljkovic I (2000) Degradation of heme in	
	gram-negative bacteria: the product of the <i>hemO</i> gene of	
	<i>Neisseriae</i> is a heme oxygenase. J Bacteriol 182:	
	6783–6790	

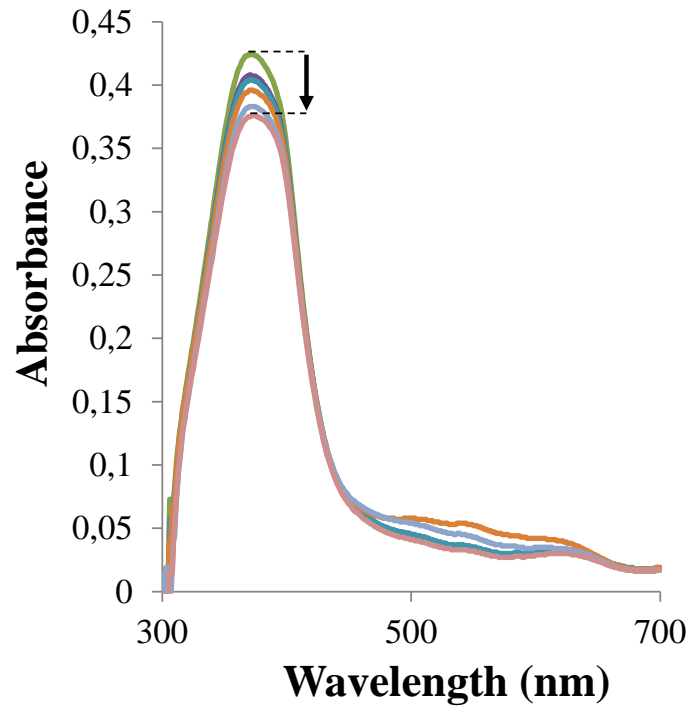
UNCORRECTED PROOF



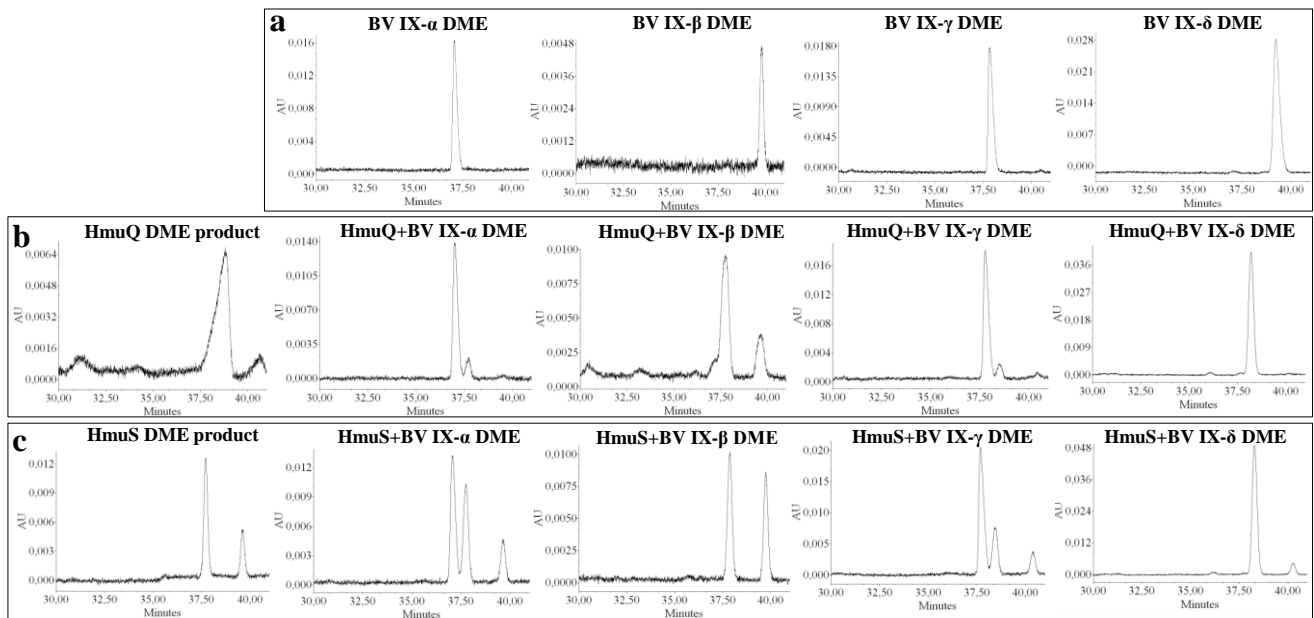
Supplementary Fig. 1 Physical map of the *E. meliloti* 1021 DNA region containing *hmuS* and *hmuQ* genes. The *hmuPSTUV* genes are part of the same transcriptional unit. *hmuP* codes for a regulatory protein that modulates hemin acquisition in *E. meliloti* 1021, and *hmuTUV* was described as the ABC transport system involved in the utilization of hemin, Ferrichrome and Ferrioxamine B in *E. meliloti* 2011. *smc01514*, *smc01515*, *smc01516* and *smc01517* genes are annotated as hypothetical proteins. In-frame deletion (Δ) of *hmuS* gene is represented with a dashed line bracket. Disruption of *hmuQ* gene with *lacZ*-*Gm^r* cassette is represented with black arrows



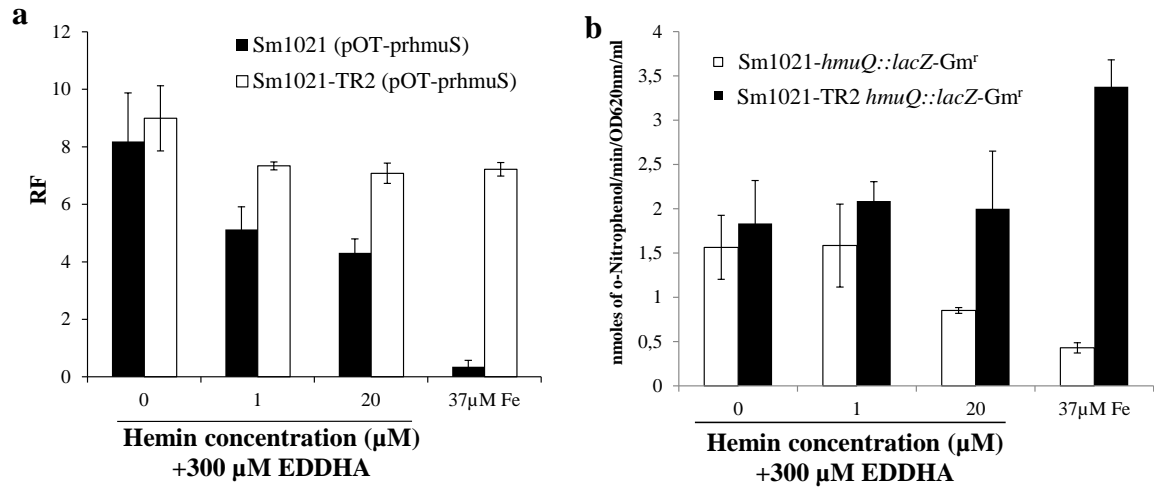
Supplementary Fig. 2 SDS-PAGE of HmuQ and HmuS purification. Products of Ni-NTA purification of HmuQ (a) and HmuS (b) recombinant proteins were separated in 15 % (w/v) acrylamide gel using protein ladder NEB#P7703 (c) as reference and stained with Coomassie blue. E1-E8, elution fractions; CE, crude extract; M, molecular weight marker.



Supplementary Fig. 3 Spectroscopic analysis of heme degradation as a consequence of time. A control reaction containing 8 μM hemin, catalase and 10 mM ascorbic acid was incubated one hour and spectra were recorded at different intervals of time (0 min, 5 min, 10 min, 20 min, 40 min and 60 min). The arrow shows the peak movement from 0 min to 60 min



Supplementary Fig. 4 HPLC chromatograms of dimethyl esters derivatives. Panel (a) shows chromatograms of dimethyl esters derivatives of biliverdin IX isomers. BV IX- α DME: dimethyl ester of biliverdin IX- α , BV IX- β DME: dimethyl ester of biliverdin IX- β , BV IX- γ DME: dimethyl ester of biliverdin IX- γ , BV IX- δ DME: dimethyl ester of biliverdin IX- δ . Panel (b) shows dimethyl esters of HmuQ-heme degradation products (HmuQ DME products) and the co-injection of the dimethyl esters of HmuQ-heme degradation products and the IX isomers. Panel (c) shows dimethyl esters of HmuS-heme degradation products (HmuS DME products) and the co-injection of the dimethyl esters of HmuS-heme degradation products and the IX isomers.



Supplementary Fig. 5 Effect of RirA absence in iron and heme mediated regulation of *hmuS* (a) or *hmuQ* (b). Wild type strain *E. meliloti* 1021 and *rirA* mutant strain, harboring either pOT1 or the GFP-UV *hmuS* promoter fusion (pOT-prhmuS), were used in the assays shown in (a). Data from beta-galactosidase assays of the wild type strain harboring the *hmuQ*::*lacZ*-Gm^r or the *rirA* mutant strain (Sm1021-TR2) harboring the same construction are shown in panel (b). Results are the mean of three replicates, with similar results obtained in at least two independent assays. Error bars, 1SD.

CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN GENERAL

S. meliloti es un microorganismo ampliamente utilizado para el estudio de procesos metabólicos básicos así como para el estudio de los mecanismos involucrados en la interacción microorganismo-hospedero. Dado que muchos procesos del metabolismo microbiano son comunes en distintos sistemas biológicos, la generación de conocimiento obtenida en *S. meliloti* aporta información relevante para el metabolismo microbiano en general pudiendo ser extrapolable a otros sistemas. Por otro lado, los mecanismos implicados en la interacción rizobio-hospedero comparten varios aspectos con los mecanismos involucrados en la interacción patógeno-hospedero. En este sentido, nuestro grupo fue el primero en demostrar que varios rizobios, incluido *S. meliloti*, son capaces de utilizar compuestos que contienen hemo como fuente de hierro, capacidad que se consideraba restringida a patógenos de animales (134). Este es sólo un ejemplo más de que los sistemas presentes en bacterias simbióticas son variaciones de procesos generales encontrados en otras interacciones entre microorganismos y sus hospederos.

Si bien es conocida la importancia de las ferropoteínas en el proceso de fijación biológica de nitrógeno, se sabe muy poco sobre los mecanismos mediante los cuales el rizobio accede al hierro extracelular y las formas en que regula su homeostasis. Se desconocen los sistemas por los cuales la bacteria en su forma simbiótica adquiere este metal en una situación donde depende absolutamente de los nutrientes administrados por la planta.

Esta tesis tuvo como propósito contribuir al conocimiento de los sistemas involucrados en la adquisición de hierro y en el mantenimiento de su homeostasis en *S. meliloti* 1021, centrándose principalmente en la identificación y caracterización de los mecanismos que participan en la captación y utilización de hemina como fuente de hierro nutricional en esta bacteria.

ADQUISICIÓN DE COMPUESTOS HEMÍNICOS

Dado que *S. meliloti* 1021 es capaz de utilizar compuestos hemínicos como fuente de hierro nutricional y que en el nódulo hay una gran abundancia de leghemoglobina, pensar que esta proteína podría ser la fuente de hierro suministrada por la planta resultaba una hipótesis plausible. Nuestro grupo identificó a la proteína ShmR como un posible receptor de compuestos hemínicos, ya que se trataba de una proteína de membrana externa inducida en condiciones de baja disponibilidad de hierro y capaz de unirse a la hemina inmovilizada en agarosa (142). En el Capítulo II evaluamos la importancia del sistema de adquisición de hemina mediado por ShmR para el establecimiento de la simbiosis así como para el crecimiento bacteriano en vida libre. Mediante el análisis fenotípico de una mutante carente de ShmR, demostramos que este sistema es el único funcional para la adquisición de compuestos hemínicos en las condiciones ensayadas y que no es necesario para el establecimiento de una simbiosis efectiva (148). A partir de estos resultados se puede concluir que o bien la leghemoglobina no es la fuente de hierro nutricional en las etapas simbióticas, o existe un sistema alternativo de adquisición de compuestos hemínicos que se expresa en las etapas simbióticas.

La existencia de un sistema alternativo es una hipótesis que nuestro grupo se plantea desde hace un tiempo, dado que a partir del análisis *in silico* del genoma de *S. meliloti* 1021 se encontraron dos posibles receptores de hemo, ShmR y SMC04205 (125). Como ya se mencionó, SMC04205 presenta 31% de identidad de secuencia con HasR de *S. marcescens*, el receptor de membrana del sistema Has, y su contexto genómico presenta sintenia con el operón *has*.

Esto sugiere que *S. meliloti* presenta un repertorio de genes que podrían estar involucrados en la adquisición de hemina mediada por hemóforos aunque hasta el momento no se pudo confirmar cuál es la proteína que actuaría como hemóforo ni si el gen *smc04205* se expresa en alguna condición.

En *S. marcescens* el sistema Hem (sistema por contacto directo como el mediado por ShmR) y el sistema Has son ambos funcionales pero las condiciones en las que se

expresan son distintas. El sistema Has posee una mayor afinidad por hemina que el sistema Hem y requiere de condiciones de limitación de hierro más severas (193).

Mediante una aproximación transcriptómica Ampe y colaboradores (194) habían determinado que el gen *smc04206* (posible hemóforo del sistema Has de *S. meliloti*) se induce en condiciones de limitación de oxígeno y en presencia de luteolina (flavonoide producido y excretado por plantas). Esto podría indicar la participación del sistema Has en los eventos de reconocimiento y asociación con su hospedero, donde es susceptible de encontrar dichas condiciones. Los resultados obtenidos por estos autores indican que el gen *smc04206* no se expresaría en nódulos maduros donde la bacteria ya se diferenció a bacteroide, con lo cual la leghemoglobina no sería la fuente de hierro fisiológica en esas condiciones y su expresión estaría restringida a las etapas iniciales de la formación del nódulo. Lamentablemente, en el diseño del microarreglo empleado por los autores, no se emplearon otros genes del supuesto operón *has* por lo que no se tiene información sobre su posible expresión en esas condiciones. Estas evidencias nos llevan a plantear la posibilidad que el sistema Has de *S. meliloti* sea funcional en condiciones que aún no han sido establecidas. Sería interesante entonces determinar dichas condiciones, evaluar cómo se relaciona con el sistema mediado por ShmR y valorar cuál es la importancia de este sistema en la fisiología de la bacteria en vida libre, en el establecimiento de la simbiosis y en la fijación biológica de nitrógeno. Hasta la fecha el sistema Has sólo ha sido descrito en bacterias patógenas, lo que hace su estudio en *S. meliloti* todavía más interesante.

Otro escenario posible es que la leghemoglobina sea utilizada como fuente de hierro por la bacteria cuando el nódulo comienza a senescer. En estas etapas, se produce una desintegración de los simbiosomas, un decaimiento de las células del nódulo y un aumento de la actividad proteolítica [Revisado por Dupont *et. al* (195)]. Como consecuencia hay una disminución en la concentración de proteínas citosólicas, entre ellas la leghemoglobina. Pero si bien la concentración de leghemoglobina disminuye, estaría disponible para las bacterias debido a la desaparición de la barrera física impuesta por el simbiosoma. Aunque la reversibilidad de la diferenciación de los bacteroides es un tema de debate (196), al menos aquellas bacterias que no sufrieron

diferenciación podrían utilizar la leghemoglobina como fuente de hierro o, en caso de su degradación, utilizar directamente el hemo liberado. Para determinar la participación de ShmR en la fisiología de la bacteria en nódulos senescentes podríamos realizar ensayos de competencia entre la cepa parental y la mutante *shmR*, de manera de evaluar en los distintos estadios del nódulo si existe una colonización y persistencia diferencial entre las dos cepas. Otra posible aproximación indirecta para evaluar su función durante las etapas simbióticas, es mediante la determinación de la actividad de un gen reportero que responda a la expresión del gen *shmR* en los distintos estadios.

UTILIZACIÓN DEL HIERRO HEMÍNICO

Teniendo en cuenta que el hemo es usado como fuente nutricional de hierro, nos propusimos determinar si *S. meliloti* puede liberar el hierro del hemo. Como se muestra en el Capítulo V identificamos y caracterizamos dos proteínas con actividad hemo-oxigenasa, HmuQ y HmuS, que no pertenecen al grupo de las hemo-oxigenasas “clásicas”. Si bien se determinó que ambas proteínas participan de la utilización de hemo como fuente de hierro, demostraron no ser esenciales para el crecimiento bacteriano. Este hecho sugiere la presencia de un mecanismo adicional que permita la liberación del hierro hemínico.

Además de la actividad hemo-oxigenasa, se ha reportado en *E. coli* la liberación de hierro hemínico mediante enzimas con actividad ferroquelatasa reversa (197). Estas enzimas (YfeX y EfeB) llevarían a cabo el proceso de liberación de hierro manteniendo el anillo tetrapirrólico intacto, en un proceso inverso a la incorporación de hierro mediado por las ferroquelatasas (197). La función adjudicada a estas proteínas es bastante controversial, ya que se trata de una función nueva que sólo se ha determinado en ese trabajo en particular. En *S. meliloti* no existen homólogos a YfeX y EfeB. Estos resultados dejan planteada la interrogante si existe otra proteína involucrada en la liberación de hierro hemínico en esta bacteria.

Otra posibilidad sería que la bacteria utilice el hemo *per se* y que no sea necesaria, pero sí más beneficiosa, la liberación de hierro. Quizá HmuQ y HmuS contribuyan liberando un porcentaje del hierro hemínico y el hemo remanente sea incorporado directamente

a las hemoproteínas. El menor crecimiento que presenta la cepa parental en medios con hemina en comparación con el crecimiento en un medio con hierro y el hecho que en ausencia de HmuQ y HmuS el crecimiento en presencia de hemina se vea disminuido podrían avalar esta teoría.

La mayoría de las HO producen el isómero α -biliverdina como consecuencia de su mecanismo de acción. Nuestros resultados muestran que HmuS produce *in vitro* los isómeros β -biliverdina y δ -biliverdina, propiedad que hasta el momento sólo ha sido reportada para PigA de *P. aeruginosa* (75). Por otro lado, HmuQ produce el isómero δ -biliverdina lo cual ha sido reportado únicamente para HugZ de *H. pylori* (89). El hecho que *S. meliloti* posea dos HO con distinta regioespecificidad que se expresan en las mismas condiciones de disponibilidad de hierro resulta interesante desde el punto de vista de la posible función de estos isómeros en la fisiología de la bacteria.

La liberación de biliverdina como producto de la reacción de ambas enzimas, indica que el otro producto generado es el CO. Es bien conocido que el monóxido de carbono puede tener una función fisiológica como molécula señalizadora en mamíferos [Revisado por Gullotta *et al.* (198) y por Kim *et al.* (199)]. Si bien en bacterias se desconoce si el CO endógeno actúa como molécula señal, en *E. coli* se ha reportado que la presencia exógena de esta molécula induce cambios globales a nivel transcripcional que incluyen la modificación de la expresión de reguladores transcripcionales, de genes involucrados en el ciclo de Krebs, en la adquisición de hierro y en el metabolismo de aminoácidos, entre otros (200). *M. tuberculosis*, que habita en los pulmones donde el CO está continuamente presente, es capaz de tolerar altas concentraciones de CO y modular la expresión génica en respuesta a variaciones en la concentración de esta molécula. El CO induce un estado de dormancia en este microorganismo que puede permanecer latente en macrófagos por largos períodos [Revisado por Zacharia *et al.* (201)]. Se ha postulado que en *M. tuberculosis* la no producción de CO como consecuencia de la degradación de hemo por la hemo-oxigenasa MhuD (87) podría ser de vital importancia en un microorganismo que debe ser capaz de percibir y responder al CO exógeno.

Se desconoce la implicancia que podría tener la formación de CO endógeno en *S. meliloti*.

Teniendo en cuenta que la proteína HmuQ pertenece a la familia de proteínas degradadoras de hemo del tipo IsdG y que en todos los casos descritos se ha demostrado que no hay liberación de monóxido de carbono como consecuencia de la degradación del anillo, sino que éste es retenido en forma de aldehído (87) o liberado en forma de formaldehído (202), sería posible que HmuQ actúe de forma similar y que además de biliverdina se produzca un cromóforo adicional diferente. Si bien observamos la aparición de una coloración diferente a la de la biliverdina como producto de la reacción (datos no mostrados), a partir de nuestra aproximación no se identificaron otros posibles productos además de la δ -biliverdina.

REGULACIÓN MEDIADA POR HmuP

Otro objetivo de esta tesis, fue la búsqueda de reguladores involucrados en la expresión del receptor de hemina ShmR. En el Capítulo III identificamos un regulador positivo de la expresión de *shmR*, la proteína pequeña HmuP. Demostramos en el Capítulo IV que aún en ausencia de RirA, donde no existe represión por hierro, la proteína HmuP es necesaria para que se dé la activación de la expresión del gen *shmR*. Este resultado implica que la expresión del gen *shmR* es regulada negativamente por RirA y positivamente por HmuP y que esta última es necesaria para la activación de la expresión, independientemente de la disponibilidad de hierro.

Muchos de los sistemas de adquisición de hierro de alta afinidad, como lo es el sistema mediado por ShmR, además de estar sujetos a represión mediada por los reguladores globales de respuesta a hierro presentan un segundo nivel de regulación. Esta regulación generalmente involucra una proteína activadora, específica para cada sistema, que permite la expresión de ciertos genes en condiciones limitantes en hierro. Por ejemplo, en *S. meliloti*, el mecanismo de síntesis y adquisición del sideróforo rizobactina 1021 está sujeto a una doble regulación de este tipo: la represión ocasionada por la proteína RirA en presencia de hierro y la activación mediada por RhrA cuando el hierro es escaso (138). RhrA es un regulador transcripcional del tipo AraC, los cuales han sido reportados en otras bacterias también como activadores de sistemas de alta afinidad por hierro

(154–158). También se ha demostrado la activación de este tipo de sistemas por factores σ extracitoplasmáticos, mediados por un sistema σ /anti- σ y un receptor transductor de la señal externa (63, 146, 167–169). Ejemplos de estos activadores son Fecl y HasI que activan la adquisición de dicitrato férrico por el sistema *fecABCDE* y de hemo por el sistema Has, respectivamente (63, 168).

La identificación de HmuP como activador de la expresión del gen *shmR* junto con los reportes de activadores de sistemas de alta afinidad por hierro, sugieren que para la correcta expresión de estos sistemas es necesario levantar la represión mediada por RirA pero además la acción de un activador específico.

El Capítulo IV tuvo como objetivo determinar el mecanismo de acción de HmuP. Identificamos la presencia de motivos conservados en la región 5'UTR de *shmR*, a los que llamamos cajas HmuP, y demostramos que HmuP es capaz de unirse *in vitro* e *in vivo* a secuencias de ADN (simple cadena o doble cadena) que contengan estos motivos. Esto sugiere que el mecanismo de regulación de HmuP estaría mediado por la unión de la proteína a sus secuencias blanco.

¿Es la proteína HmuP un activador transcripcional?

En las bases de datos hay 3 modelos resueltos para proteínas homólogas a HmuP (entradas en PDB 4ynx, 2jra y 2loj) y sólo uno de ellos publicado, el de la proteína YdiE de *E. coli* (203). Para YdiE se determinó que cristaliza en forma de dímero en la región C-terminal a través de una interfase altamente hidrofóbica (Fig. 6.1B) (203). En el Capítulo III demostramos que residuos conservados presentes en el extremo C-terminal de HmuP son necesarios para la actividad de la proteína, lo que podría indicar que HmuP actúa en forma de dímero (174).

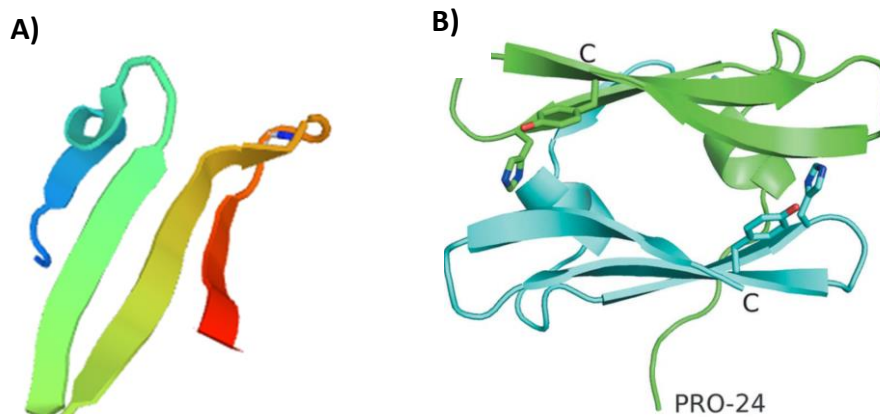


Fig. 6.1. Predicción *in silico* de posible estructura de HmuP. **A)** Mediante la utilización del programa Swiss-Model se modeló la estructura de HmuP por comparación con la base de datos de proteínas con estructura conocida. El modelo fue construido en base a la proteína YdiE de *E. coli* (entrada en PDB 4ynx). En azul se muestra el N-terminal y en rojo el C-terminal. Presenta 3 hojas β antiparalelas una pequeña hélice α en el N-terminal. **B)** YdiE forma un homodímero. Las α -hélices se muestran como espiral y las hojas β como flechas. Cada monómero se ejemplifica con un color (verde o celeste). Los residuos conservados Tyr49 e His44 se muestran con varillas. El modelo fue determinado desde el residuo de Pro24, ya que el N-terminal no se ordena. C, extremo C-terminal. Tomada de Nishimura *et al.* (203).

Su estructura compuesta casi exclusivamente por tres hojas beta es una estructura inusual para reguladores transcripcionales bacterianos. La unión al ADN de los factores de transcripción bacterianos está, en su mayoría, mediada por un motivo hélice-vuelta-hélice [Revisado por Luscombe *et al.* (204)]. Si bien existen otros motivos, la unión a ADN a través de hojas β en bacterias se ha descrito solamente para la proteína MetJ. En *E. coli*, MetJ actúa como regulador de la biosíntesis y transporte de metionina utilizando S-adenosil metionina (SAM) como co-represor (205). MetJ forma un dímero que en presencia de SAM reconoce secuencias de 8 pb denominadas metbox o cajas met. Las cajas met son secuencias palindrómicas consenso que ocurren en clusters de entre dos y cinco secuencias en tandem en las regiones operadoras de los genes regulados por MetJ (205).

La unión al ADN mediada por hojas β también ha sido reportada para las proteínas Int y Arc de bacteriófagos y para la proteína AtERF1 de plantas (206–209). Arc actúa como represor y su mecanismo de acción implica la unión cooperativa de dos dímeros a una secuencia palindrómica de 21 pb en la región operadora. Cada uno de los dímeros se une

al surco mayor del ADN a través de dos hojas β antiparalelas, una de cada monómero (206). Las proteínas Int y AtERF1 ambas se unen al surco mayor del ADN mediante un motivo compuesto por tres hojas β antiparalelas, como podría ser el caso de HmuP. La proteína Int es una integrasa del bacteriófago λ que cataliza la inserción y escisión del genoma viral en el cromosoma de *E. coli*, y AtERF1 es un factor de transcripción de *Arabidopsis* que responde a etileno (207, 208).

AtERF1 pertenece a la familia de factores de transcripción AP2/ERF que incluye aproximadamente 120 miembros y todos ellos presentan un dominio conservado de aproximadamente 60 aminoácidos que consiste en tres hojas β antiparalelas y una hélice α . Este dominio está involucrado en la unión de los factores transcripcionales a sus secuencias blanco (Fig. 6.2) [Revisado por Yamasaki *et al.* (209)].

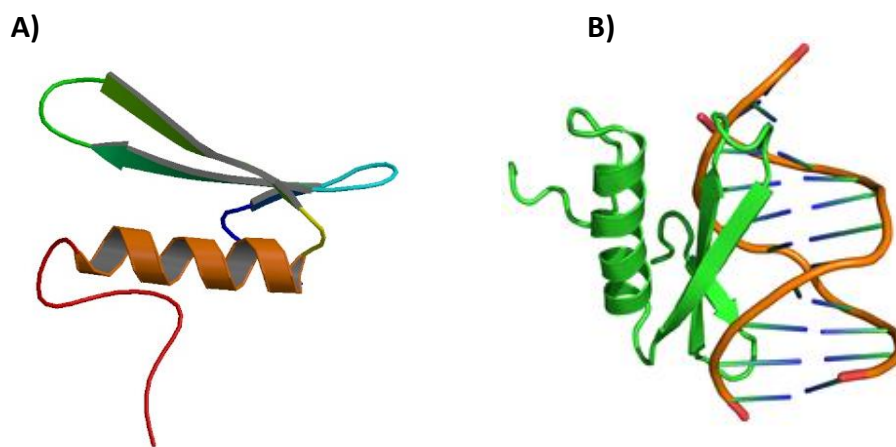


Fig. 6.2. Mecanismo de unión de factores transcripcionales de tipo AP2/ERF a su secuencia blanco. Resolución por NMR del dominio AP2 de la proteína AtERF1 (PDB 2gcc) **(A)** y del dominio unido al al GCC-box (PDB 1GCC) **(B)**. Imágenes tomadas del banco de datos de proteínas europeo (PDBe) (218).

Para algunos miembros de esta familia se ha determinado que este dominio conservado reconoce secuencias ricas en GC a la que se denominó GCC-box y para algunos reguladores la secuencia consenso es 5'-AGCCGCC-3' (210). Interesantemente, las cajas HmuP (HmuP1: 5'-CCAGCCAGCC-3', HmuP2: 5'-AGCAAGCC-3') son secuencias ricas en GCC sugiriendo que el mecanismo de reconocimiento del ADN utilizado por HmuP podría ser similar al encontrado en reguladores transcripcionales de plantas.

Estos antecedentes apoyan los resultados obtenidos que indican la unión de HmuP a las cajas HmuP presentes en el ADN. En este caso, la unión de HmuP a las cajas HmuP podría implicar la formación de un homodímero donde las hojas β de cada monómero interactúen con una de las cajas HmuP. De ser esta situación fisiológicamente activa, éste sería el primer ejemplo de un factor de transcripción procariota donde el motivo de unión al ADN esté mediado por tres hojas β antiparalelas.

Sin embargo la presencia de las cajas HmuP en la región 5'UTR del gen *shmR* y los resultados obtenidos en el capítulo IV, nos llevan a plantearnos la posibilidad de que HmuP no sea un regulador transcripcional.

¿Es la proteína HmuP un activador post-transcripcional?

Si bien se han identificado aproximadamente 20 proteínas de unión a ARN en bacterias, en muchos casos se desconoce el mecanismo mediante el cual llevan a cabo su función. Aún menos información existe respecto a la interacción a nivel molecular entre las proteínas de unión a ARN y su blanco de acción [Revisado por Van Assche *et al.* (185)]. Uno de los mecanismos mejor caracterizados es el mediado por la proteína CsrA de *E. coli*, la cual actúa en sus ARNm blanco predominantemente compitiendo con el ribosoma por la unión a la secuencia Shine Dalgarno (SD). El sitio de unión de la proteína CsrA es una secuencia consenso de 12 nt RUACARGGAUGU, siendo los codones ACA y GGA 100% conservados. CsrA es un regulador global ya que una mutación en *csrA* afecta la expresión de aproximadamente un 10 % de los genes en diferentes bacterias, ya sea de forma directa, o indirectamente al regular la expresión de proteínas regulatorias. La unión de CsrA no sólo tiene un efecto negativo en la expresión de los genes que regula. Se ha visto que en algunos casos es capaz de bloquear la unión de la ARNasaE a su sitio blanco en la región 5' del ARN y por lo tanto favorecer la estabilidad del mismo [Revisado por Van Assche *et al.* (185) y Papenfort *et al.* (211)].

Todas las proteínas de tipo CsrA caracterizadas tienen una estructura secundaria altamente conservada formada por 5 hebras β y una hélice α terminal y en solución se encuentran en forma de dímero (212–215). En *Pseudomonas putida* (213), *E. coli* (212) y *Y. enterocolitica* (216) se ha determinado la estructura cristalográfica de CsrA (o el

homólogo RsmA en el caso de *Y. enterocolitica*). El dímero es formado por el entrelazado de las hebras $\beta 1$ y $\beta 5$ de un monómero con las hebras $\beta 4'$ y $\beta 2'$ del otro monómero mediante puentes de hidrógeno, formando una hoja β antiparalela mixta (213). Mediante mapas de potencial electrostático de superficie y titulación con ARN sintéticos conteniendo secuencias blanco, se determinaron regiones conservadas y cargadas positivamente presentes en los bucles formados entre las hebras $\beta 1$ y $\beta 2$ y las hebras $\beta 3$ y $\beta 4$, que participarían en la unión al ARN (212).

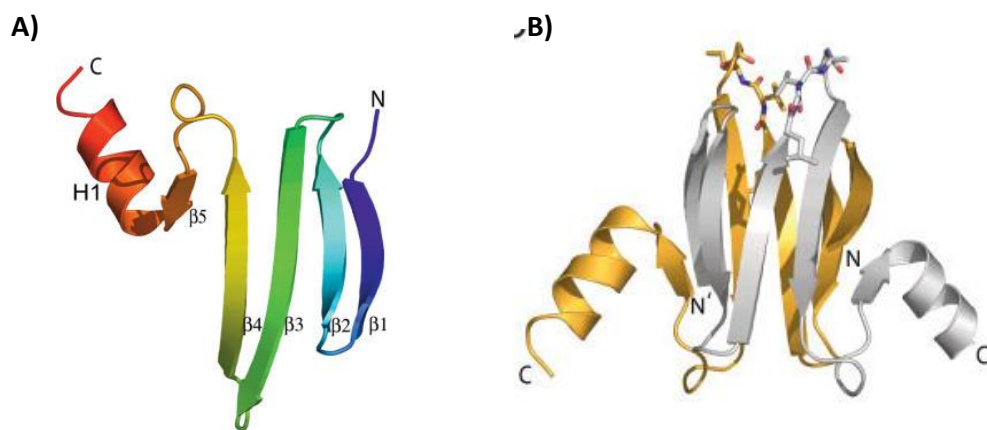


Fig. 6.3. Estructura cristalográfica de la proteína CsrA de *P. putida*. **A)** Diagrama de la proteína CsrA mostrando la organización de la estructura secundaria. Se indican la hélice α (H1) y las hebras β ($\beta 1$ - $\beta 5$). El N-terminal se muestra en azul y el C-terminal en rojo. **B)** Representación del dímero de CsrA mostrando la localización del posible motivo de unión a ARN. Tomada de Rife *et al.* (213)

En *E. coli* la proteína CsrA se une preferentemente a secuencias consenso ubicadas en horquillas formadas por sus ARN blanco, donde el codón GGA forma parte de la horquilla. El mecanismo molecular de acción propuesto implica dos etapas. En una primera instancia el dímero CsrA reconocería horquillas que contienen el codón GGA y uno de los monómeros se uniría a esta secuencia. Esta unión generaría cambios conformacionales tanto en el ARNm como en la proteína, favoreciendo en una segunda etapa la unión del otro monómero CsrA a la secuencia SD. Dado que las secuencias SD están presentes en la mayoría de los ARNm, la presencia de una secuencia blanco extra sería una señal que le permita a la proteína CsrA reconocer sus blancos de acción (212).

En eucariotas, la mayoría de las proteínas de unión a ARN están compuestas por unos pocos dominios de unión a ARN que habitualmente se encuentran en arreglos particulares y múltiples copias dentro de una secuencia, de manera de abarcar distintos blancos de acción. De los 11 dominios de unión a ARN reportados, 8 de ellos presentan una topología que incluye hojas β y en la mayoría de los casos el mecanismo molecular de unión implica la participación de los bucles formados entre hebras β [Revisado por Lunde *et al.* (217)].

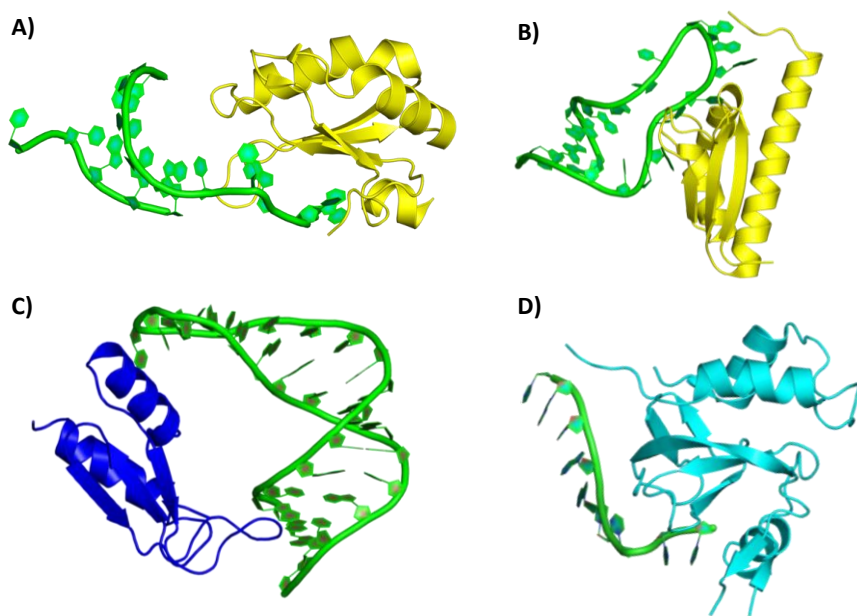


Fig. 6.4. Estructuras de proteínas de unión a ARN con distintos dominios de unión. A) Proteína con dominio RRM (PDB 1URN) con topología $\alpha\beta$ donde la superficie de la hoja β participa del reconocimiento del ARN. B) Proteína con dominio KH tipo I (PDB 1EC6) con topología $\alpha\beta$ donde los bucles entre las hebras β_2 y β_3 y el bucle GXXG participa del reconocimiento del ARN. C) Proteína con dominio dsRBC (PDB 1EKZ) con topología $\alpha\beta$ donde el reconocimiento del ARN está dado por las hélices y el bucle formado entre las hebras β_1 y β_2 . D) Proteína con dominio PAZ (PDB 1SI3) con topología $\alpha\beta$ donde un bolsillo hidrofóbico formado por un barril β formado y un pequeño motivo $\alpha\beta$ participan del reconocimiento del ARN. Imágenes tomadas del banco de datos de proteínas europeo (PDBe) (218).

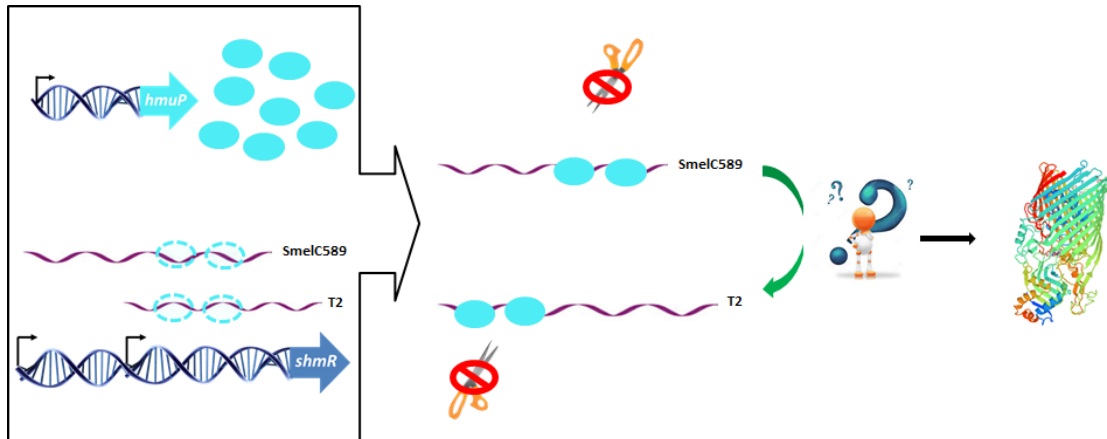
Estos datos sugieren que la presencia de hojas β sería una característica común a la mayoría de las proteínas de unión a ARN y que la interacción molecular entre estas

proteínas y su ARN blanco estaría mediada en parte por los bucles formados entre hebras β antiparalelas consecutivas.

Considerando estos antecedentes, la estructura secundaria de la proteína HmuP, la presencia de las cajas HmuP en la región 5'UTR del gen *shmR*, la presencia del ARNnc SmelC589 en la región genómica de *shmR* y los resultados discutidos en el capítulo IV, proponemos un posible mecanismo de acción para la proteína HmuP, donde su acción es a nivel post-transcripcional.

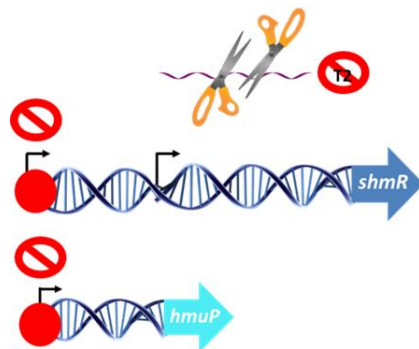
Ausencia de hierro

En condiciones limitantes de hierro la proteína RirA no ejerce su función represora, dándose entonces la expresión del gen *hmuP* y la expresión del ARNnc SmelC589, ambos regulados negativamente por RirA en presencia de hierro. Dado que el transcripto de *shmR* que se origina en el sitio -76 con respecto al codón de inicio no presenta una caja RirA en el sitio de unión de la ARN polimerasa, existiría la posibilidad de que no presente una regulación en respuesta a hierro y que sea de expresión constitutiva. Otra posibilidad es que necesite de un efector adicional para activar su total transcripción. Al estar presente la proteína HmuP, ésta se uniría a las cajas HmuP de la región 5'UTR del transcripto de *shmR*, así como a las cajas HmuP del SmelC589. Esta unión estabilizaría el ARNm y el ARNnc al evitar la unión de la ARNasaE a su sitio blanco, ubicado entre las dos cajas HmuP. Además de HmuP, SmelC589 también sería necesario para la expresión de *shmR* sugiriendo entonces una función regulatoria, directa o indirecta, de este ARNnc sobre el transcripto *shmR*.



Presencia de hierro

En condiciones de disponibilidad de hierro, la proteína RirA reprime la expresión del gen *hmuP* y del ARNc SmelC589. Si bien podría haber una expresión basal del transcripto *shmR* a partir del sitio de inicio ubicado en -76, la ausencia de la proteína HmuP implicaría la inestabilidad debido a la acción de la ARNasaE.



REFERENCIAS

1. **Dreyfus B, Garcia JL, Gillis M.** 1988. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a Stem-Nodulating Nitrogen-Fixing Bacterium Isolated from *Sesbania rostrata*. *Int J Syst Bacteriol* **38**:89–98.
2. **Jordan DC.** 1982. NOTES: Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a Genus of Slow-Growing, Root Nodule Bacteria from Leguminous Plants. *Int J Syst Bacteriol* **32**:136–139.
3. **Jarvis BDW, Van Berkum P, Chen WX, Nour SM, Fernandez MP, Cleyet-Marel JC, Gillis M.** 1997. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* **47**:895–898.
4. **Frank B.** 1889. Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Berichte der Dtsch Bot Gesellschaft* **7**:332–46.
5. **Chen WX, Yan GH, Li JL.** 1988. Numerical Taxonomic Study of Fast-Growing Soybean Rhizobia and a Proposal that *Rhizobium fredii* Be Assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* **38**:392–397.
6. <http://edzna.ccg.unam.mx/rhizobial-taxonomy/node/4>.
7. **Maynaud G, Willems A, Soussou S, Vidal C, Mauré L, Moulin L, Cleyet-Marel J-C, Brunel B.** 2012. Molecular and phenotypic characterization of strains nodulating *Anthyllis vulneraria* in mine tailings, and proposal of *Aminobacter anthyllidis* sp. nov., the first definition of *Aminobacter* as legume-nodulating bacteria. *Syst Appl Microbiol* **35**:65–72.
8. **Rivas R, Willems A, Subba-Rao NS, Mateos PF, Dazzo FB, Kroppenstedt RM, Martínez-Molina E, Gillis M, Velázquez E.** 2003. Description of *Devosia neptuniae* sp. nov. that Nodulates and Fixes Nitrogen in Symbiosis with *Neptunia natans*, an Aquatic Legume from India. *Syst Appl Microbiol* **26**:47–53.
9. **Jourand P, Giraud E, Béna G, Sy A, Willems A, Gillis M, Dreyfus B, de Lajudie P.** 2004. *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylo-trophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. *Int J Syst*

Evol Microbiol **54**:2269–73.

10. **Ardley JK, Parker MA, De Meyer SE, Trengove RD, O'Hara GW, Reeve WG, Yates RJ, Dilworth MJ, Willems A, Howieson JG.** 2011. *Microvirga lupini* sp. nov., *Microvirga lotononidis* sp. nov. and *Microvirga zambiensis* sp. nov. are alphaproteobacterial root-nodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen with geographically and taxonomically separate legume hosts. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**:2579–2588.
11. **Trujillo ME, Willems A, Abril A, Planchuelo A-M, Rivas R, Ludeña D, Mateos PF, Martínez-Molina E, Velázquez E.** 2005. Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. *Appl Environ Microbiol* **71**:1318–27.
12. **Valverde A.** 2005. *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**:1985–1989.
13. **Lin DX, Wang ET, Tang H, Han TX, He YR, Guan SH, Chen WX.** 2008. *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**:1409–13.
14. **Ormeño-Orrillo E, Servín-Garcidueñas LE, Rogel MA, González V, Peralta H, Mora J, Martínez-Romero J, Martínez-Romero E.** 2015. Taxonomy of rhizobia and agrobacteria from the Rhizobiaceae family in light of genomics. *Syst Appl Microbiol* **38**:287–91.
15. **Mousavi SA, Österman J, Wahlberg N, Nesme X, Lavire C, Vial L, Paulin L, de Lajudie P, Lindström K.** 2014. Phylogeny of the Rhizobium-Allorhizobium-Agrobacterium clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. *Syst Appl Microbiol* **37**:208–15.
16. **Österman J, Mousavi SA, Koskinen P, Paulin L, Lindström K.** 2015. Genomic features separating ten strains of *Neorhizobium galegae* with different symbiotic phenotypes. *BMC Genomics* **16**:348.
17. **Mousavi SA, Willems A, Nesme X, de Lajudie P, Lindström K.** 2015. Revised phylogeny of Rhizobiaceae: proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov., and 13 new species combinations. *Syst Appl Microbiol* **38**:84–90.
18. **Moulin L, Munive A, Dreyfus B, Boivin-Masson C.** 2001. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature* **411**:948–950.
19. **Chen WM, Laevens S, Lee TM, Coenye T, De Vos P, Mergeay M, Vandamme P.** 2001.

- Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**:1729–35.
20. **Gyaneshwar P, Hirsch AM, Moulin L, Chen W-M, Elliott GN, Bontemps C, Estrada-de Los Santos P, Gross E, Dos Reis FB, Sprent JI, Young JPW, James EK.** 2011. Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. *Mol Plant Microbe Interact* **24**:1276–88.
 21. **Philippot L, Raaijmakers JM, Lemanceau P, van der Putten WH.** 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat Rev Microbiol* **11**:789–99.
 22. **Cooper JE.** 2004. Multiple Responses of Rhizobia to Flavonoids During Legume Root Infection. *Adv Bot Res* **41**:1–62.
 23. **Pueppke SG, Broughton WJ.** 1999. *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Mol Plant Microbe Interact* **12**:293–318.
 24. **Burris RH.** 1994. Historical development in biological nitrogen fixation, p. 23–41. *In* Frey, KJ (ed.), *Historical perspectives in plant science*. Iowa state university press, Iowa.
 25. **Broun F. E, Lawrence B. I, McCoy E.** 1939. The occurrence of root nodulesRoot nodule bacteria and leguminous plants. University of Winsconsin press.
 26. **Monza J, Palacios J.** 2004. Fijación biológica de nitrógeno en la simbiosis rizobio-leguminosa, p. 15–38. *In* *El metabolismo del nitrógeno en las plantas*. Almuzara.
 27. **Jones KM, Kobayashi H, Davies BW, Taga ME, Walker GC.** 2007. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat Rev Microbiol* **5**:619–633.
 28. **Oldroyd GED.** 2013. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol* **11**:252–63.
 29. **Robledo M, Rivera L, Jiménez-Zurdo JI, Rivas R, Dazzo F, Velázquez E, Martínez-Molina E, Hirsch AM, Mateos PF.** 2012. Role of *Rhizobium* endoglucanase CelC2 in cellulose biosynthesis and biofilm formation on plant roots and abiotic surfaces. *Microb Cell Fact* **11**:125.

30. **Gage DJ.** 2004. Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**:280–300.
31. <http://www.noble.org/apps/imagegallery/Image.aspx?ImageID=80&SearchResults=32,37,52,11,53,3>.
32. <http://fineartamerica.com/featured/root-nodule-of-pea-plant-dr-jeremy-burgess.html>.
33. **Ferguson BJ, Indrasumunar A, Hayashi S, Lin M-H, Lin Y-H, Reid DE, Gresshoff PM.** 2010. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *J Integr Plant Biol* **52**:61–76.
34. **Rodríguez-Haas B, Finney L, Vogt S, González-Melendi P, Imperial J, González-Guerrero M.** 2013. Iron distribution through the developmental stages of *Medicago truncatula* nodules. *Metallomics* **5**:1247.
35. **Andrews SC, Robinson AK, Rodriguez-Quinones F.** 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**:215–237.
36. **Andrews S, Norton I, Salunkhe AS, Goodluck H, Aly WSM, Mourad-Agha H, Cornelis P.** 2013. Control of iron metabolism in bacteria. *Met Ions Life Sci* **12**:203–39.
37. **Ilbert M, Bonnefoy V.** 2013. Insight into the evolution of the iron oxidation pathways. *Biochim Biophys Acta* **1827**:161–75.
38. **Battistoni F, Platero R, Noya F, Arias A, Fabiano E.** 2002. Intracellular Fe content influences nodulation competitiveness of *Sinorhizobium meliloti* strains as inocula of alfalfa. *Soil Biol Biochem* **34**:593–597.
39. **Tang A. D. Robson, y M.J. Dilworth C, Tang C, Robson AD, Dilworth MJ.** 1990. The role of iron in nodulation and nitrogen fixation in *Lupinus angustifolius*. *New Phytol* **114**:173–182.
40. **O'Hara GW, Dilworth MJ, Boonkerd JN, Parkpian P, O'Hara M.J. Dilworth, N. Boonkerd y P. Parkpian. GW.** 1988. Iron-deficiency specifically limits nodule development in peanut inoculated with *Bradyrhizobium* sp. *New Phytol* **108**:51–57.
41. **O'Brian MR, Fabiano E.** 2010. Mechanisms and regulation of iron homeostasis in the

- Rhizobia, p. 37. *In* Cornelis, P, Andrews, SC (eds.), Iron uptake and homeostasis in microorganisms. Caister Academic Press, Norfolk, UK.
42. **Delgado MJ, Bedmar EJ, Downie JA.** 1998. Genes involved in the formation and assembly of rhizobial cytochromes and their role in symbiotic nitrogen fixation. *Adv Microb Physiol* **40**:191–231.
 43. **Preisig O, Zufferey R, Thöny-Meyer L, Appleby CA, Hennecke H.** 1996. A high-affinity cbb3-type cytochrome oxidase terminates the symbiosis-specific respiratory chain of *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* **178**:1532–8.
 44. **Cartron ML, Maddocks S, Gillingham P, Craven CJ, Andrews SC.** 2006. Feo--transport of ferrous iron into bacteria. *Biometals* **19**:143–157.
 45. **Smith AD, Wilks A.** 2012. Extracellular heme uptake and the challenges of bacterial cell membranes. *Curr Top Membr* **69**:359–92.
 46. **Davidson AL, Dassa E, Orelle C, Chen J.** 2008. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**:317–64, table of contents.
 47. **Genco CA, Dixon DW.** 2001. Emerging strategies in microbial haem capture. *Mol Microbiol* **39**:1–11.
 48. **Wandersman C, Stojiljkovic I.** 2000. Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. *Curr Opin Microbiol* **3**:215–220.
 49. **Mazmanian SK, Skaar EP, Gaspar AH, Humayun M, Gornicki P, Jelenska J, Joachmiak A, Missiakas DM, Schneewind O.** 2003. Passage of heme-iron across the envelope of *Staphylococcus aureus*. *Science* **299**:906–9.
 50. **Grigg JC, Ukpabi G, Gaudin CFM, Murphy MEP.** 2010. Structural biology of heme binding in the *Staphylococcus aureus* Isd system. *J Inorg Biochem* **104**:341–8.
 51. **Skaar EP, Schneewind O.** 2004. Iron-regulated surface determinants (Isd) of *Staphylococcus aureus*: stealing iron from heme. *Microbes Infect* **6**:390–7.
 52. **Reniere ML, Pishchany G, Skaar EP.** 2010. Iron uptake in Staphylococci, p. 247–264. *In* Cornelis, P, Andrews, SC (eds.), Iron uptake and homeostasis in microorganisms. Caister

Academic Press, Norfolk, UK.

53. **Maresso AW, Schneewind O.** 2006. Iron acquisition and transport in *Staphylococcus aureus*. *Biometals* **19**:193–203.
54. **Sheldon JR, Heinrichs DE.** 2015. Recent developments in understanding the iron acquisition strategies of gram positive pathogens. *FEMS Microbiol Rev* **39**:592–630.
55. **Maresso AW, Garufi G, Schneewind O.** 2008. *Bacillus anthracis* secretes proteins that mediate heme acquisition from hemoglobin. *PLoS Pathog* **4**:e1000132.
56. **Fabian M, Solomaha E, Olson JS, Maresso AW.** 2009. Heme transfer to the bacterial cell envelope occurs via a secreted hemophore in the Gram-positive pathogen *Bacillus anthracis*. *J Biol Chem* **284**:32138–46.
57. **Tong Y, Guo M.** 2009. Bacterial heme-transport proteins and their heme-coordination modes. *Arch Biochem Biophys* **481**:1–15.
58. **Stojiljkovic I, Perkins-Balding D.** 2002. Processing of heme and heme-containing proteins by bacteria. *DNA Cell Biol* **21**:281–95.
59. **Letoffe S, Ghigo JM, Wandersman C.** 1994. Iron acquisition from heme and hemoglobin by a *Serratia marcescens* extracellular protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:9876–9880.
60. **Wandersman C, Delepelaire P.** 2004. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol* **58**:611–647.
61. **Cescau S, Cwerman H, Letoffe S, Delepelaire P, Wandersman C, Biville F.** 2007. Heme acquisition by hemophores. *Biometals* **20**:603–613.
62. **Biville F, Cwerman H, Letoffe S, Rossi MS, Drouet V, Ghigo JM, Wandersman C.** 2004. Haemophore-mediated signalling in *Serratia marcescens*: a new mode of regulation for an extra cytoplasmic function (ECF) sigma factor involved in haem acquisition. *Mol Microbiol* **53**:1267–1277.
63. **Cwerman H, Wandersman C, Biville F.** 2006. Heme and a five-amino-acid hemophore region form the bipartite stimulus triggering the has signaling cascade. *J Bacteriol*, 2006/04/20 ed. **188**:3357–3364.
64. **Stojiljkovic I, Hantke K.** 1992. Hemin uptake system of *Yersinia enterocolitica*:

- similarities with other TonB-dependent systems in gram-negative bacteria. *EMBO J* **11**:4359–67.
65. **Stojiljkovic I, Hantke K.** 1994. Transport of haemin across the cytoplasmic membrane through a haemin-specific periplasmic binding-protein-dependent transport system in *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **13**:719–732.
66. **Hornung JM, Jones HA, Perry RD.** 1996. The hmu locus of *Yersinia pestis* is essential for utilization of free haemin and haem--protein complexes as iron sources. *Mol Microbiol* **20**:725–739.
67. **Thompson JM, Jones HA, Perry RD.** 1999. Molecular characterization of the hemin uptake locus (hmu) from *Yersinia pestis* and analysis of hmu mutants for hemin and hemoprotein utilization. *Infect Immun* **67**:3879–92.
68. **Wyckoff EE, Duncan D, Torres AG, Mills M, Maase K, Payne SM.** 1998. Structure of the *Shigella dysenteriae* haem transport locus and its phylogenetic distribution in enteric bacteria. *Mol Microbiol* **28**:1139–52.
69. **Wilks A, Heinzl G.** 2013. Heme oxygenation and the widening paradigm of heme degradation. *Arch Biochem Biophys*, 2013/10/29 ed.
70. **Ratliff-Griffin M, Wilks A, Stojiljkovic I.** 2004. Bacterial heme oxygenases, p. 86. *In* Crosa, JH, Mey, AR, Payne, SM (eds.), *Iron transport in bacteria*. ASM Press, Washington DC.
71. **Zhu W, Wilks A, Stojiljkovic I.** 2000. Degradation of heme in gram-negative bacteria: the product of the hemO gene of *Neisseriae* is a heme oxygenase. *J Bacteriol* **182**:6783–90.
72. **Wilks A, Schmitt MP.** 1998. Expression and characterization of a heme oxygenase (Hmu O) from *Corynebacterium diphtheriae*. Iron acquisition requires oxidative cleavage of the heme macrocycle. *J Biol Chem* **273**:837–41.
73. **Ratliff M, Zhu W, Deshmukh R, Wilks A, Stojiljkovic I.** 2001. Homologues of neisserial heme oxygenase in gram-negative bacteria: degradation of heme by the product of the pigA gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**:6394–403.
74. **Schmitt MP.** 1997. Utilization of host iron sources by *Corynebacterium diphtheriae*:

- identification of a gene whose product is homologous to eukaryotic heme oxygenases and is required for acquisition of iron from heme and hemoglobin. *J Bacteriol* **179**:838–45.
75. **Gisk B, Wiethaus J, Aras M, Frankenberg-Dinkel N.** 2012. Variable composition of heme oxygenases with different regiospecificities in *Pseudomonas* species. *Arch Microbiol* **194**:597–606.
76. **Wegele R, Tasler R, Zeng Y, Rivera M, Frankenberg-Dinkel N.** 2004. The heme oxygenase(s)-phytochrome system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **279**:45791–802.
77. **Skaar EP, Gaspar AH, Schneewind O.** 2004. IsdG and IsdI, heme-degrading enzymes in the cytoplasm of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* **279**:436–443.
78. **Skaar EP, Gaspar AH, Schneewind O.** 2006. *Bacillus anthracis* IsdG, a heme-degrading monooxygenase. *J Bacteriol* **188**:1071–80.
79. **Puri S, O'Brian MR.** 2006. The hmuQ and hmuD genes from *Bradyrhizobium japonicum* encode heme-degrading enzymes. *J Bacteriol*, 2006/09/06 ed. **188**:6476–6482.
80. **Reniere ML, Ukpabi GN, Harry SR, Stec DF, Krull R, Wright DW, Bachmann BO, Murphy ME, Skaar EP.** 2010. The IsdG-family of haem oxygenases degrades haem to a novel chromophore. *Mol Microbiol* **75**:1529–38.
81. **Matsui T, Nambu S, Ono Y, Goulding CW, Tsumoto K, Ikeda-Saito M.** 2013. Heme degradation by *Staphylococcus aureus* IsdG and IsdI liberates formaldehyde rather than carbon monoxide. *Biochemistry* **52**:3025–7.
82. **Park S, Kim D, Jang I, Oh H Bin, Choe J.** 2014. Structural and biochemical study of *Bacillus subtilis* HmoB in complex with heme. *Biochem Biophys Res Commun* **446**:286–91.
83. **Loutet SA, Kobylarz MJ, Chau CHT, Murphy MEP.** 2013. IruO is a reductase for heme degradation by IsdI and IsdG proteins in *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* **288**:25749–59.
84. **Hannauer M, Arifin AJ, Heinrichs DE.** 2015. Involvement of reductases IruO and NtrA in iron acquisition by *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **96**:1192–210.

85. **Nambu S, Matsui T, Goulding CW, Takahashi S, Ikeda-Saito M.** 2013. A new way to degrade heme: the Mycobacterium tuberculosis enzyme MhuD catalyzes heme degradation without generating CO. *J Biol Chem* **288**:10101–9.
86. **Lee MJY, Schep D, McLaughlin B, Kaufmann M, Jia Z.** 2014. Structural analysis and identification of PhuS as a heme-degrading enzyme from Pseudomonas aeruginosa. *J Mol Biol* **426**:1936–46.
87. **Guo Y, Guo G, Mao X, Zhang W, Xiao J, Tong W, Liu T, Xiao B, Liu X, Feng Y, Zou Q.** 2008. Functional identification of HugZ, a heme oxygenase from Helicobacter pylori. *BMC Microbiol* **8**:226.
88. **Ridley KA, Rock JD, Li Y, Ketley JM.** 2006. Heme utilization in Campylobacter jejuni. *J Bacteriol* **188**:7862–75.
89. **Suits MDL, Pal GP, Nakatsu K, Matte A, Cygler M, Jia Z.** 2005. Identification of an Escherichia coli O157:H7 heme oxygenase with tandem functional repeats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:16955–60.
90. **Liu M, Boulouis H-J, Biville F.** 2012. Heme degrading protein HemS is involved in oxidative stress response of Bartonella henselae. *PLoS One* **7**:e37630.
91. **Troxell B, Hassan HM.** 2013. Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Front Cell Infect Microbiol* **3**:59.
92. **Boyd J, Oza MN, Murphy JR.** 1990. Molecular cloning and DNA sequence analysis of a diphtheria toxin iron-dependent regulatory element (dtxR) from Corynebacterium diphtheriae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:5968–72.
93. **Diaz-Mireles E, Wexler M, Sawers G, Bellini D, Todd JD, Johnston AW, Diaz-Mireles M. Wexler, G. Sawers, D. Bellini, J. D. Todd, and A. W. Johnston E.** 2004. The Fur-like protein Mur of Rhizobium leguminosarum is a Mn(2+)-responsive transcriptional regulator. *Microbiology* **150**:1447–1456.
94. **Platero R, Peixoto L, O'Brian MR, Fabiano E.** 2004. Fur is involved in manganese-dependent regulation of mntA (sitA) expression in Sinorhizobium meliloti. *Appl Env Microbiol* **70**:4349–4355.
95. **Rodionov DA, Gelfand MS, Todd JD, Curson ARJ, Johnston AWB.** 2006. Computational

- Reconstruction of Iron- and Manganese-Responsive Transcriptional Networks in alpha-Proteobacteria. *PLoS Comput Biol* **2**:e163.
96. **Hamza I, Chauhan S, Hassett R, O'Brian MR.** 1998. The bacterial *irr* protein is required for coordination of heme biosynthesis with iron availability. *J Biol Chem* **273**:21669–74.
 97. **Rudolph G, Hennecke H, Fischer HM.** 2006. Beyond the Fur paradigm: iron-controlled gene expression in rhizobia. *FEMS Microbiol Rev* **30**:631–648.
 98. **Yang J, Sangwan I, Lindemann A, Hauser F, Hennecke H, Fischer HM, O'Brian MR.** 2006. Bradyrhizobium japonicum senses iron through the status of haem to regulate iron homeostasis and metabolism. *Mol Microbiol* **60**:427–437.
 99. **Qi Z, O'Brian MR.** 2002. Interaction between the bacterial iron response regulator and ferrocyclase mediates genetic control of heme biosynthesis. *Mol Cell* **9**:155–62.
 100. **Qi Z, Hamza I, O'Brian MR.** 1999. Heme is an effector molecule for iron-dependent degradation of the bacterial iron response regulator (*Irr*) protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:13056–61.
 101. **Singleton C, White GF, Todd JD, Marritt SJ, Cheesman MR, Johnston AWB, Le Brun NE.** 2010. Heme-responsive DNA binding by the global iron regulator *Irr* from *Rhizobium leguminosarum*. *J Biol Chem* **285**:16023–31.
 102. **O'Brian MR.** 2015. Perception and Homeostatic Control of Iron in the Rhizobia and Related Bacteria. *Annu Rev Microbiol* **69**:229–45.
 103. **Rudolph G, Semini G, Hauser F, Lindemann A, Friberg M, Hennecke H, Fischer H-M.** 2006. The Iron control element, acting in positive and negative control of iron-regulated Bradyrhizobium japonicum genes, is a target for the *Irr* protein. *J Bacteriol* **188**:733–44.
 104. **Todd JD, Sawers G, Rodionov DA, Johnston AWB.** 2006. The *Rhizobium leguminosarum* regulator *IrrA* affects the transcription of a wide range of genes in response to Fe availability. *Mol Genet Genomics* **275**:564–77.
 105. **Todd JD, Wexler M, Sawers G, Yeoman KH, Poole PS, Johnston AW.** 2002. *RirA*, an iron-responsive regulator in the symbiotic bacterium *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology* **148**:4059–4071.

106. **Todd JD, Sawers G, Johnston AWB.** 2005. Proteomic analysis reveals the wide-ranging effects of the novel, iron-responsive regulator RirA in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Mol Genet Genomics* **273**:197–206.
107. **Yeoman KH, Curson ARJ, Todd JD, Sawers G, Johnston AWB.** 2004. Evidence that the *Rhizobium* regulatory protein RirA binds to cis-acting iron-responsive operators (IROs) at promoters of some Fe-regulated genes. *Microbiology* **150**:4065–74.
108. **Hohle TH, O'Brian MR.** 2009. The *mntH* gene encodes the major Mn(2+) transporter in *Bradyrhizobium japonicum* and is regulated by manganese via the Fur protein. *Mol Microbiol* **72**:399–409.
109. **Casida LE.** 1982. *Ensifer adhaerens* gen. nov., sp. nov.: A Bacterial Predator of Bacteria in Soil. *Int J Syst Bacteriol* **32**:339–345.
110. **Willems A, Fernández-López, M. Muñoz-Adelantado, E. Goris J, De Vos P, Martínez-Romero E, Toro N, Gillis M.** 2003. Description of new *Ensifer* strains from nodules and proposal to transfer *Ensifer adhaerens* Casida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adhaerens* comb. nov. Request for an Opinion. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**:1207–1217.
111. **Sawada H, Kuykendall LD, Young JM.** 2003. Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J Gen Appl Microbiol* **49**:155–79.
112. **Young JM.** 2003. The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen et al. 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang et al. 2002 is a later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination “*Sinorhizobium adhaerens*” (Casida 1982) Willems et . *Int J Syst Evol Microbiol* **53**:2107–10.
113. **Young JM.** 2010. *Sinorhizobium* versus *Ensifer*: may a taxonomy subcommittee of the ICSP contradict the Judicial Commission? *Int J Syst Evol Microbiol* **60**:1711–3.
114. **Prokaryotes JC of the IC on S of.** 2008. The genus name *Sinorhizobium* Chen et al. 1988 is a later synonym of *Ensifer* Casida 1982 and is not conserved over the latter genus name, and the species name “*Sinorhizobium adhaerens*” is not validly published. Opinion 84. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**:1973.
115. **de Lajudie P, Willems A, Pot B, Dewettinck D, Maestrojuan G, Neyra M, Collins MD, Dreyfus B, Kersters K, Gillis M.** 1994. Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of

- the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 715–733. *Int J Syst Bacteriol* **44**:715–733.
116. **van Rhijn P, Vanderleyden J.** 1995. The Rhizobium-plant symbiosis. *Microbiol Rev* **59**:124–42.
117. **Maróti G, Kondorosi E.** 2014. Nitrogen-fixing Rhizobium-legume symbiosis: are polyploidy and host peptide-governed symbiont differentiation general principles of endosymbiosis? *Front Microbiol* **5**:326.
118. **Geddes BA, Oresnik IJ.** 2014. Physiology, genetics, and biochemistry of carbon metabolism in the alphaproteobacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Can J Microbiol* **60**:491–507.
119. **Harrison PW, Lower RPJ, Kim NKD, Young JPW.** 2010. Introducing the bacterial “chromid”: not a chromosome, not a plasmid. *Trends Microbiol* **18**:141–8.
120. **Galibert F, Finan TM, Long SR, Puhler A, Abola P, Ampe F, Barloy-Hubler F, Barnett MJ, Becker A, Boistard P, Bothe G, Boutry M, Bowser L, Buhrmester J, Cadieu E, Capela D, Chain P, Cowie A, Davis RW, Dreano S, Federspiel NA, Fisher RF, Gloux S, Godrie T, Goffeau A, Golding B, Gouzy J, Gurjal M, Hernandez-Lucas I, Hong A, Huizar L, Hyman RW, Jones T, Kahn D, Kahn ML, Kalman S, Keating DH, Kiss E, Komp C, Lelaure V, Masuy D, Palm C, Peck MC, Pohl TM, Portetelle D, Purnelle B, Ramsperger U, Surzycki R, Thebault P, Vandenbol M, Vorholter FJ, Weidner S, Wells DH, Wong K, Yeh KC, Batut J.** 2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293**:668–72.
121. **Barnett MJ, Fisher RF, Jones T, Komp C, Abola AP, Barloy-Hubler F, Bowser L, Capela D, Galibert F, Gouzy J, Gurjal M, Hong A, Huizar L, Hyman RW, Kahn D, Kahn ML, Kalman S, Keating DH, Palm C, Peck MC, Surzycki R, Wells DH, Yeh KC, Davis RW, Federspiel NA, Long SR.** 2001. Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:9883–8.
122. **Finan TM, Weidner S, Wong K, Buhrmester J, Chain P, Vorhölter FJ, Hernandez-Lucas I, Becker A, Cowie A, Gouzy J, Golding B, Pühler A.** 2001. The complete sequence of the 1,683-kb pSymB megaplasmid from the N₂-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*.

- Proc Natl Acad Sci U S A **98**:9889–94.
123. www.ncbi.nlm.nih.gov.
 124. <http://iant.toulouse.inra.fr/S.meliloti>.
 125. **Quesada OT**. 2012. Caracterización del RNoma del endosimbionte diazotófico *Sinorhizobium meliloti*: aproximación a la función de la chaperona de RNA Hfq y de los ribo-reguladores Smr7C y Smr15C1/C2. Universidad de Granada.
 126. **Capela D, Barloy-Hubler F, Gouzy J, Bothe G, Ampe F, Batut J, Boistard P, Becker A, Boutry M, Cadieu E, Dreano S, Gloux S, Godrie T, Goffeau A, Kahn D, Kiss E, Lelaure V, Masuy D, Pohl T, Portetelle D, Puhler A, Purnelle B, Ramsperger U, Renard C, Thebault P, Vandebol M, Weidner S, Galibert F**. 2001. Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. Proc Natl Acad Sci U S A **98**:9877–9882.
 127. **diCenzo GC, MacLean AM, Milunovic B, Golding GB, Finan TM**. 2014. Examination of prokaryotic multipartite genome evolution through experimental genome reduction. PLoS Genet **10**:e1004742.
 128. **Smith MJ, Neilands JB**. 1984. Rhizobactin, a siderophore from *Rhizobium meliloti*. J Plant Nutr **7**:449–458.
 129. **Noya F, Arias A, Fabiano E**. 1997. Heme compounds as iron sources for nonpathogenic *Rhizobium* bacteria. J Bacteriol **179**:3076–3078.
 130. **Lim BL**. 2010. TonB-dependent receptors in nitrogen-fixing nodulating bacteria. Microbes Environ **25**:67–74.
 131. **Persmark M, Pittman P, Buyer JS, Schwyn B, Gill Jr. PR, Neilands JB**. 1993. Isolation and structure of rhizobactin 1021, a siderophore from the alfalfa symbiont *Rhizobium meliloti* 1021. J Am Chem Soc **115**:3950–3956.
 132. **Cuiv PO, Clarke P, Lynch D, O'Connell M**. 2004. Identification of *rhtX* and *fptX*, novel genes encoding proteins that show homology and function in the utilization of the siderophores rhizobactin 1021 by *Sinorhizobium meliloti* and pyochelin by *Pseudomonas aeruginosa*, respectively. J Bacteriol **186**:2996–3005.

133. **Lynch D, O'Brien J, Welch T, Clarke P, Cuív PO, Crosa JH, O'Connell M, Cuív PO, Crosa JH, O'Connell M.** 2001. Genetic organization of the region encoding regulation, biosynthesis, and transport of rhizobactin 1021, a siderophore produced by *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **183**:2576–85.
134. **Cuív PO, Keogh D, Clarke P, O'Connell M.** 2008. The hmuUV genes of *Sinorhizobium meliloti* 2011 encode the permease and ATPase components of an ABC transport system for the utilization of both haem and the hydroxamate siderophores, ferrichrome and ferrioxamine B. *Mol Microbiol* **70**:1261–1273.
135. **Wexler M, Yeoman KH, Stevens JB, de Luca NG, Sawers G, Johnston AW.** 2001. The *Rhizobium leguminosarum* tonB gene is required for the uptake of siderophore and haem as sources of iron. *Mol Microbiol* **41**:801–816.
136. **Nienaber A, Hennecke H, Fischer HM.** 2001. Discovery of a haem uptake system in the soil bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Microbiol* **41**:787–800.
137. **Battistoni F, Platero R, Duran R, Cervenansky C, Battistoni J, Arias A, Fabiano E.** 2002. Identification of an iron-regulated, hemin-binding outer membrane protein in *Sinorhizobium meliloti*. *Appl Env Microbiol* **68**:5877–5881.
138. **Brear EM, Day DA, Smith PMC.** 2013. Iron: an essential micronutrient for the legume-rhizobium symbiosis. *Front Plant Sci* **4**:359.
139. **Fabiano E, Gill Jr. PR, Noya F, Bagnasco P, De La Fuente L, Arias A.** 1995. Siderophore-mediated iron acquisition mutants in *Rhizobium meliloti* 242 and its effect on the nodulation kinetic of alfalfa nodules. *Symbiosis* **19**:197–211.
140. **Stevens JB, Carter RA, Hussain H, Carson KC, Dilworth MJ, Johnston AW.** 1999. The fhu genes of *Rhizobium leguminosarum*, specifying siderophore uptake proteins: fhuDCB are adjacent to a pseudogene version of fhuA. *Microbiology* **145** (Pt 3):593–601.
141. **Yeoman KH, May AG, deLuca NG, Stuckey DB, Johnston AW.** 1999. A putative ECF sigma factor gene, rpol, regulates siderophore production in *Rhizobium leguminosarum*. *Mol Plant Microbe Interact* **12**:994–9.
142. **Dakora FD.** 1995. A functional relationship between leghaemoglobin and nitrogenase based on novel measurements of the two proteins in legume root nodules. *Ann Bot*

- 75:49–54.
143. **Amarelle V, O'Brian MR, Fabiano E.** 2008. ShmR Is Essential for Utilization of Heme as a Nutritional Iron Source in *Sinorhizobium meliloti*. *Appl Environ Microbiol* **74**:6473–6475.
 144. **Costa D.** 2016. Determinación de la función de la bacterioferritina en la homeostasis de hierro de *S. meliloti* 1021. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.
 145. **Pierre O, Engler G, Hopkins J, Brau F, Boncompagni E, Hérouart D.** 2013. Peribacteroid space acidification: a marker of mature bacteroid functioning in *Medicago truncatula* nodules. *Plant Cell Environ* **36**:2059–70.
 146. **Chao T-C, Buhrmester J, Hansmeier N, Pühler A, Weidner S.** 2005. Role of the regulatory gene *rirA* in the transcriptional response of *Sinorhizobium meliloti* to iron limitation. *Appl Environ Microbiol* **71**:5969–82.
 147. **Viguié C, P OC, Clarke P, O'Connell M.** 2005. *RirA* is the iron response regulator of the rhizobactin 1021 biosynthesis and transport genes in *Sinorhizobium meliloti* 2011. *FEMS Microbiol Lett* **246**:235–242.
 148. **Amarelle V, Koziol U, Rosconi F, Noya F, O'Brian MR, Fabiano E.** 2010. A new small regulatory protein, HmuP, modulates haemin acquisition in *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology* **156**:1873–82.
 149. **Beaumont FC, Kang HY, Brickman TJ, Armstrong SK.** 1998. Identification and characterization of *alcR*, a gene encoding an AraC-like regulator of alcaligin siderophore biosynthesis and transport in *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *J Bacteriol* **180**:862–70.
 150. **Tanabe T, Takata N, Naka A, Moon Y-H, Nakao H, Inoue Y, Narimatsu S, Yamamoto S.** 2005. Identification of an AraC-like regulator gene required for induction of the 78-kDa ferrioxamine B receptor in *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol Lett* **249**:309–14.
 151. **Funahashi T, Tanabe T, Maki J, Miyamoto K, Tsujibo H, Yamamoto S.** 2014. Identification and characterization of *Aeromonas hydrophila* genes encoding the outer membrane receptor of ferrioxamine B and an AraC-type transcriptional regulator. *Biosci Biotechnol Biochem* **78**:1777–87.

152. **Fetherston JD, Bearden SW, Perry RD.** 1996. YbtA, an AraC-type regulator of the *Yersinia pestis* pesticin/yersiniabactin receptor. *Mol Microbiol* **22**:315–25.
153. **Tanabe T, Funahashi T, Miyamoto K, Tsujibo H, Yamamoto S.** 2011. Identification of genes, *desR* and *desA*, required for utilization of desferrioxamine B as a xenosiderophore in *Vibrio furnissii*. *Biol Pharm Bull* **34**:570–4.
154. **Heinrichs DE, Poole K.** 1996. PchR, a regulator of ferripyochelin receptor gene (*fptA*) expression in *Pseudomonas aeruginosa*, functions both as an activator and as a repressor. *J Bacteriol* **178**:2586–92.
155. **Heinrichs DE, Poole K.** 1993. Cloning and sequence analysis of a gene (*pchR*) encoding an AraC family activator of pyochelin and ferripyochelin receptor synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **175**:5882–9.
156. **Anderson ES, Paulley JT, Roop RM.** 2008. The AraC-like transcriptional regulator DhbR is required for maximum expression of the 2,3-dihydroxybenzoic acid biosynthesis genes in *Brucella abortus* 2308 in response to iron deprivation. *J Bacteriol* **190**:1838–42.
157. **Hollander A, Mercante AD, Shafer WM, Cornelissen CN.** 2011. The iron-repressed, AraC-like regulator MpeR activates expression of *fetA* in *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* **79**:4764–76.
158. **Gaballa A, Helmann JD.** 2007. Substrate induction of siderophore transport in *Bacillus subtilis* mediated by a novel one-component regulator. *Mol Microbiol* **66**:164–73.
159. **Anderson MT, Armstrong SK.** 2004. The BfeR regulator mediates enterobactin-inducible expression of *Bordetella* enterobactin utilization genes. *J Bacteriol* **186**:7302–11.
160. **Michel L, González N, Jagdeep S, Nguyen-Ngoc T, Reimann C.** 2005. PchR-box recognition by the AraC-type regulator PchR of *Pseudomonas aeruginosa* requires the siderophore pyochelin as an effector. *Mol Microbiol* **58**:495–509.
161. **Brickman TJ, Kang HY, Armstrong SK.** 2001. Transcriptional activation of *Bordetella* alcaligin siderophore genes requires the AlcR regulator with alcaligin as inducer. *J Bacteriol* **183**:483–9.
162. **Carter RA, Worsley PS, Sawers G, Challis GL, Dilworth MJ, Carson KC, Lawrence JA,**

- Wexler M, Johnston AW, Yeoman KH.** 2002. The vbs genes that direct synthesis of the siderophore vicibactin in *Rhizobium leguminosarum*: their expression in other genera requires ECF sigma factor Rpol. *Mol Microbiol* **44**:1153–1166.
163. **Braun V, Mahren S, Ogierman M.** 2003. Regulation of the Fecl-type ECF sigma factor by transmembrane signalling. *Curr Opin Microbiol* **6**:173–80.
164. **Rossi MS, Paquelin A, Ghigo JM, Wandersman C.** 2003. Haemophore-mediated signal transduction across the bacterial cell envelope in *Serratia marcescens*: the inducer and the transported substrate are different molecules. *Mol Microbiol* **48**:1467–1480.
165. **Pressler U, Staudenmaier H, Zimmermann L, Braun V.** 1988. Genetics of the iron dicitrate transport system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **170**:2716–24.
166. **Sambrook E. F. Fritsch and T. Maniatis J.** 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.
167. **Beringer JE.** 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* **84**:188–198.
168. **Finan TM, Hartweig E, LeMieux K, Bergman K, Walker GC, Signer ER.** 1984. General transduction in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **159**:120–124.
169. **Amarelle V, Koziol U, Rosconi F, Noya F, O'Brian MR, Fabiano E.** 2010. A new small regulatory protein, HmuP, modulates haemin acquisition in *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology* **156**:1873–1882.
170. **Humann JL, Ziemkiewicz HT, Yurgel SN, Kahn ML.** 2009. Regulatory and DNA repair genes contribute to the desiccation resistance of *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. *Appl Env Microbiol* **75**:446–453.
171. **Yang J, Sangwan I, Lindemann A, Hauser F, Hennecke H, Fischer HM, O'Brian MR.** 2006. *Bradyrhizobium japonicum* senses iron through the status of haem to regulate iron homeostasis and metabolism. *Mol Microbiol* **60**:427–437.
172. **Allaway D, Schofield NA, Leonard ME, Gilardoni L, Finan TM, Poole PS.** 2001. Use of differential fluorescence induction and optical trapping to isolate environmentally induced genes. *Env Microbiol* **3**:397–406.

173. **Figurski DH, Helinski DR.** 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:1648–1652.
174. **Platero RA, Jauregui M, Battistoni FJ, Fabiano ER.** 2003. Mutations in sit B and sit D genes affect manganese-growth requirements in *Sinorhizobium meliloti*. *FEMS Microbiol Lett* **218**:65–70.
175. **Friedman YE, O'Brian MR.** 2004. The ferric uptake regulator (Fur) protein from *Bradyrhizobium japonicum* is an iron-responsive transcriptional repressor in vitro. *J Biol Chem* **279**:32100–5.
176. **Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ.** 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* **17**:914–21.
177. **Platero RA, Jauregui M, Battistoni FJ, Fabiano ER.** 2003. Mutations in sit B and sit D genes affect manganese-growth requirements in *Sinorhizobium meliloti*. *FEMS Microbiol Lett* **218**:65–70.
178. **Schlüter J-P, Reinkensmeier J, Daschkey S, Evguenieva-Hackenberg E, Janssen S, Jänicke S, Becker JD, Giegerich R, Becker A.** 2010. A genome-wide survey of sRNAs in the symbiotic nitrogen-fixing alpha-proteobacterium *Sinorhizobium meliloti*. *BMC Genomics* **11**:245.
179. **van Hijum SAFT, Medema MH, Kuipers OP.** 2009. Mechanisms and evolution of control logic in prokaryotic transcriptional regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**:481–509, Table of Contents.
180. **Van Assche E, Van Puyvelde S, Vanderleyden J, Steenackers HP.** 2015. RNA-binding proteins involved in post-transcriptional regulation in bacteria. *Front Microbiol* **6**:141.
181. **Mackie GA.** 2013. RNase E: at the interface of bacterial RNA processing and decay. *Nat Rev Microbiol* **11**:45–57.
182. **Kaberdin VR.** 2003. Probing the substrate specificity of *Escherichia coli* RNase E using a novel oligonucleotide-based assay. *Nucleic Acids Res* **31**:4710–6.
183. **Meade HM, Long SR, Ruvkun GB, Brown SE, Ausubel FM.** 1982. Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced

- by transposon Tn5 mutagenesis. *J Bacteriol* **149**:114–122.
184. **Amarelle V, Koziol U, Rosconi F, Noya F, O'Brian MR, Fabiano E.** 2010. A new small regulatory protein, HmuP, modulates haemin acquisition in *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology* **156**:1873–1882.
 185. **Chao T-C, Buhrmester J, Hansmeier N, Pühler A, Weidner S.** 2005. Role of the regulatory gene *rirA* in the transcriptional response of *Sinorhizobium meliloti* to iron limitation. *Appl Environ Microbiol* **71**:5969–82.
 186. **Hanahan D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**:557–580.
 187. **Ditta G, Stanfield S, Corbin D, Helinski DR.** 1980. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**:7347–7351.
 188. **Benevides-Matos N, Biville F.** 2010. The Hem and Has haem uptake systems in *Serratia marcescens*. *Microbiology*, 2010/03/20 ed. **156**:1749–1757.
 189. **Ampe F, Kiss E, Sabourdy F, Batut J.** 2003. Transcriptome analysis of *Sinorhizobium meliloti* during symbiosis. *Genome Biol* **4**:R15.
<http://genomebiology.com/2003/4/2/R15>.
 190. **Dupont L, Alloing G, Pierre O, El Msehli S, Hopkins J, Hérouart D, Frendo P.** 2012. The Legume Root Nodule: From Symbiotic Nitrogen Fixation to Senescence, p. 138–168. *In* Nagata, T (ed.), *Senescence*. InTech.
 191. **Kereszt A, Mergaert P, Kondorosi E.** 2011. Bacteroid development in legume nodules: evolution of mutual benefit or of sacrificial victims? *Mol Plant Microbe Interact* **24**:1300–9.
 192. **Létoffé S, Heuck G, Delepelaire P, Lange N, Wandersman C.** 2009. Bacteria capture iron from heme by keeping tetrapyrrol skeleton intact. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:11719–24.
 193. **Gullotta F, di Masi A, Coletta M, Ascenzi P.** CO metabolism, sensing, and signaling. *Biofactors* **38**:1–13.

194. **Kim HP, Ryter SW, Choi AMK.** 2006. CO as a cellular signaling molecule. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **46**:411–49.
195. **Wareham LK, Begg R, Jesse HE, Van Beilen J, Ali S, Svistunenko D, McLean S, Hellingwerf K, Sanguinetti G, Poole RK.** 2016. Carbon monoxide gas is not inert, but global, in its consequences for bacterial gene expression, iron acquisition and antibiotic resistance. *Antioxid Redox Signal*.
196. **Zacharia VM, Shiloh MU.** 2012. Effect of carbon monoxide on *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Med Gas Res* **2**:30.
197. **Nishimura K, Addy C, Shrestha R, Voet ARD, Zhang KYJ, Ito Y, Tame JRH.** 2015. The crystal and solution structure of YdiE from *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr Sect F, Struct Biol Commun* **71**:919–24.
198. **Luscombe NM, Austin SE, Berman HM, Thornton JM.** 2000. An overview of the structures of protein-DNA complexes. *Genome Biol* **1**:REVIEWS001.
199. **Weissbach H, Brot N.** 1991. Regulation of methionine synthesis in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**:1593–7.
200. **Raumann BE, Rould MA, Pabo CO, Sauer RT.** 1994. DNA recognition by beta-sheets in the Arc repressor-operator crystal structure. *Nature* **367**:754–7.
201. **Allen MD, Yamasaki K, Ohme-Takagi M, Tateno M, Suzuki M.** 1998. A novel mode of DNA recognition by a beta-sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA. *EMBO J* **17**:5484–96.
202. **Fadeev EA, Sam MD, Clubb RT.** 2009. NMR structure of the amino-terminal domain of the lambda integrase protein in complex with DNA: immobilization of a flexible tail facilitates beta-sheet recognition of the major groove. *J Mol Biol* **388**:682–90.
203. **Yamasaki K, Kigawa T, Seki M, Shinozaki K, Yokoyama S.** 2013. DNA-binding domains of plant-specific transcription factors: structure, function, and evolution. *Trends Plant Sci* **18**:267–76.
204. **Ohme-Takagi M, Shinshi H.** 1995. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell* **7**:173–82.

205. **Papenfort K, Vanderpool CK.** 2015. Target activation by regulatory RNAs in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **39**:362–78.
206. **Gutiérrez P, Li Y, Osborne MJ, Pomerantseva E, Liu Q, Gehring K.** 2005. Solution structure of the carbon storage regulator protein CsrA from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**:3496–501.
207. **Rife C, Schwarzenbacher R, McMullan D, Abdubek P, Ambing E, Axelrod H, Biorac T, Canaves JM, Chiu H-J, Deacon AM, DiDonato M, Elsliger M-A, Godzik A, Grittini C, Grzechnik SK, Hale J, Hampton E, Han GW, Haugen J, Hornsby M, Jaroszewski L, Klock HE, Koesema E, Kreuzsch A, Kuhn P, Lesley SA, Miller MD, Moy K, Nigoghossian E, Paulsen J, Quijano K, Reyes R, Sims E, Spraggon G, Stevens RC, van den Bedem H, Velasquez J, Vincent J, White A, Wolf G, Xu Q, Hodgson KO, Wooley J, Wilson IA.** 2005. Crystal structure of the global regulatory protein CsrA from *Pseudomonas putida* at 2.05 Å resolution reveals a new fold. *Proteins* **61**:449–53.
208. **Morris ER, Hall G, Li C, Heeb S, Kulkarni RV, Lovelock L, Silistre H, Messina M, Cámara M, Emsley J, Williams P, Searle MS.** 2013. Structural Rearrangement in an RsmA/CsrA Ortholog of *Pseudomonas aeruginosa* Creates a Dimeric RNA-Binding Protein, RsmN. *Structure* **21**:1659–1671.
209. **Marden JN, Diaz MR, Walton WG, Gode CJ, Betts L, Urbanowski ML, Redinbo MR, Yahr TL, Wolfgang MC.** 2013. An unusual CsrA family member operates in series with RsmA to amplify posttranscriptional responses in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:15055–60.
210. **Heeb S, Kuehne SA, Bycroft M, Crivii S, Allen MD, Haas D, Cámara M, Williams P.** 2006. Functional analysis of the post-transcriptional regulator RsmA reveals a novel RNA-binding site. *J Mol Biol* **355**:1026–36.
211. **Lunde BM, Moore C, Varani G.** 2007. RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**:479–90.
212. <http://www.ebi.ac.uk/pdbe/>.