



CENTRO DE INVESTIGACION Y ASISTENCIA EN TECNOLOGIA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO A.C.



ACTA DE EXAMEN DE GRADO

En la ciudad de Guadalajara, Jalisco a los 20 dias del mes de febrero del año 2013, siendo las 13:00 hrs., se reunieron en la Sala Ejecutiva del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. los señores integrantes del Jurado de Examen de Grado constituido por:

Presidente: Dr. Luis López Pérez

Secretaria: Dra. Sara Elisa Herrera Rodríguez

Vocal 1: Dr. Philippe Christian Marc Lobit

Vocal 2: Dr. Joaquín Alejandro Qui Zapata

Vocal 3: Dr. Gabriel Rincon Enriquez

y de acuerdo con las disposiciones del Reglamento vigente se procedió a llevar a cabo el Examen de Grado a Diego Eloyr Navarro López egresado de la Maestría en Ciencias de la Floricultura. Tomando en cuenta los señores del Jurado de Examen de Grado los resultados de la Tesis y la defensa del Proyecto de Investigación: "ESTUDIO DEL SISTEMA DE BIOGÉNESIS DE CENTROS HIERRO – AZUFRE [Fe-S] SC DE Pseudomonas syringae pv. Phaseolicola Y SU POSIBLE IMPLICACIÓN EN SU VIRULENCIA", dictaminaron que fuera (APROBADO). El Presidente del Jurado le hizo saber al sustentante el resultado obtenido, dándose por terminado el Examen de Grado a las 15:00 horas del día señalado. Se asentó la presente en el libro de actas para exámenes de grado número I a las 7 Y 8 fojas, autorizado por la Dirección de Investigación de este centro con fecha 20 de febrero de 2013 y una vez escrita, leída y aprobada la firmaron para dar constancia las persopars que en el acto intervinieron.

luis laper le

harbi 28 105/13 5. Dige Elys Hear

Sara Elisa Horran Rei

Longvin Qui Zapato

Gabriel Rincon Enriquez





Guadalajara Jalisco, 5 de febrero de 2013.

Núm. de oficio: BV008/13 Asunto: Liberación de tesis de M. en C.

M. G. Fátima G. Ordóñez de la Cruz Coordinadora de Posgrado y Gestión de Estudiantes, CIATEJ A.C. P r e s e n t e .

Sirva el presente de conducto para saludarle cordialmente. En el marco del proyecto "El regulador IscR en la patogenicidad de *Pseudomonas syringae* para el desarrollo de estrategias de control biológico en fríjol" bajo mi responsabilidad, distraigo su atención con el objetivo de infórmele acerca de la liberación del manuscrito de tesis de maestría para revisión por su jurado examinador, los datos de dicho trabajo son los siguientes:

Nombre de estudiante: DIEGO ELOYR NAVARRO LÓPEZ.

Titulo de tesis: "ESTUDIO DEL SISTEMA DE BIOGÉNESIS DE CENTROS HIERRO-AZUFRE [Fe-S] ISC DE Pseudomonas syringae pv. phaseolicola Y SU POSIBLE IMPLICACIÓN EN SU VIRULENCIA"
Posgrado: CIENCIAS DE LA FLORICULTURA.
Grado: MAESTRIA EN CIENCIAS.

Por lo cual solicito se sigan los trámites correspondientes para la presentación del examen de grado de Diego Navarro.

Sin otro asunto por el momento que tratar me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente,

Dr. Gabriel Rincón Enríquez Investigador, Biotecnología Vegetal, CIATEJ Director de tesis

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Avenida Normalistas 800 • Guadalajara, Jalisco • C.P. 44270 México A.P. 2-191 Tel. (0133) 3345-5200 ext. fax: 1001 • http://www.ciatej.net.mx • e-mail: informes@ciatej.net.mx



Guadalajara, Jalisco a 18 de Febrero de 2013.

Dr. Ernesto Tapia Campos. Coordinador Académico de la Maestría en Ciencias de la Floricultura Guadalajara, Jalisco

El que suscribe Dr. Gabriel Rincón Enríquez director de tesis del estudiante Diego Eloyr Navarro López, una vez leída y revisada la tesis titulada: "ESTUDIO DEL SISTEMA DE BIOGÉNESIS DE CENTROS HIERRO-AZUFRE [Fe-S] ISC DE *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* Y SU IMPLICACIÓN EN SU VIRULENCIA" aceptó que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el alumno para aspirar al grado de Maestro en Ciencias de la Floricultura durante el examen correspondiente.

Y para que así conste se firma la presente a los 20 días del mes de febrero del año 2013.

Director de Tesis Dr. Gabriel Rincón Enríquez CIATEJ, A.C.

Secretaria jurado Dra. Sara Elisa Herrera Rodríguez CIATEJ, A.C.

Vocal jurado Dr. Joaquín Alejandro Qui Zapata CIATEJ, A.C.

illente jurado

Dr. Luis López Pérez IIAF-UMSNH

Vdcyd jurado Dr. Philippe Lobit IIAF-UMSNH



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.



ESTUDIO DEL SISTEMA DE BIOGÉNESIS DE CENTROS HIERRO-AZUFRE [Fe-S] ISC DE Pseudomonas syringae pv. phaseolicola Y SU IMPLICACIÓN EN SU VIRULENCIA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA FLORICULTURA

PRESENTA

DIEGO ELOYR NAVARRO LÓPEZ.

GUADALAJARA, JALISCO, FEBRERO 2013







El trabajo de esta tesis forma parte del proyecto intitulado:

"El regulador IscR en la patogenicidad de *Pseudomonas syringae* para el desarrollo de estrategias de control biológico en fríjol"

Financiado por el Fondo Mixto (FOMIX) del estado de Hidalgo - CONACyT (Convocatoria 2008-01). Clave del proyecto 97905 Líder de proyecto: Dr. Gabriel Rincón Enríquez

La presente investigación se desarrolló en el laboratorio de la Unidad de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del estado de Jalisco (CIATEJ) A.C. Bajo la dirección y asesoría de los Drs. Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar, Patricia Dupré y Gabriel Rincón Enríquez.





DEDICATORIA.

A Dios.

Por haberme encaminado a seguir mis estudios y por estar conmigo a lo largo de mi vida. Por haberme dado la paciencia en momentos en los que la perdía y por poner a las personas correctas en mí camino.

A mis padres.

Por haberme brindado su apoyo en todos los aspectos durante toda mi formación tanto personal como académica. Por aconsejarme cada vez que se me cerraba el mundo y quitarme las ideas refutas de mi cabeza.

Por mostrarme que aun cuando se presentan situaciones adversas siempre hay una solución ante todo y que las cosas no pueden ser vistas desde un punto de vista, gracias a eso aprendí a escuchar a las demás personas.

Por mostrarme que después de un gran esfuerzo viene una recompensa aun mayor y que las satisfacciones que generan son mucho más si se comparten.

A mis hermanos.

A Paula, Iván y Tony por estar a mi lado en mis momentos de éxito y de fracaso. Por brindarme su apoyo en todo momento y aconsejarme constantemente.

A mis viejos amigos.

A Iván Quezada por estar brindándome sus consejos, su apoyo incondicional, por darme la mano las veces que fue necesario hacerlo y por compartir su tiempo para escucharme cuando tuve problemas, a Melba por todos estos años que hemos compartido momentos divertidos por brindarme su apoyo cuando recién llegué a esta ciudad, a Viridiana por aconsejarme frecuentemente cuando lo necesitaba y llamarme la atención cuando debía hacerlo. Les agradezco de todo corazón.





AGRADECIMIENTOS.

La presente Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.

Agradezco al Dr. Gabriel Rincón por haber confiado en mi persona y en mi capacidad, por apoyarme brindándome su tiempo durante el desarrollo de mi trabajo, por ayudarme a comprender de una mejor manera mi trabajo. A la Dra. Patricia Dupré por brindarme sus conocimientos ante cualquier duda que le hice extensa y por tenerme la paciencia durante la impartición de los cursos y estoy aún más agradecido por su amistad.

Agradezco a mis amigos, Alma, Tania, Pablo, Silvio y Adrián (el oso) por estar presentes durante mi formación de maestría, por su apoyo, por su honestidad para decirme las cosas (Tania) y por compartir muchos momentos que fueron cruciales en estos dos años de mi vida que los conocí.

Agradezco a los investigadores del área de biotecnología vegetal por haber participado en mi formación de maestría al compartir sus conocimientos conmigo.

Gracias a todos.





CONTENIDO

1		INTF	RODL	JCCIÓN	1		
2		ANT	ECED	DENTES	3		
	2.:	1	EST	RUCTURA DE Los centros HIERRO-AZUFRE [Fe-S] y su implicación biológica	3		
	2.2	2	SIST	EMAS DE BIOGENESIS DE CENTROS [Fe-S]	5		
		2.2.2	1	SISTEMA DE BIOGENESIS NIF	5		
	2.2.2		2	SISTEMA DE BIOGENESIS SUF	7		
	2.2.3		3	EL SISTEMA ISC.	9		
	2.3	3	CON	IDICIONES DETRIMENTALES PARA LA BIOGENESIS DE CENTROS [Fe-S]	.16		
		2.3.3	1	ESTRÉS OXIDATIVO.	.16		
		2.3.2	2 CA	RENCIA EN HIERRO	.18		
3 TIZON DEL HALO PROVOCADO POR <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> EN FRIJOL (<i>Phaseoulus vulaaris L</i> .).							
	3.1	1	INTE	ERACCIÓN de <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> Y SU HOSPEDERO	.21		
4		HIPC	ÓTESI	IS	.24		
5		OBJI	ΕΤΙνα	D GENERAL	.24		
6		OBJI	ΕΤΙνα	DS PARTICULARES.	.24		
7		MAT	ΓERIA	LES Y METODOS	.25		
7.1 CEPAS BACTERIANAS Y MEDIOS DE CULTIVO				AS BACTERIANAS Y MEDIOS DE CULTIVO	.25		
	7.2	2	ANÁ	LISIS BIOINFORMÁTICO.	.25		
	7.3	3	CÉLI	JLAS ELECTROCOMPETENTES.	.25		
		7.3.2	1	Escherichia coli.	.25		
		7.3.2	2	P. syringae pv. phaseolicola.	.25		
	7.4	4	Extr	acción de ADN de <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	.26		
	7.	5	REA	CCIÓN DE AMPLIFICACIÓN DE ADN POR PCR Y PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS	.26		
	7.6	6	LIGA	ACIÓN	.27		
	7.7	7	ELEC	CTROTRANSFORMACIÓN DE <i>E. coli.</i>	.29		
	7.8	8	ELAI	BORACIÓN DE CONSTRUCCIÓN PARA EL MUTANTE NULO <i>iscU.</i>	.29		
	7.9	9	CON	ISTRUCCIÓN DEL MUTANTE CONDICIONAL ISC EN P. svringae pv. phaseolicola	.29		
	7.: NI	10 JLO	TRA iscU.	NSFORMACIÓN DE <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> PARA OBTENCION DEL MUTANTE	.30		
	7.	11	CAR	ACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS MUTANTES DE P. syringae pv. phaseolicola	.31		





	7.11.1	CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE P. syringae pv. phaseolicola.	31
	7.11.2 OXIDATI	CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS DNL001 Y DNL002 EN CONDICIONES DE ESTRI IVO Y CARENCIA EN HIERRO	ÉS 32
	7.11.3	EVALUACION DE LA VIRULENCIA	32
	7.11.4	PRUEBA DE PRODUCCIÓN DE FASEOLOTOXINA	33
8	RESULTA	ADOS Y DISCUSIÓN	34
	8.1 COI pv. <i>phaseo</i>	NTEXTO GENÉTICO DE LOS SISTEMAS DE BIOGÉNESIS DE CENTROS [Fe-S] de <i>P. syi</i> plicola CON RESPECTO A A. vinelandii, E. coli y D. dadantii	ringae 34
	8.2 ANA SISTEMA IS	ÁLISIS DE LAS CONSTRUCCIONES GENÉTICAS UTILIZADAS PARA LA MUTAGÉNESIS SC	DEL 38
	8.2.1	ANÁLISIS DE LA CONSTRUCCIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE LA CEPA DNL001	38
	8.2.2	ANÁLISIS DE LA CONSTRUCCIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE LA CEPA DNL002	38
	8.3 AN	ÁLISIS DE LAS INSERCIONES EN LA CEPA P. syringae pv. phaseolicola	40
	8.3.1	ANÁLISIS DE LA CEPA DNL001.	40
	8.3.2	ANÁLISIS DE LA CEPA DNL002.	41
	8.4 EFE DNL002 DE	ECTO DE LAS INSERCIONES EN EL CRECIMIENTO BACTERIANO DE LAS CEPAS DNLO E <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>)1 Y 45
	8.5 EFE DELIMITAN	ECCTO de IAS INSERCIONES DE LAS CEPAS DNL001 Y DNL002 EN CONDICIONES NTES PARA LA BIOGÉNESIS DE LOS CENTROS [Fe-S]	49
	8.5.1	ESTRÉS OXIDATIVO DE TIPO SUPEROXIDO	49
	8.5.2	ESTRÉS POR CARENCIA EN HIERRO PROVOCADO POR DYPIRIDIL	52
	8.6 EFE PLANTAS D	ECTO DE LAS INSERCIONES SOBRE LA VIRULENCIA DE P. syringae pv. phaseolicola DE FRIJOL (Phaseolus vulgaris).	EN 55
	8.7 EFE	ECTO DE LAS INSERCIONES SOBRE LA PRODUCCIÓN DE FASEOLOTOXINA	60
9	CONCLU	JSIONES	62
10) PERSP	PECTIVAS	63
11	L BIBLIC	DGRAFÍA	65





Figura 1. Representaciones esquemáticas de centros hierro-azufre [Fe-S] más comunes que se han encontrado en la mayoría de las proteínas. Se han reportado proteínas con centros [2Fe-2S] (a), [4Fe-S] (b) y menos común con centros [8Fe-8S] (c). Figuras en azul representan átomos de hierro (Fe) y figuras en Figura 2. Representación esquemática de los centros metálicos de la proteína nitrogenada. El cofactor FeMoco (a) y el centro P en estado reducido (b). Los aminoácidos ligados a FeMo-co son α -Cys²⁷⁵ y α -His⁴⁴², los ligados al centro P se muestran como α-Cys⁸⁸ y β-Cys⁹⁵. Los átomos de cada componente son: el hierro= magenta, el molibdeno= gris, el azufre= amarillo, el carbono= verde, el oxígeno= rojo y el nitrógeno= azul.....6 Figura 3. Representación esquemática de la síntesis del cofactor FeMo-co para la maduración de la proteína FeMo de la nitrogenasa. Primero se sintetiza un polipéptido tetramérico $\alpha 2\beta 2$ NifEN en el cual se forma una matriz junto con NifB que previamente interacciona con NifUS para dotarse de un centro [Fe-S] y generar un precursor. Después se genera la inserción de la molécula de Mo mediante la interacción de una proteína de Fe generando el cofactor FeMo-co cargado en NifEN el cual se transporta a la apoproteína FeMo que es producto de los genes *nifDK* (Modificado a partir de Rubio y Ludden, 2005)......7 Figura 4. Representación esquemática del sistema SUF para la biosíntesis de centros [Fe-S]. El complejo SufBCD permite el ensamble del centro [Fe-S], mediante el acoplamiento de una fuente de Fe y la interacción del complejo SufSE que proporciona el azufre. El centro es transportado a SufA que permite la translocación a las apoproteínas con centros [Fe-S] (Modificado a partir de Chahal et al., 2009 y Saini et al., 2010)......9 Figura 5. Representación esquemática del operón ISC. El gen *iscR* codifica por una proteína reguladora, iscS por una cisteína desulfurasa, una proteína de andamio IscU, una de función aun sin ser completamente caracterizada IscA y las proteínas accesorias HscBA-Fdx......9 Figura 6. Diagrama general de la biogénesis de los centros [Fe-S] por el sistema ISC. Este sistema comprende la participación de una proteína IscU que ensambla el centro, una proteína IscS que dona el azufre, una fuente de hierro aún sin identificar, una ferredoxina (Fdx) que genera una reducción para el acoplamiento del centro en IscU y dos cochaperonas (HscAB) que interaccionan con IscU para el transporte del centro hacia Figura 7. Representación esquemática de la regulación del operón ISC por IscR. Cuando IscR se encuentra en apoforma libera la zona promotora de iscR permitiendo la transcripción del policistron iscRSUAhscABfdx. Cuando se activa la biosíntesis del centro [Fe-S] y se transporta a IscR, este se encuentra en su estado holoforma y por lo tanto se encuentra reprimiendo la zona promotora de IscR (Modificado a partir de Py Figura 8. Representación esquemática de la catálisis generada por la cisteína desulfurasa y su función como fuente de azufre para el centro [Fe-S]. IscS cataliza la desulfuración de la L-cisteina secuestrando al azufre en un sitio específico sin liberarlo en solución, generando una fuente de azufre para la proteína de Figura 9. Modelo de ensamblaje secuencial del centro [4Fe-4S] en una proteína de andamio de tipo U (IscU). IscU forma un intermediario [2Fe-2S] en cada una de las unidades del dímero, posteriormente mediante una reducción generada por Fdx se permite el acoplamiento de los dos [2Fe-2S] generando un complejo IscU-Figura 10. Esquematización de la función de las chaperonas HscA y HscB en la translocación del centro [Fe-S] a una apoferredoxina. La estructura IscU [S] permite el acoplamiento de HscB al que es unido HscA después de una hidrolisis de la molécula de ATP que permite el acoplamiento del centro [2Fe-2S] a la apoferredoxina liberando a HscB del complejo. Mediante una fosforilación de HscA es liberado de IscU Figura 11. Inactivación de proteínas [Fe-S] mediante la degradación de su centro [Fe-S]. Se muestra la forma en la que el centro [Fe-S] puede ser degradado por agentes oxidantes como ROS, peroxinitrito y metales como Cu, se genera la liberación de Fe²⁺ que al acumularse puede generar la formación de radicales OH que se





Figura 12. Desarrollo de síntomas del tizón del halo en hojas de frijol (Phaseolous vulgaris L.). (a) Hoja sana. (b) 10 días después de infección. (c) 30 días después de la infección se puede observar la aparición de clorosis gradual en las hojas hasta ocasionar la muerte del tejido......21 Figura 13. Esquema general del mapa del vector pGemT (Invitrogen) utilizado como vector de Figura 14. Representación de la construcción pG-Cond-iscS. Construcción utilizada para obtención de Figura 15. Representación esquemática del contexto genético sistema de biogénesis ISC. Se analizó la presencia del sistema ISC compuesto de los genes iscRSUA-hscBA-fdx y genes río abajo y río arriba que comprenden su contexto genético de P. syringae pv. phaseolicola (1448A)y se comparon con el de A. Figura 16. Análisis de secuencias de los aminoácidos y regiones conservadas de las proteínas IscR e IscU. Se analizaron las secuencias aminoacídicas de las proteínas IscR (a) e IscU (b) del sistema ISC presentes en P. syringae py. phaseolicola 1448A y se compararon con las de Azotobacter vinelandii, Escherichia coli, Dickeya dadantii. Los aminoácidos resaltados en rojo indican sitios altamente conservados entre las proteínas. Los aminoácidos resaltados con azul muestran las regiones menos conservadas. Las flechas de color negro en IscR (a) indican la posición de la región conervada CysX5CysX5CysX2His. Las flechas de color azul en IscU (b) indican la presencia de la región conservada Cys³⁷Cys⁶³Cys¹⁰⁶. El símbolo de corchete indica la región Figura 17. Análisis de restricción de la construcción pG-Cond-iscS. En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular (1KB plus DNA ladder, Invitrogen), en el segundo carril se muestra el producto de la digestión de pG-Cond-iscS con la enzima HpaI y en el tercer carril se muestra el plásmido pG-Cond-iscS Figura 18. Representación esquemática del análisis de restricción in silico con la enzima XcmI de la construcción del plásmido pG-RiscU::kmR. Los fragmentos esperados son de 3.39, 1.9, 1.2 y 0.84 Kpb en el Figura 19. Verificación de la construcción para mutagenizar el gen iscU. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular (1KB plus DNA ladder, Invitrogen), el carril 2 muestra el resultado de la digestión del plásmido pG-RiscU::km^R con la enzima XcmI. El carril 3 muestra el plásmido (pG-RiscU::km^R) sin Figura 20. Verificación del mutante condicional ISC (DNL001). La figura (a) muestra la amplificación de la cassette aadA7(Spc^R)-araC-pBAD de una cepa con recombinación del plásmido; la figura (b) muestra el fragmento río abajo de la cassette donde se muestra la amplificación de los fragmentos de forma homogénea en la cepa silvestre y la cepa DNL001. En los carriles 1 se muestra el marcador de peso molecular (1KB plus DNA ladder, invitrogen), 2 y 3 se muestran los productos de las reacciones de PCR. Los signos de Figura 21. Liberación del fragmento RiscU::KmR del plásmido PGUkmR. El carril 1 muestra el marcador de peso molecular (1KB plus DNA ladder, Invitrogen), el carril 2 muestra el producto de la digestión del plásmido con la enzima EcoRI......41 Figura 22. Análisis por PCR del mutante iscU (DNL002) para la verificación de la recombinación. En los carriles 1 se muestra el marcador de peso molecular (1KB plus DNA ladder, Invitrogen), en el carril 2 se muestra la amplificación del gen iscU en la cepa silvestre y en el carril 3 se muestra la amplificación del gen *iscU* silvetre y mutado de la cepa DNL002......42 Figura 23. Análisis por PCR de la cepa DNL002 para la verificación de la zona de recombinación. En los carriles 1 se muestra el marcador de peso molecular (1KB plus DNA ladder, Invitrogen) y en los carriles 2 se muestran los productos del PCR a partir del genoma de la cepa DNL002......43 Figura 24. Representación esquemática general de la recombinación del gen iscU mutado en el operón ISC del genoma de la cepa DNL002. En el esquema se muestran las posiciones de los oligonucleótidos utilizados para la búsqueda de la mutación los sentidos de cada uno y los tamaños de amplicones......44 Figura 25. Representación esquemática de las regiones intergénicas de P. syringae pv. phaseolicola. Se realizó el análisis mediante un BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) utilizando los oligonucleótidos L1 y G1





(Cuadro 1). Se determinaron los operones que codifican por los genes ribosomales rrsA-rrlA-rrfA, rrsB-rrlBrrfB, rrfC-rrlC-rrsC, rrfD-rrlD-rrsD y rrfE-rrlE-rrsE......44 Figura 26. Amplificación por PCR de las regiones intergénicas ribosomales (ITS) de la cepa DNL001 y DNL002. En los carriles 1 se muestra el marcador de peso molecular (1KB plus DNA ladder, Invitrogen), en los carriles 2 se encuentra el ITS de cepas DNL001 y DNL002; en los carriles 3 se muestra el ITS de la cepa silvestre......45 Figura 27. Cinética de crecimiento bacteriano de las cepas DNL001 y la cepa silvestre en medio rico KB. Este experimento se observó durante 8 horas consecutivas y se determinó en las primeras 6 horas su fase exponencial, por último se observó una lectura a las 24 horas después del inóculo para determinarlo como crecimiento final. Las flechas indican los puntos en donde se observó la fase exponencial de cada una de las cepas. La denotación 1448A se refiere a la cepa silvestre de P. siringae pv. phaseolicola. Este grafico es el Figura 28. Efecto del promotor pBAD sobre la cinética de crecimiento bacteriano de las cepas DNL001. El rótulo "a" indica que la cinética de la cepa se desarrolló en presencia de arabinosa, "g" indica que la cinética de la cepa fue en presencia de glucosa. Este experimento se observó durante 8 horas consecutivas y se determinó en las primeras 6 horas su fase exponencial, por último se observó una lectura a las 24 horas después del inóculo para determinarlo como crecimiento final y las observaciones se compararon con la cepa silvestre. La flecha indica los puntos en donde se observó la fase exponencial de cada una de las cepas. La denotación 1448A se refiere a la cepa silvestre de P. siringae pv. phaseolicola. Este grafico es el resultado representativo Figura 29. Cinética de crecimiento bacteriano de las cepas DNL002 y silvestre. Este experimento se observó durante 8 horas consecutivas y se determinó en las primeras 6 horas su fase exponencial, por último se observó una lectura a las 24 horas después del inóculo para determinarlo como crecimiento final. La flecha indica el punto en donde se observó la fase exponencial de cada una de las cepas. La denotación 1448A se refiere a la cepa silvestre de *P. siringae* pv. *phaseolicola*. Este grafico es el resultado representativo de cuatro Figura 30. Evaluación del estrés oxidativo provocado por el paraquat (PQ) en la cepa DNL001. Se evaluaron las diluciones seriales tanto de la cepa DNL001 como de la cepa silvestre de 0 hasta 10^{-6} en medio rico KB con presencia de distintas concentraciones de PQ. Se muestra una deficiencia de crecimiento a partir de 10 µM de paraquat en la cepa mutante. La cepa silvestre comenzó a mostrar un fenotipo de susceptibilidad a una concentración de 20 µM de paraquat, a diferencia del mutante que mostró deficiencia de crecimiento a partir de la concentración de 10 µM de paraquat. El resultado es representativo de 3 experimentos Figura 31. Evaluación del efecto de la inducción del promotor pBAD de la cepa DNL001 en presencia de estrés oxidativo. Se inocularon diluciones seriales de la cepa silvestre (a) y de la cepa DNL001 (b) de 0 hasta 10^{-6} y se analizaron en presencia tanto de arabinosa y de glucosa en medio rico con distintas concentraciones de PQ. Se observa un incremento en la resistencia a una concentración de 20 µM de PQ en la cepa DNL001 en presencia de arabinosa en comparación con glucosa sin ser significativo, mientras en la silvestre con arabinosa o glucosa a una concentración de 20 µM de PQ no se muestra diferencias significativas......51 Figura 32. Evaluación del efecto del estrés oxidativo generado por PQ en la cepa DNL002. Se inocularon diluciones seriales de 0 hasta 10⁻⁶ tanto de la cepa silvestre como de DNL002 sobre medio rico en presencia de Figura 33. Evaluación del estrés por carencia en hierro provocado por dypiridil (DIP) en la cepa DNL001 y silvestre en medio rico KB. Se evaluaron las diluciones seriales de las cepas DNL001 y silvestre de 0 hasta 10^{-6} , en las que se muestra una deficiencia de crecimiento a partir de 150 μ M de DIP en la cepa DNL001. La cepa silvestre comenzó a mostrar un fenotipo de sensibilidad más aparente en una concentración de 600 µM de DIP......53 Figura 34. Evaluación del efecto de la inducción del promotor pBAD de la cepa DNL001 en presencia de estrés por carencia en hierro. Se analizó el efecto provocado por dypiridil (DIP) sobre la fisiología de la cepa DNL001 y silvestre en medio rico KB. Se evaluaron las diluciones seriales de la cepa silvestre (a) y de la cepa DNL001 (b) de 0 hasta 10^{-6} y se analizaron en presencia tanto de arabinosa y de glucosa. Se observa una





sensibilidad de la cepa DNL001 a una concentración de 300 µM de DIP en presencia arabinosa ó glucosa; además en la cepa silvestre el estrés por carencia en hierro en presencia de arabinosa o glucosa no mostró Figura 35. Evaluación del estrés por carencia en hierro provocado por el dypiridil (DIP) de la cepa DNL002. Se evaluaron las cepas DNL002 y silvestre en medio rico KB bajo condiciones limitantes de hierro, se inocularon diluciones seriales tanto de la cepa DNL001 como de la cepa silvestre de 0 hasta 10^{-6} , en las que la cepa DNL002 no presentó alguna diferencia significativa en el crecimiento en comparación con la cepa Figura 36. Escala de medición de la virulencia de P. syringae py. phaseolicola 1448A. Los síntomas observados fueron realizados en un periodo de 24 días después de la inoculación. Los síntomas comienzan con la clorosis en el sitio de infección y se expande hasta alcanzar todo el foliolo y generar el desprendimiento del mismo. Los cuadros mostrados en la parte superior son los colores usados para cada grado de virulencia en los Figura 37. Escala de medición de la virulencia de P. syringae py. phaseolicola 1448A. Se infectaron plantas de frijol con la cepa DNL001 (a) y silvestre (b) observando la sintomatología durante un periodo de 24 días. Los síntomas fueron apareciendo más rápidamente en la cepa silvestre, se observa claramente que la evolución de la virulencia de la cepa DNL001 se presentó con mayor deficiencia debido que presento hasta el Figura 38. Evaluación de la virulencia las cepas DNL001 y silvestre en presencia de arabinosa. Se evaluó la evolución de la virulencia sobre hojas de plantas de fríjol durante un periodo de 24 días. Los síntomas fueron apareciendo más rápidamente en la cepa silvestre, además se observó que la cepa DNL001 mostró una disminución en la capacidad de virulencia respecto a la cepa silvestre, pero la presencia del síntoma 5 tanto en DNL001 y la cepa silvestre fue casi la misma proporción sin embargo no logró recuperar el fenotipo de la cepa Figura 39. Evaluación de la virulencia las cepas DNL001 y silvestre en presencia de glucosa. Se evaluó la evolución de la virulencia sobre hojas de plantas de fríjol durante un periodo de 24 días. Los síntomas en hojas con la cepa silvestre apareciendo más rápidamente que en DNL001, además se observó que la cepa DNL001 disminuyo su capacidad de virulencia al no aparecer el síntoma 5 al término del periodo de experimentación Figura 40. Evaluación de la virulencia de las cepas DNL002 y silvestres. Se analizó la evolución de la virulencia sobre hojas de plantas de fríjol durante un periodo de 24 días. Los síntomas de las dos cepas (DNL002 y silvestre) fueron apareciendo de una forma similar, se observó que el mutante no genero alguna diferencia significativa en el su capacidad de virulencia con respecto a la silvestre. n=18.60 Figura 41. Evaluación de la producción de faseolotoxina. Se analizó la producción en las cepas la silvestre de P. syringae pv. phaseolicola (1), DNL001 sin estímulo (2), DNL001 en presencia de arabinosa (3), DNL001 en presencia de glucosa (4) y la cepa DNL002 (5). Se evaluó la inhibición del crecimiento de E. coli en medio mínimo M9 tanto en ausencia de arginina (a) y el crecimiento presencia (b) de L-arginina. Las flechas rojas indican los sitios donde se agregaron 5 µL de extracto crudo del sobrenadante del cultivo bacteriano (que contenía faseolotoxina). Los puntos blancos que se observan en el medio de cultivo son colonias de E. coli...61





ESTUDIO DEL SISTEMA DE BIOGÉNESIS DE CENTROS HIERRO-AZUFRE [Fe-S] ISC DE *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* Y SU POSIBLE IMPLICACIÓN EN SU VIRULENCIA

RESUMEN

Pseudomonas syringae es el fitopatógeno bacterial número uno entre las diez bacterias más importantes a nivel de enfermedades en plantas debido a su amplia cantidad de patovares, lo cual le permite a P. syringae adaptarse e infectar una gran diversidad de plantas de importancia agrícola. El patovar phaseolicola causa el tizón del halo, una de las enfermedades más frecuentes y económicamente importantes de los granos de Phaseolus (frijol, habichuelas, etc.). Este fitopatógeno al interaccionar con su hospedero se enfrenta a la generación de estrés oxidativo y la limitación de nutrientes, como el hierro, que le permiten a la bacteria reproducirse. Se han propuesto a los sistemas de biogénesis de centros [Fe-S] como un mecanismo para la adaptación de los microorganismos a condiciones hostiles como el estrés generado por un agente supero oxido y la carencia en hierro, además de estar relacionados con la virulencia de ciertos patógenos como son Dickeya dadantii y Shigella flexneri. Los sistemas de biogénesis de centros [Fe-S] que se conocen a la fecha son NIF, SUF e ISC. En los microorganismos modelo de estudio se han demostrado la presencia de al menos dos de estos sistemas en su genoma (ISC y SUF). En el caso de P. syringae pv. phaseolicola se demostró mediante análisis in silico que posee en su genoma putativamente el sistema ISC como su única maquinaria de biogénesis de centros [Fe-S], por lo que se desarrolló una metodología para estudiar su función biológica en este fitopatógeno. Debido posiblemente a que ISC se trate de un sistema esencial para esta bacteria no fue posible mutagenizar algún gen del sistema, sin embargo se obtuvo una cepa DNL001 con una inserción en su genoma de una construcción que portaba un promotor pBAD y un gen iscS de Dickeya dadantii (inductible con arabinosa), que podría reflejarse en un cambio en la homeostasis de los centros [Fe-S]. Los resultados indicaron que en la cepa DNL001 generó fenotipos de sensibilidad al estrés oxidativo, carencia en hierro y además disminuyó la capacidad de adaptarse al hospedero reflejándose en la disminución de su grado de virulencia en hojas de frijol (P. vulgaris) a pesar que siguió produciendo su principal factor de virulencia, la faseolotoxina. Estos resultados sugieren que el sistema de biogénesis de centros [Fe-S] ISC pudiera estar implicado en la virulencia de P. syringae pv. phaseolicola.





STUDY OF THE IRON-SULFUR CLUSTER [Fe-S] BIOGENESIS ISC OF Pseudomonas syringae pv. phaseolicola AND THEIR POSSSIBLE ROLE IN VIRULENCE

ABSTRAC

Pseudomonas syringae is a plant pathogenic bacteria number one among the ten most important in bacterial plant disease because of its wide range of pathovars, which allows P. syringae adapt and infect a broad array of agriculturally important plants. The pathovar phaseolicola causes halo blight, one of the most prevalent and economically important of Phaseolus beans (beans, beans, etc.). This plant pathogen to interact with their host faces the generation of oxidative stress and nutrient limitation, such as iron, that allow the bacteria reproduce. The [Fe-S] cluster biogenesis system have been proposed as a mechanism for the adaptation of microorganisms to hostile conditions such stress generated by superoxide agent and lack of iron, besides being associated with the virulence of pathogens such as are Dickeya dadantii and Shigella flexneri. The [Fe-S] cluster biosynthesis systems that known to date are NIF, SUF and ISC. In the model study microorganisms have shown the presence of at least two of these systems in genome (ISC and SUF). In the case of *P. syringae* pv. phaseolicola was demonstrated by in silico analysis that putatively only the [Fe-S] cluster assembly system ISC is present in its genome, so we developed a methodology to study its biological function in this plant pathogen. Because the ISC system possibly is a bacterium essential component, was not possible to mutagenize this gene system, however DNL001 strain was obtained by insertion into its genome a construct carrying the pBAD promoter and iscS gene of Dickeya dadantii (inducible with arabinose), and it might be reflected in a homeostatic change of the [Fe-S] clusters. The results indicated that the phenotypes generated by DNL001 strain were sensitivity to oxidative stress, iron deficiency and also decreased the ability to adapt to the host reflected in the decrease of the degree of virulence in bean leaves (Phaseolus vulgaris) despite continued producing its main virulence factor, phaseolotoxin. These results suggest that the [Fe-S] cluster biogenesis system ISC may be involved in the virulence of *P. syringae* pv. phaseolicola.





1 INTRODUCCIÓN.

Los organismos vivos requieren de la absorción, asimilación y síntesis de compuestos que les permiten adaptarse a sus condiciones de desarrollo. Estos compuestos son obtenidos mediante una serie de procesos metabólicos en los que se engloba al anabolismo y al catabolismo. Por lo tanto para que estos procesos se puedan llevar a cabo son necesarias rutas de biosíntesis o degradación que se encuentran estrictamente reguladas y en las que participan una gran cantidad de proteínas que frecuentemente dependen de cofactores que las hacen funcionalmente activas como enzimas, reguladores y transportadores. La mayoría de estos cofactores son químicamente relacionados con vitaminas como son la biotina, el ácido pantoténico, el retinol o tiamina. Otro tipo de cofactor de las proteínas es el llamado centro de hierro-azufre [Fe-S] que en contraste con la mayoría de otros cofactores biológico-orgánicos, estos compuestos son de naturaleza inorgánica y consisten de cationes de hierro (Fe²⁺ ó Fe³⁺) y aniones de azufre (S²⁻). Hasta la fecha se conocen numerosas proteínas de centros [Fe-S] en cada uno de los dominios que corresponden a: Bacteria, Archaea y Eukarya (Balk y Lobreaux, 2005; Lill y Muhlenhoff, 2005).

La importancia del estudio de estos cofactores surge a partir del descubrimiento de la ferredoxina en los años 60 y la gran cantidad de proteínas que hasta la fecha se conoce que contienen centros [Fe-S] demuestran la importancia de su participación como cofactores (Johnson, 1994; Beinert *et al.*, 1997; Beinert, 2000). Además de la versatilidad química tanto del hierro como del azufre permite que estos centros posean una amplia diversidad funcional y estructural, por lo que es importante conocer como estos centros son sintetizados, ensamblados, que rutas de biosíntesis están involucradas y cuál es su participación en la fisiología de los organismos. Se han realizado múltiples trabajos para elucidar estas cuestiones en una amplia variedad de microorganismos, en los que hasta la fecha se ha determinado que existen tres sistemas para la síntesis de estos centros [Fe-S] denominados NIF (*Nitrogen fixation*), SUF (*Sulphur mobilization*) e ISC (*Iron sulphur cluster assembly*). Este conjunto de sistemas son encargados de la maduración de múltiples proteínas ya sean involucradas en el metabolismo tanto aerobio como anaerobio, en proteínas funcionales como reguladores o transportadores y además es importante para la adaptación de los microorganismos a condiciones tanto de estrés oxidativo como de la





limitación de hierro donde la carencia de cada uno de ellos genera deficiencias fisiológicas que afectan a su desarrollo. A diferencia del sistema SUF y NIF el sistema ISC es el único que ha mostrado ser altamente conservado en múltiples organismos de los cuales su genoma ha sido secuenciado, ya sea estudiados (Takahashi y Nakamura, 1999; Tokumoto y Takahashi 2001; Swati *et al.*, 2011) o referidos (Vinella *et al.* 2009) como sistema putativo como es el caso de la bacteria fitopatógena que provoca el tizón del halo en frijol, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola.* Por lo que es importante conocer la función de este sistema ya que algunos reportes (Vinella *et al.*, 2009) demostró que putativamente *P. syringae* pv. *phaseolicola* tiene la proteina IscA que es producto de un gen del operón ISC, lo cual resultaría potencialmente en un sistema genético esencial en el desarrollo y virulencia de esta bacteria. Sin embargo, esto es necesario demostrarlo *in vivo* lo que constituyó el objetivo principal de este trabajo de investigación.





2 ANTECEDENTES.

2.1 ESTRUCTURA DE LOS CENTROS HIERRO-AZUFRE [FE-S] Y SU IMPLICACIÓN BIOLÓGICA.

Los centros [Fe-S] más comunes son los centros [2Fe-2S], [3Fe-4S], [4Fe-4S] y [8Fe-7S] (Figura 1), en donde los iones de hierro son tetraédricamente coordinados por ligandos tiolato de las cadenas laterales de cisteínas de las proteínas. Los grupos sulfuro poseen dos o tres enlaces de coordinación o bien conocido como enlace dativo o enlace dipolar, que es un enlace coordinado en el que cada par de electrones compartido por dos átomos es aportado por uno de ellos (Mansy y Cowan, 2004). Aunque los enlaces que proveen las proteínas son normalmente proporcionados por los residuos de cisteínas, existen otros tipos de ligandos no cisteinil para los centros [Fe-S], que incluyen la unión de la histidina a centros [2Fe-2S] y [4Fe-4S] (Hall *et al.*, 1971; Volbeda *et al.*, 1995).



Figura 1. Representaciones esquemáticas de centros hierro-azufre [Fe-S] más comunes que se han encontrado en la mayoría de las proteínas. Se han reportado proteínas con centros [2Fe-2S] (a), [4Fe-S] (b) y menos común con centros [8Fe-8S] (c). Figuras en azul representan átomos de hierro (Fe) y figuras en amarillo átomos de azufre (S). Modificado de (Quiñones y Rincón Enríquez, 2011).

La versatilidad electrónica de los centros [Fe-S] les permitió su requerimiento exitoso por las proteínas como cofactor (Schwartz *et al.*, 2001). Los centros [Fe-S] dotan a las proteínas con diversas habilidades bioquímicas, estas proteínas desempeñan funciones importantes en diversas reacciones metabólicas como el transporte de electrones por su capacidad de deslocalizar electrones tanto del átomo de Fe como el de S, permitiéndoles acceder a varios estados redox (Beinert, 2000; Fontecave, 2006). El potencial redox al parecer es modificado por ciertas uniones generadas en un sitio de Fe específico como las uniones de la histidina, la serina o el aspartato, debido a que son encontrados en centros que tienen la función de transportar electrones y que además del transporte permiten el





acoplamiento de protones ya que en el caso de la histidina el anillo imidazol es capaz de someterse a una protonación que es dependiente del pH, además de que el nitrógeno básico de la histidina es capaz de captar un electrón de la trionina, serina y cisteína (Hunsicker et al., 2003). Los centros son funcionales tanto para enzimas no redox y redox, la unión se lleva acabo de varias maneras, primero una ligación no cisteinil en un sitio de Fe de un centro [Fe-S] puede facilitar la unión y activación de un sustrato para reacciones de hidratación y deshidratación en una amplia gama de hidratasas y deshidratasas (Flint et al., 1996). Algunos ejemplos de este tipo de unión son la aconitasa y la unión con el Sadenosilmetionina (SAM), la superfamilia del radical SAM comprende más de 60 diferentes enzimas que catalizan las reacciones de radicales en precursores de ADN, vitaminas, cofactores, antibióticos y en la biosíntesis de herbicidas y rutas de degradación (Johnson et al., 2005). Segundo, la incorporación de un heterometal en un centro [Fe-S] puede ser requerida para la unión o activación del sustrato. El centro [Ni-4Fe-5S] en las CO deshidrogenasa responsable del metabolismo del CO en bacterias anaerobias como Carboxydothermus hydrogenoformans (Dobbek et al., 2001). Tercero, otro mecanismo implica la unión de un sitio de unión al metal del sustrato a un sitio de Fe de un centro [4Fe-4S], tal es el caso del sirohemo que es unido para formar los sitios activos de la sulfato y nitrito reductasa, como un centro [4Fe-4S] unido a un sitio binuclear de cobre-nickel es necesario para el ensamble del acetil-CoA, un centro dihierro es unido para formar el sitio activo de la Fe-hidrogenasa (Crane et al., 1995; Doukov et al., 2002; Fontecilla et al., 2007). Otras proteínas en las que participan los centros incluyen al fotosistema I y la ferredoxina de la fotosíntesis, la nitrogenasa de bacterias azototróficas, la proteína reguladora de hierro 1 (IRP1) involucrada en la regulación de la captación de hierro en mamíferos y la proteína reguladora SoxR dependiente del estrés oxidativo (Nachin et al., 2001; Balk y Lobreaux, 2005; Lill y Muhlenhoff, 2005). Los centros [Fe-S] tienen un papel importante en las proteínas que participan con actividad estructural, tal es el caso de las enzimas reparadoras de ADN la endonucleasa III y MutY, de las cuales existe evidencia que la inactivación redox del centro [4Fe-4S] juega un papel puramente estructural similar al del Zn, en la proteína de dedo de Zn en la cual el centro controla la estructura de un bucle de la proteína esencial para el reconocimiento y reparación del daño del ADN (Asahara et al., 1989; Kuo et al., 1992; Porello et al., 1998). También tienen la capacidad de regular la expresión de genes, tanto en nivel de la transcripción como de la traducción debido a que la interconversión irreversible de los centros [Fe-S] los hace buenos "interruptores moleculares" o bien sensores de estrés





relacionado con condiciones redox o con hierro (Ayala *et al.*, 2008). Cada una de las funciones con las que son dotadas diferentes proteínas demuestra que los requerimientos de los centros [Fe-S] por macromoléculas biológicas tienen un alto valor para el desarrollo de la vida. La formación de los centros [Fe-S] se puede lograr de manera simple pero debido a que estos cofactores son altamente inestables ante la presencia de oxígeno, resulta en una amenaza para las proteínas con centros [Fe-S] y consecuentemente para los organismos que las contienen (Py y Barras, 2010) tanto por la carencia de los centros como cofactores proteicos como por la toxicidad que implican sus componentes, por lo que los organismos han tenido que desarrollar múltiples sistemas para el ensamble de *novo* dentro de la célula mientras protegen la envoltura celular de efectos perjudiciales potenciales de iones Fe²⁺, Fe³⁺ y S². En particular, el déficit en la síntesis de los centros resulta en un efecto deletéreo debido a la ausencia de proteínas que contienen estos centros y que su participación resalta en las rutas de respiración y el metabolismo citosólico.

Los sistemas bacterianos encargados de la biogénesis de los centros [Fe-S] que se han estudiado son los denominados: NIF (la ruta encargada de la maduración de la nitrogenasa para la fijación de nitrógeno), ISC (la ruta generadora de centros [Fe-S], encargada de abastecer de centros para la mayoría de las necesidades celulares) y SUF (la generadora de centros [Fe-S] en condiciones de estrés oxidativo y carencia de hierro).

2.2 SISTEMAS DE BIOGENESIS DE CENTROS [FE-S].

2.2.1 SISTEMA DE BIOGENESIS NIF.

El sistema NIF encargado de la maduración de la nitrogenasa, la cual es una enzima compleja que cataliza la reducción del nitrógeno diatómico del ambiente, contiene centros MoFe y Fe. Este complejo está compuesto de dos proteínas una heterotetramérica NifDK ($\alpha_2\beta_2$ dinitrogenasa) y un componente homodimérico NifH (dinitrogenasa reductasa). La proteína dinitrogenasa también referida como proteína MoFe o componente I, es un tetrámero del producto de los genes *nifD* y *nifK* de un tamaño de 220 a 240 KDa y contiene un par de centros metálicos conocidos como centro P y un cofactor de Hierro-Molibdeno (FeMo-co). Cada par $\alpha\beta$ de las subunidades NIfD y NifK contiene un centro P y una molécula de FeMo-co. La moléculas FeMo-co se compone de homocitrato y un centro MoFe₃-S₃ ligado a un centro Fe₄-S₃ por tres uniones de azufre. El átomo de Mo es acoplado al C-2 de los grupos carboxilo e hidroxilo del R-homocitrato (Figura 2a). El centro P está compuesto por 8Fe-7S con una estructura similar a la del cofactor FeMo-co, el cual está





estructurado por dos centros [4Fe-3S] unidos por un átomo central de S. Los centros P están localizados en la interface de la subunidad $\alpha\beta$ y son coordinados por un residuo cisteinil de ambas subunidades como se muestra en la Figura 2b (Rubio y Ludden, 2005). La proteína dinitrogenasa reductasa, también referida como proteína de Fe o componente II, es un dímero de 60 KDa del producto del gen *nifH* y contienen un único centro [4Fe-4S] en la interface de la subunidad y dos sitios de unión Mg-ATP, uno en cada subunidad (Hu *et al.,* 2006).



Figura 2. Representación esquemática de los centros metálicos de la proteína nitrogenada. El cofactor FeMo-co (a) y el centro P en estado reducido (b). Los aminoácidos ligados a FeMo-co son α-Cys²⁷⁵ y α-His⁴⁴², los ligados al centro P se muestran como α-Cys⁸⁸ y β-Cys⁹⁵. Los átomos de cada componente son: el hierro= magenta, el molibdeno= gris, el azufre= amarillo, el carbono= verde, el oxígeno= rojo y el nitrógeno= azul.

La maduración de la apoproteína MoFe (se refiere a la forma catalíticamente inactiva de la proteína) ocurre en varios pasos en la que participan los productos de los genes *nifS*, *nifU*, *nifB*, *nifE*, *nifN*, *nifQ*, *nifZ*, *nifH*, *nifD* y *nifK*. La biosíntesis del FeMo-co se presenta de manera independiente de la producción de la proteína MoFe. Primero NifU y NifS movilizan Fe y S respectivamente para el ensamble de pequeños fragmentos de Fe-S los cuales son transferidos a NifB y procesados en un núcleo FeMo-co que potencialmente posee todo el Fe y S necesario para la generación de un cofactor maduro. El FeMo-co es transferido a NifEN y se somete a un rearreglo adicional antes de ser liberado a la proteína MoFe (generada por los productos de los genes *nifD* y *nifK*). Otras proteínas que participan en la biosíntesis de FeMo-co incluyen a NifV que es una homocitrato sintasa que se encarga de suplir homocitrato para la biogénesis de FeMo-co. NifQ que es una proteína potencialmente responsable de la movilización de Mo para el ensamble de FeMo-co y una proteína de Fe (NifH) que es el donador catalítico de electrones para la proteína MoFe que en la Figura 3 se ilustra (Dos Santos *et al.*, 2003; Rubio y Ludden, 2005; Hu *et al.*, 2008;).







Figura 3. Representación esquemática de la síntesis del cofactor FeMo-co para la maduración de la proteína FeMo de la nitrogenasa. Primero se sintetiza un polipéptido tetramérico $\alpha 2\beta 2$ NifEN en el cual se forma una matriz junto con NifB que previamente interacciona con NifUS para dotarse de un centro [Fe-S] y generar un precursor. Después se genera la inserción de la molécula de Mo mediante la interacción de una proteína de Fe generando el cofactor FeMo-co cargado en NifEN el cual se transporta a la apoproteína FeMo que es producto de los genes *nifDK* (Modificado a partir de Rubio y Ludden, 2005).

2.2.2 SISTEMA DE BIOGENESIS SUF.

El sistema SUF está compuesto de los genes *sufABCDSE* y son inducibles fuertemente por oxidantes probando su funcionalidad en el incremento de la producción y mantenimiento de centros [Fe-S] bajo condiciones de estrés oxidativo. Este sistema es conocido como un sistema alternativo para el ensamble de centros [Fe-S] el cual permite el crecimiento de cepas bacterianas mutantes deficientes del sistema ISC cuando se sobre expresa en *Escherichia coli* y *Dickeya dadanttii* (Takahashi y Tokumoto, 2002; Rincón-Enríquez *et al.*, 2008). Existen tres elementos *cis* de respuesta a estrés oxidativo (ORE-I, II, III) en la región promotora rio arriba de *sufA* que funcionan como los sitios de unión para IscR, Fur y OxyR que requiere la unión de IHF. Los genes *suf* codifican por proteínas que funciona como un polipéptido de andamio, una proteína donadora de azufre, una de hierro y las que permiten la translocación del centro a las apoproteínas (Yeo *et al.*, 2006). Las proteínas del sistema





SUF están organizadas en dos diferentes complejos nombrados SufSE y SufBCD localizados en el citoplasma. La proteína SufS es una proteína PLP (piridoxal fosfato) que tiene una actividad de cisteína desulfurasa catalizando la conversión de L-cisteina a Lalanina y azufre sulfano. Su sitio activo contiene un residuo de cisteína catalíticamente esencial al cual se le ha transferido el átomo de azufre generando un enlace persulfuro con la proteína generando un mecanismo adecuado para transportar átomos de azufre de manera segura sin ser liberados en la solución. La actividad de SufS se ve incrementada fuertemente por SufE ya que esta proteína se une fuertemente a SufS generando el complejo SufSE (Mihara et al., 1997; Mihara et al., 1999; Outten et al., 2003). Por otra parte el complejo SufBCD es el sitio en donde se ha demostrado se lleva el ensamblaje del centro [Fe-S] en donde SufB funciona como un andamio, SufD es necesario para la adquisición de hierro y SufC contienen una actividad ATPasa necesaria para lograr la captación del hierro en conjunto con SufD (Saini et al., 2010). Además se ha demostrado la interacción del complejo SufSE que es la fuente de azufre y además una posterior interacción con SufA (homólogo a IscA) que en este caso no participa como andamio si no como un transportador del centro [Fe-S] y la subsecuente translocación hacia una apoproteína como se muestra en la Figura 4 (Chahal et al., 2009).







Figura 4. Representación esquemática del sistema SUF para la biosíntesis de centros [Fe-S]. El complejo SufBCD permite el ensamble del centro [Fe-S], mediante el acoplamiento de una fuente de Fe y la interacción del complejo SufSE que proporciona el azufre. El centro es transportado a SufA que permite la translocación a las apoproteínas con centros [Fe-S] (Modificado a partir de Chahal *et al.*, 2009 y Saini *et al.*, 2010).

2.2.3 EL SISTEMA ISC.

El sistema ISC consiste de los genes *iscRSUA-hscBA-fdx* (Figura 5) que están organizados en un operón que es altamente conservado en una gran variedad de organismos.



Figura 5. Representación esquemática del operón ISC.El gen *iscR* codifica por una proteína reguladora, *iscS* por una cisteína desulfurasa, una proteína de andamio IscU, una de función aun sin ser completamente caracterizada IscA y las proteínas accesorias HscBA-Fdx.

En el sistema ISC los integrantes utilizados durante el estado de producción del ensamble de los centros [Fe-S] incluyen, una proteína de andamio que completa el ensamblaje (IscU), una cisteína desulfurasa que provee azufre (IscS), una fuente de hierro aun sin caracterizar, una ferredoxina (fdx) que proporciona la reducción equivalente para el ensamble del centro y la participación de dos cochaperonas (HscAB) que permiten la translocación del centro a una apoproteína como se muestra en la Figura 6 (Swati *et al.,* 2011).







Figura 6. Diagrama general de la biogénesis de los centros [Fe-S] por el sistema ISC. Este sistema comprende la participación de una proteína IscU que ensambla el centro, una proteína IscS que dona el azufre, una fuente de hierro aún sin identificar, una ferredoxina (Fdx) que genera una reducción para el acoplamiento del centro en IscU y dos cochaperonas (HscAB) que interaccionan con IscU para el transporte del centro hacia la apoproteína (Diseñado a partir de Swati *et al.*, 2011).

Cada uno de los componentes desempeña un papel importante para la síntesis y la translocación del centro hacia las apoproteínas, por lo que la ausencia de actividad de algunas de las proteínas involucradas en este sistema genera un déficit en el desarrollo de los organismos reflejándose en afectaciones fisiológicas, en las que pueden incluirse la capacidad de virulencia de algunas bacterias estudiadas como *D. dadantii* o *S. flexneri* por lo que es importante abordar la relación de este sistema con las propiedades fisiológicas de los microorganismos.





2.2.3.1 PARTICIPACION DE LOS GENES DEL OPERÓN ISC SOBRE LA BIOGENESIS DE LOS CENTROS [Fe-S] Y SU RELACION CON LA VIRULENCIA DE PATOGENOS.

2.2.3.1.1 LA REGULACION DEL OPERÓN ISC.

Los sistemas ISC y SUF son inducidos bajo condiciones ambientales similares como el estrés oxidativo y la carencia en hierro. La expresión del operón iscRSUA-hscBA-fdx es inducida también por estrés ocasionada por el óxido nítrico y es dirigida por IscR (Outten et al., 2004; Justino et al., 2005; Yeo et al., 2006;). IscR es codificado por un ORF localizado inmediatamente río arriba de los genes que codifican para las proteínas de ensamble de los centros [Fe-S] en E. coli, además comparte similitud en aminoácidos con MarA, un miembro de la familia de factores de transcripción MarA/SoxS/Rob y también se determinaron las secuencias similares a las que se une MarA de -151 a -106 nucleótidos río arriba del codón de inicio de iscR. También se consideró razonable la posibilidad de que IscR se uniera a esta secuencia debido a que contiene una región de unión al ADN similar a la de hélice-giro-hélice de MarA (Schwartz et al., 2001). Este factor de transcripción involucrado en el mecanismo homeostático que controla la biogénesis de los centros [Fe-S] se observó por espectroscopia electrónica de resonancia paramagnética, que contiene un centro [2Fe-2S]¹⁺ que puede ser reversiblemente oxidado/reducido y que es unido en un sitio especifico determinado por la región conservada Cys₉₂Cys₉₈Cys₁₀₄Hys₁₀₇ (Schwartz et al, 2001; Fleischhacker *et al.*, 2012;). Se ha probado que este regulador en *E. coli* reprime la transcripción de su propio operón ISC (iscRSUA-hscBA-fdx), pero en condiciones de estrés oxidativo o carencia en hierro funciona activando la transcripción del operón SUF permitiendo que el sistema ISC sea transcrito. El centro [Fe-S] de IscR es importante para su función debido a que se ha demostrado que la represión de la expresión de iscR es significativamente reducida en cepas que contenían mutaciones nulas de genes de ensamble de centros [Fe-S] iscS o hscA, esto es debido a que la apoforma IscR es madurada por la ruta de biosíntesis ISC a su holoforma mediante la unidad policistrónica iscSUA y las proteínas accesorias como HscBA o Fdx que permiten que el centro sea transportado a las apoproteínas con mayor eficiencia. También existen otros agentes causales de la descompensación de los centros [Fe-S] como son el estrés oxidativo y la carencia en hierro ocasionando que IscR se encuentre en apoforma liberando la región promotora del operón ISC y así permitiendo la síntesis de centros [Fe-S]. Una vez que el centro ha sido cargado en





IscR (holoforma) esta vuelve a reprimir al sistema (Schwartz *et al.*, 2001; Giel *et al.*, 2006; Py y Barras, 2010) (Figura 7). La estructura de IscR se ha propuesto que participa como un bucle autorregulatorio para mantener un nivel adecuado de la síntesis de los centros [Fe-S] (Schwartz *et al.* 2001) por lo que podría considerarse como un "sensor" de la cantidad de centros [Fe-S] disponible en la célula.



Figura 7. Representación esquemática de la regulación del operón ISC por IscR. Cuando IscR se encuentra en apoforma libera la zona promotora de *iscR* permitiendo la transcripción del policistron *iscRSUA-hscABfdx*. Cuando se activa la biosíntesis del centro [Fe-S] y se transporta a IscR, este se encuentra en su estado holoforma y por lo tanto se encuentra reprimiendo la zona promotora de IscR (Modificado a partir de Py y Barras, 2010).

Además de la función de IscR como regulador tanto del operón ISC como de SUF, Giel *et al.* (2006) mostraron a través de un perfil transcripcional global en *E. coli*, que hay 40 genes en 20 operones predecibles que fueron regulados por IscR en condiciones aerobias y anaerobias. Entre estos genes se encuentran los que codifican por algunas funciones conocidas o funciones propuestas en la biogénesis de los centros [Fe-S] como son *sufABCDSE, erpA* (Loiseau *et al.*, 2007) y *nfuA* (Angelini *et al.*, 2007) y enzimas de la respiración anaerobia que contienen centros [Fe-S] como son *hyaABCDE, hybOABCDEFG* y *napFDAGHBC*. Además IscR muestra indicios de su papel que desempeña en la sobrerregulación en condiciones anaerobias debido a que reprime la expresión de los promotores *hyaA, hynO* y *napF*, entonces si IscR controla la expresión de estas enzimas, su





contribución en la regulación por el O_2 de varios promotores es de manera negativa. Así mismo determinaron que existían al menos dos sitios diferentes de reconocimiento por IscR conservado entre muchas bacterias: la secuencia tipo I, ATASYYGACTRwwwYAGTCRRSTAT identificada para *iscR*, *yadR* y *yhgI* y la secuencia tipo II, AWARCCCYTSnGTTTGMnGKKKTKWA que está presente en las zonas promotoras de *hyaA*, *sufA* y el gen *ydiU*.

2.2.3.1.2 LA BIOGÉNESIS DEL CENTRO [Fe-S].

Los átomos de azufre en los centros [Fe-S] son proporcionados por la L-cisteína, como un resultado de la acción de una cisteína desulfurasa. Estas enzimas dependientes de piridoxal fosfato degradan al aminoácido L-cisteína en L-alanina y secuestran el átomo de azufre liberado en la forma de un persulfuro, en un residuo especifico de cisteína. Esto provee un excelente mecanismo para hacer que los átomos de azufre estén disponibles sin liberarlos en solución. Por ejemplo en el sistema ISC el gen que codifica por la cisteína desulfurasa (IscS) permite la transferencia del azufre movilizándolo de la cisteína a la proteína de andamio IscU formando eventualmente los centros [Fe-S] por lo tanto, IscU como IscS representan elementos importantes de ISC (Figura 8). La transferencia de azufre ocurre de la Cys328 de IscS a IscU (Urbina *et al.*, 2001).



Figura 8. Representación esquemática de la catálisis generada por la cisteína desulfurasa y su función como fuente de azufre para el centro [Fe-S]. IscS cataliza la desulfuración de la L-cisteina secuestrando al azufre en un sitio específico sin liberarlo en solución, generando una fuente de azufre para la proteína de andamio IscU para la formación del centro [Fe-S] (Diseñado a partir de Urbina *et al.*, 2001).





Por otra parte los iones de hierro deben ser provistos al sistema a través de una ruta protegida y fuertemente controlada que previene la fuga de hierro libre nocivo. Se ha propuesto que CyaY, una proteína similar a la frataxina, funciona como donador de hierro en el ensamble de los centros [Fe-S] y el azufre de IscS y el hierro de CyaY son usados para el ensamble [Fe-S] en la apoproteína de andamio (Py y Barras, 2010). A pesar de que no se ha demostrado exactamente de donde proviene el hierro utilizado para la biosíntesis de los centros [Fe-S], se ha probado que estos son ensamblados en una proteína de andamio. El concepto de andamio ha sido implementado en la mayoría de los ejemplos de inserción de cofactor durante la maduración de la proteína. De manera general una proteína de andamio se espera que interactúe de cerca con una cisteína desulfurasa y una fuente de hierro y dotar de un ambiente estructural y químico que facilite la formación de los centros [Fe-S] y además su transferencia a una apoproteína. IscU recibe el azufre directamente de IscS y la interacción IscU-IscS ha sido demostrada tanto in vitro como in vivo (Agar et al., 2000). Cuando se incuba FeCl₃, IscS y L-cisteína in vitro, IscU forma las uniones de los centros [Fe-S] de una manera secuencial. El proceso comienza con una forma dimérica de IscU conteniendo un centro [2Fe-2S] después conteniendo dos centros [2Fe-2S] y finalmente formándolos en un centro [4Fe-4S] el cual se piensa que está localizado de forma adyacente a cada uno en la interface del dímero, el cual se somete a una reducción de un electrón sencilla generada por la ferredoxina (Fdx) seguido de un rápido acoplamiento para producir un puente sencillo del centro [4Fe-4S] por homodímero de IscU. La forma de unión del centro [4Fe-4S] puede ser convertida de nuevo en [2Fe-2S] después de una exposición a O_2 (Chandramouli et al., 2007). Mientras que una de las formas de uniones de los centros [2Fe-2S] es estable, las dos formas de unión de los centros [2Fe-2S] parecen ser intermediarios de vida corta en la formación del centro [4Fe-4S] (Figura 9). Esta conversión puede ser lograda por el acoplamiento reductivo usando tanto ditionita o Fdx (el producto del último gen en el operón ISC). Comparación de secuencias, análisis de espectroscopia y estructurales sugieren que los residuos Cys37, Cys63, Hys105 y Cys106 de IscU, son necesarios para las funciones de andamio y de coordinación en la formación de los centros [Fe-S] (Johnson et al., 2005; Bandyopadhyay et al., 2008; Kato, 2002).







Figura 9. Modelo de ensamblaje secuencial del centro [4Fe-4S] en una proteína de andamio de tipo U (**IscU).** IscU forma un intermediario [2Fe-2S] en cada una de las unidades del dímero, posteriormente mediante una reducción generada por Fdx se permite el acoplamiento de los dos [2Fe-2S] generando un complejo IscU-[4Fe-4S] (Modificado a partir de Py y Barras, 2009).

IscU se encuentra en dos estados conformacionales en solución, uno es una conformación estructurada (S) que es similar a la de la holoforma IscU-[2Fe-2S] y una conformación dinámicamente desordenada (D) que no une iones metálicos (Kim et al., 2012). A pesar de que IscU tiene actividad de transferencia del centro, la presencia de HscA, HscB y MgATP incrementan la tasa de transferencia indicando que HscA y HscB son requeridos para una eficiente transferencia del centro in vivo (Chandramouli y Johnson, 2006; Bonomi et al., 2005). El proceso de la translocación del centro a una apoproteína (en este caso una ferredoxina) se lleva acabo de manera secuencial, primero HscB se une a la proteína IscU en su forma S generando un complejo HscB-IscU-[2Fe-2S] al cual se une la proteína HscA[T] (se refiere a que posee un ATP) en el dominio J de HscB de tal manera que queda un complejo formado por HscB-HscA-[T]-IscU-[2Fe-2S] y mediante la hidrólisis del ATP de HscA es liberado el centro a la apo ferredoxina generando P_i, HscB y un complejo HscA[R]-IscU-[D] (R por la hidrolisis de ATP que resulta en ADP mas P_i y S por el estado no estructurado de IscU). IscU-[D] es liberado cuando se fosforila HscA[R] y permite que IscU logre formarse de manera estructurada de nuevo como se observa en la Figura 10 (Bonomi et al., 2008; Kim et al., 2012).







Figura 10. Esquematización de la función de las chaperonas HscA y HscB en la translocación del centro [Fe-S] a una apoferredoxina. La estructura IscU [S] permite el acoplamiento de HscB al que es unido HscA después de una hidrolisis de la molécula de ATP que permite el acoplamiento del centro [2Fe-2S] a la apoferredoxina liberando a HscB del complejo. Mediante una fosforilación de HscA es liberado de IscU generando un proceso cíclico (Diseñado a partir de Bonomi *et al.*, 2008).

Este mecanismo de biosíntesis es estrictamente regulado al igual que todas las rutas metabólicas de acuerdo a las condiciones fisiológicas de las células y cuando las células son sometidas a un tipo de estrés como el oxidativo o la carencia en hierro los microorganismos sobre-regulan algunos de los sistemas mencionados anteriormente para abastecer a las proteínas encargadas de superar estas condiciones fisiológicas, sin embargo los centros y por tanto las proteínas que los contienen son afectados en gran parte por estos tipos de estrés.

2.3 CONDICIONES DETRIMENTALES PARA LA BIOGENESIS DE CENTROS [FE-S].

2.3.1 ESTRÉS OXIDATIVO.

Los centros [Fe-S] son altamente inestables a condiciones de estrés tanto oxidativo o carencia en hierro, lo que resulta en efectos deletéreos sobre la célula. Todos los organismos vivos que son aeróbicos utilizan el oxígeno molecular (O₂) para la respiración y oxidación de nutrientes para obtener energía. Frecuentemente en la célula además de utilizar el oxígeno como un compuesto benéfico, también genera subproductos que son reactivos como





son: el radical anión superóxido (O_2^{-}), peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (-OH) que es altamente reactivo. La mayoría de estos productos derivan de la reducción secuencial univalente de oxigeno molecular catalizado por varias enzimas de membrana asociadas a la cadena respiratoria. Existen agentes ambientales que pueden causar estrés oxidativo como son las ionizaciones cerca de la radiación UV o numerosos compuestos que generan O_2^{-} intracelular (como la menadiona y el paraquat) la cual incrementa cuando la concentración de oxigeno activo se eleva a un nivel que excede la capacidad de defensa de la célula (Cabiscol *et al.*, 2000). Algunas células inmunes (como las fagocíticas) utilizan a la enzima NADPH oxidasa durante la invasión de bacterias patógenas, la cual genera estrés oxidativo como arma durante la fagocitosis. Los principales blancos de las especies altamente reactivas de oxigeno son el ADN, ARN, proteínas y lípidos (Humphries y Szweda, 1998), en donde la mayor parte del daño es causado por radicales hidroxilo generado del H₂O₂ mediante la reacción de Fenton representada en la Figura 11 (esta reacción requiere **hierro** u otro metal divalente y una fuente de equivalentes reductores).



Figura 11. Inactivación de proteínas [Fe-S] mediante la degradación de su centro [Fe-S]. Se muestra la forma en la que el centro [Fe-S] puede ser degradado por agentes oxidantes como ROS, peroxinitrito y metales como Cu, se genera la liberación de Fe²⁺ que al acumularse puede generar la formación de radicales OH que se forman por la reacción de Fenton modificado a partir de Py y Barras (2010).





Rincón-Enríquez et al. (2008) obtuvieron cepas mutantes de los genes iscU, hscA y fdx de D. dadantii y analizaron los fenotipos relacionados al estrés ocasionado por un agente generador de superóxido (paraquat), que es una de las condiciones restrictivas para la biogénesis de los centros [Fe-S]. Los resultados mostraron deficiencias en el crecimiento bacteriano en presencia de paraquat en comparación con la cepa silvestre. Otro sistema de biogénesis de centros [Fe-S] relacionado al estrés oxidativo es el sistema SUF, en los que se mostraron que cepas mutantes de sufC de D. dadantii generaron fenotipos deficientes al paraquat además de una disminución en la actividad de deshidratasas sensibles a oxidantes univalentes (Nachin et al., 2001; Nachin et al., 2003; Jang e Imlay, 2010). Otros estudios muestran que los sistemas ISC y SUF de E. coli son importantes para la reparación de enzimas dañadas por estrés oxidativo, como es el caso de la fumarasa A que al ser expuestas a H_2O_2 genera una forma inactiva de su sitio catalítico generando un centro [3Fe-4S]⁺, el cual era reparado aun cuando el sistema SUF no estaba funcionalmente activo (Jang e Imlay, 2010). Djaman *et al.* (2004) mostraron que en *E. coli* el centro $[3Fe-4S]^+$ de la fumarasa A requería del sistema ISC para ser reparado cuando el sistema SUF era expresado en menor proporción. Ambos sistemas pueden emplearse como para el ensamble de novo como para la reparación de centros [Fe-S] dañados.

2.3.2 CARENCIA EN HIERRO.

Otro factor que influye de manera negativa en la formación de los centros [Fe-S] es la ausencia de hierro, este tipo de estrés puede ser causado por un agente quelante de hierro o bien, por la limitación que pudiera generar algún organismo sobre la infección de un patógeno. La importancia de este elemento en que interviene en un gran número de procesos biológicos vitales como la fijación de nitrógeno, la fotosíntesis y la respiración debido a su uso como cofactor y puede ser combinado con azufre elemental para formar centros [Fe-S] que son requeridas en múltiples procesos biológicos (De la Garza y Vaca, 2010). Para sobrevivir, es necesario un suministro suficiente de hierro, entonces si teóricamente se encuentra en cantidades limitantes el almacenarlo es de vital importancia. La forma de Fe⁺² es soluble en solución acuosa, pero en presencia de oxigeno es oxidado a Fe⁺³, el cual es extremadamente insoluble a pH fisiológico, entonces su biodisponibilidad es pobre y frecuentemente es un nutriente limitante para el crecimiento. En múltiples microorganismos el metabolismo del hierro es de gran importancia puesto que está relacionado con las





primeras etapas del proceso de infección de algunas bacterias como D. dadantii (Expert, 1999). Cuando D. dadantii infecta el tejido de su hospedero produce al menos dos tipos de sideróforos, denominados chrysobactin y achromobactin que son moléculas de bajo peso molecular que capturan hierro libre con alta y baja afinidad respectivamente (Persmark et al., 1989; Mahé et al., 1995). Este proceso involucra un conjunto de genes que sintetizan, exportan e internalizan sideróforos y que se encuentran bajo el control del regulador de hierro Fur (Franza et al., 1999) y es deliberado debido a que se ha demostrado que D. dadantii enfrenta una limitación de hierro durante la infección. Este proceso de la capacidad del hospedero de captar hierro se denomina inmunidad nutricional (Enard et al., 1988; Franza et al., 1999). El regulador Fur además está relacionado con la activación del sistema SUF el cual se ha demostrado que además de participar en la biogénesis de centros [Fe-S] se relaciona con el metabolismo del hierro. Un trabajo realizado por Nachin et al. (2001) en el que obtuvieron mutantes de los genes sufABCSE mostraron que generaban una acumulación mayor de hierro intracelular en comparación con la cepa silvestre. Giel et al. (2006) realizaron un perfil transcripcional del regulador IscR de E. coli en el que mostraron que regula al sistema SUF y que además es requerido para solventar la carencia al estrés por carencia en hierro en D. dadantii (Rincón-Enríquez et al., 2008).

El estrés oxidativo y la carencia en hierro son dos condiciones limitantes para la estabilidad y la síntesis de centros [Fe-S], por lo que los sistemas de biogénesis son mecanismos por el cual las células pueden adaptarse a ambas condiciones y producir enzimas que permiten este proceso de adaptación y esto es debido a los estudios realizados en múltiples microorganismos como *E. coli y A. vinelandii* en los que la carencia del sistema ISC genera fenotipos con deficiencia en producción de centros [Fe-S] y además la reducción de la actividad de muchas enzimas importantes que poseen estos cofactores como son la aconitasa o la succinato deshidrogenasa (Takahashi y Nakamura, 1999; Nakamura *et al.*, 1999). Rincón-Enríquez *et al.* (2008) mostraron que el sistema SUF, además de ISC, también está implicado en la virulencia de *D. dadantii* contra *A. thaliana* pero solo cuando es sobre regulado por IscR por lo que propusieron que esta proteína reguladora, la cual controla la expresión tanto de ISC como de SUF, teniendo un papel clave que le permite a *D. dandantii* adaptar su capacidad de biogénesis de centros [Fe-S] en las condiciones encontradas en hospederos infectados particularmente en términos de estrés oxidativo y carencia en hierro. En *D. dadantii* se mostró que la activación del operón SUF en





condiciones de carencia en hierro es requerido para una completa virulencia en *S. ionantha* (Nachin *et al.*, 2001; Schwartz *et al.*, 2001; Rincón-Enríquez *et al.*, 2008).

Estos dos tipos de estrés (oxidativo y carencia en hierro) además de afectar la biogénesis de los centros, generan como resultado un déficit en el desarrollo de múltiples microorganismos puesto que se ha determinado que en el caso de bacterias fitopatógenas, enfrentan estos tipos de estrés en respuesta de los sistemas de defensa de las plantas.

Existe una gran variedad de bacterias patógenas vegetales entre las que destacan las que contienen una gran variedad de hospederos tal como mostró Mansfield *et al.* (2012), que considera a la bacteria *Pseudomonas syringae* el patógeno más importante entre las diez bacterias patógenas vegetales más relevantes, debido que representa un problema severo para cultivos de importancia agronómica como ornamental gracias a su diversidad de patovares. Este género de bacterias son Gram negativas en forma de barra con flagelos polares y causa síntomas de enfermedades que van desde manchas en las hojas hasta cancros en cultivos de importancia agrícola debido a que sobreviven de manera epifita y pueden penetrar al tejido fácilmente a través de aperturas naturales y causar la muerte de la planta (Hirano y Upper, 2000; Jin *et al.*, 2003; Bretz y Hutcheson, 2004).

3 TIZON DEL HALO PROVOCADO POR *P. SYRINGAE* PV. *PHASEOLICOLA* EN FRIJOL (*PHASEOULUS VULGARIS L.*).

El patovar *phaseolicola* (pv. *phaseolicola*) de *P. syringae* es patógeno de frijol, es causante del tizón del halo, una de las enfermedades más frecuentes y económicamente importantes de los granos de *Phaseolus* (habichuela, frijol, etc.) que ataca principalmente al follaje y vainas. La bacteria puede causar el aborto de semillas. Las semillas que alcanzan su desarrollo y están infectadas pueden transmitir a *P. syringae* pv. *phaseolicola* con lo que facilitan su dispersión al siguiente ciclo (Agrios, 2005; Sains *et al.*, 2008). Esta enfermedad se caracteriza por el desarrollo de lesiones acuosas en el sitio de infección, rodeadas por un halo clorótico producido por la liberación de la faseolotoxina. Al igual que la mayoría de los patógenos que causan mancha foliar (Figura 12), la bacteria *P. syringae* pv. *phaseolicola* es capaz de sobrevivir a las poblaciones epifitas de la superficie de las hojas saludables como se mencionó antes (Joardar *et al.*, 2005).







Figura 12. Desarrollo de síntomas del tizón del halo en hojas de frijol (Phaseolous vulgaris L.). (a) Hoja sana. (b) 10 días después de infección. (c) 30 días después de la infección se puede observar la aparición de clorosis gradual en las hojas hasta ocasionar la muerte del tejido.

Al igual que otras bacterias fitopatógenas *P. syringae* pv. *phaseolicola* enfrenta a condiciones limitantes que genera el hospedero por lo que la bacteria genera una respuesta genética ante los efectores generados en contra de ella.

3.1 INTERACCIÓN DE *P. SYRINGAE* PV. *PHASEOLICOLA* Y SU HOSPEDERO.

Una vez que la bacteria ha penetrado los espacios intercelulares pueden soportar las moléculas preformadas de defensa, obtener nutrientes y multiplicarse para causar daño al tejido del hospedero (Hirano y Upper, 2000). Uno de los mecanismos asociados a la capacidad de producir la enfermedad en frijol se atribuye a que poseen la denominada isla de patogenicidad PAI, que se localiza en un plásmido de 150 Kpb e incluye genes que son tanto esenciales para la patogenicidad en frijol y soja como para la contribución a la agresividad de una manera aditiva (Jackson *et al.*, 1999; Tsiamis *et al.*, 2000). La adaptación de *P. syringae* pv. *phaseolicola* al apoplasto depende de genes específicos de patogenicidad, se han reportado 224 genes que son diferencialmente expresados en su mayoría a partir del contacto con la planta, algunos previamente descritos involucrados en las primeras etapas de la interacción de la planta con la bacteria y la virulencia. Estos genes incluyen los que codifican para el sistema de secreción tipo III, genes involucrados en la degradación de la pared celular, la síntesis de faseolotoxina y el metabolismo aeróbico. Sin embargo existen genes que se ha mostrado que se reprimen, tales genes son los involucrados en la captación y metabolismo del hierro (Joardar *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2009).

Un conjunto de genes que participan en la adaptación de la bacteria al ambiente de la planta son los genes *hrp* (de sus siglas en ingles *hypersensitive response and pathogenicity*)




que codifican proteínas del sistema de secreción tipo III (SSTIII), que es una vía Secindependiente en la que la secreción ocurre en un solo paso desde el citosol hasta el exterior celular donde son liberados efectores bacterianos dentro del citosol de la célula vegetal y ya sea que interfiera o module los procesos de la célula huésped para facilitar la multiplicación bacteriana, la invasión y la enfermedad (Alfano y Collmer, 1996; Hueck, 1998; Collmer *et al.*, 2000; Kunkel y Chen, 2006). La inducción de los genes *hrp* en la bacteria ocurre inmediatamente después del primer contacto con el tejido vegetal por lo que se piensa que la inducción de los genes *hrp*, posterior al contacto con el tejido vegetal, puede resultar de alteración en el estatus nutricional de la bacteria (Rahme *et al.*, 1992; Aldon *et al.*, 2000; Jin *et al.*, 2003).

Además de poseer a PAI estas cepas se definen por poseer el grupo de genes *argK-tox*, estos dirigen la biosíntesis de una toxina no selectiva denominada faseolotixina (Sawada *et al.*, 1997; Guzmán y Morales, 2001). Esta toxina es secretada a través del SSTIII la cual inhibe una enzima clave en la ruta biosintética de poliaminas y en el control del ciclo celular y la senescencia (Staskawicz y Panopoulos, 1979; Bachmann *et al.*, 1998; Navarro y Zabaleta, 2001). La toxina no es específica de un hospedero (toxina hospedero no selectiva) y causa clorosis en una amplia gama de especies, incluyendo espinacas, cebada (Ferguson y Johnston, 1980) y frijol. Además se ha observado que inhibe tanto el crecimiento de cultivo de tejidos no verdes (Jacques y Sung, 1981) así como de *E. coli* (Staskawicz y Panopoulos, 1979).

La adaptación de este género de bacterias hacia sus hospederos podría estar relacionado a la presencia de algún sistema de biosíntesis de centros [Fe-S] que permita la funcionalidad de proteínas relacionadas con los factores de virulencia ó bien con proteínas involucradas en el metabolismo para el desarrollo del microorganismo, tomando en cuenta que en otros trabajos que se han realizado en bacterias como *D. dadantii, A. vinelandii y S. flexneri* (Zheng *et al.*, 1998; Rincón Enríquez *et al.*, 2008; Runyen *et al.*, 2008) se ha mostrado que el sistema de biogénesis de centros [Fe-S] ISC, es un componente esencial para el crecimiento de estas bacterias en condiciones restrictivas de nutrientes, para un establecimiento de manera exitosa sobre su hospedero y también como un mecanismo para resistir al estrés oxidativo y en conjunto con SUF (para el caso de *D. dadantii*), para la resistencia a la carencia en hierro mediada por IscR. Estas nociones permiten generar una idea sobre la esencialidad de estos sistemas para el desarrollo de los organismos así como para la adaptación a ciertas condiciones fisiológicas, en el caso de *P. syringae* pv.





phaseolicola la mayor aproximación que se tiene hasta el momento respecto a este punto, es sobre el trabajo realizado por Vinella et al. (2009) que mediante un análisis filogenómico mostraron que en diferentes especies de Pseudomonas están presentes proteínas del tipo ATC (transportadores tipo A) que corresponden a las proteínas de andamio o transportadoras en las que es ensamblado o transporta el centro [Fe-S] y una de ellas es IscA que es producto del gen iscA perteneciente al operón ISC. Se determinó que está presente también en P. syringae pv. phaseolicola, por lo que es interesante conocer si el sistema ISC está presente en esta bacteria y determinar cuál es su función biológica esto es, si tiene alguna participación sobre su virulencia y su crecimiento bajo condiciones de estrés oxidativo y carencia en hierro. El sistema ISC se ha descrito que participa en la biosíntesis de centros [Fe-S] en condiciones normales de desarrollo esto gracias a su regulador IscR que permite censar la cantidad de centros [Fe-S] disponibles en la célula y al igual que el sistema SUF, es fuertemente estimulado por agentes oxidantes y por limitaciones en hierro deduciendo que este sistema funciona como una maquinaria que permite a las células adaptarse a estas condiciones fisiológicas. Por lo que este trabajo se enfocó en desarrollar una metodología para el estudio y la evaluación del sistema ISC a través de mutaciones mediante las técnicas del ADN recombinante, con la finalidad de elucidar su participación en P. syringae pv. phaseolicola para la búsqueda de nuevas herramientas biotecnológicas que podrían emplearse a futuro como una alternativa para el control biológico molecular de este fitopatógeno.





4 HIPÓTESIS.

El sistema de biogénesis de centros [Fe-S] ISC de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* tiene un rol significativo en la virulencia en plantas de frijol

El sistema de biogénesis de centros [Fe-S] ISC de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* está relacionado con el ensamble de centros [Fe-S] bajo condiciones de estrés oxidativo y de carencia en hierro.

5 OBJETIVO GENERAL.

Determinar la participación del sistema ISC de *P. syringae* pv. *phaseolicola* en la virulencia y en la biosíntesis de los centros [Fe-S] bajo condiciones de estrés oxidativo y de carencia en hierro.

6 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Diseñar y construir variaciones del operón ISC mediante la mutación nula del gen *iscU* y la mutación condicional de todo el operón ISC en *P. syringae* pv. *phaseolicola*.
- Caracterizar los mutantes del sistema ISC de *P. syringae* pv. *phaseolicola* en condiciones de estrés oxidativo y de carencia en hierro.
- Evaluar la virulencia de los mutantes del sistema ISC de *P. syringae* pv. *phaseolicola* sobre hojas de plantas de frijol.





7 MATERIALES Y METODOS.

7.1 CEPAS BACTERIANAS Y MEDIOS DE CULTIVO.

Se utilizó la cepa DH5- α de *E. coli* para realizar las técnicas de ADN recombinante, las condiciones para su crecimiento sobre medio LB (Luria-Bertani) fueron a una temperatura de 37°C y con 200 rpm de agitación (la descripción de los medios de cultivo empleados en este trabajo se encuentran en el apéndice de medios de cultivo). La cepa de referencia utilizada en este estudio fue *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448A y fue crecida en medio KB (medio B de King's; King *et al.*, 1954) y las condiciones para su crecimiento fueron a una temperatura de 26°C a 200 rpm durante una noche. Para la caracterización y manipulación de las cepas mutantes además del uso del medio rico se utilizó medio mínimo M9 con glicerol al 0.2% para la evaluación de auxotrofias. Los antibióticos fueron adicionados en las siguientes concentraciones: ampicilina 50 µg·mL⁻¹, kanamicina 25 µg·mL⁻¹, espectinomicina 25 µg·mL⁻¹ para *E. coli*. Para *P. syringae* pv. *phaseolicola* fueron: ampicilina 300 µg·mL⁻¹, kanamicina 50 µg·mL⁻¹, espectinomicina 50 µg·mL⁻¹

7.2 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.

Las secuencias de la cepa 1448A fueron obtenidos a partir del genoma disponible en la página electrónica de *National Center for Biotechnology Information* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Con las secuencias del genoma se realizaron análisis bionformáticos con diferentes programas para determinar *in silico* los sistemas de biogénesis de centros [Fe-S] presentes y para el diseño de los oligonucleótidos del estudio.

7.3 CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES.

7.3.1 ESCHERICHIA COLI.

A partir de un cultivo crecido toda la noche de la cepa DH5- α de *E. coli* en medio rico LB se tomó un inóculo para llevar la densidad óptica de 0.1 a 0.6 (siendo esta la fase exponencial) a 600 nm. Se realizaron tres lavados con agua destilada estéril a una temperatura de 4°C, finalmente las células fueron concentradas 100 veces y crioconservadas con glicerol al 10% a una temperatura de -80°C.

7.3.2 P. SYRINGAE PV. PHASEOLICOLA.

Las células electrocompetentes fueron preparadas de acuerdo al protocolo establecido por Choi *et al.* (2006) con algunas modificaciones. Se inoculó la cepa de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448A en medio KB (King B) durante dos noches, se tomaron 6





mL del cultivo distribuidos. Se centrifugaron los a 13000 rpm por 5 minutos se descartó el sobrenadante y se agregó 1 mL de sacarosa 300 mM para resuspender la pastilla repitiendo el proceso dos veces. Por último se resuspendieron las pastilla de células en 100 μ L de sacarosa 300 mM y se utilizaron para la transformación.

7.4 EXTRACCIÓN DE ADN DE P. syringae pv. phaseolicola.

Se reactivó la cepa 1448A crioconservada, sobre medio KB sólido incubado 48 h a 26°C. Se tomó una colonia aislada y se inoculó en 30 mL de medio KB líquido (mismas condiciones que el sólido) a 26°C a 200 rpm durante 48 h. Se extrajo DNA a partir de células utilizando un buffer de lisis (tris acetato pH 7.8, 20 mM de acetato de sodio, 1 mM de EDTA y SDS al 1%, 5 M de NaCl), separando por centrifugación y adicionando cloroformo para separar el material genético del resto del contenido celular, precipitando con etanol absoluto y lavando dos veces con etanol al 70%, se dejó secar la pastilla la cual se resuspendió en 30 μ L de agua destilada y desionizada estéril, se almacenó a -20°C.

7.5 REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN DE ADN POR PCR Y PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS.

Para las reacciones de PCR (Polymerase Chain Reaction) se utilizaron las condiciones siguientes: 10 mM de dNTPs, 1X de buffer 10X (KCl, $(NH_4)_2SO_4$ y 20 mM de MgCl₂), se utilizaron 100 ng de ADN de *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448^a y 6 *p*mol de cada oligonucleótido. Las condiciones del programa fueron: 35 ciclos a 95°C durante 30 s para desnaturalización, para el alineamiento se empleó una temperatura que osciló entre 54 y 64°C de acuerdo a los oligonucleótidos utilizados, para la elongación se utilizó la temperatura especificada por proveedor de la polimerasa (72°C). Los productos se verificaron en geles de agarosa al 0.8% con bromuro de etídio, fueron visualizados en un anlizador de imágenes (Biorad Modelo: Universal Hood II) y cada fragmento fue cortado. La purificación de los fragmentos se realizó utilizando el Kit de purificación PCR de Promega© (Wizard-PCR preps), para eliminar el buffer, los cebadores y los dNTPs. Se amplificó el fragmento R*iscU* utilizando los oligonucleótidos IscR1 y HscB2 (Cuadro 1), este fragmento contiene el gen *iscU* más dos zonas de recombinación a los extremos en la sección de resultados se muestra un esquema de este fragmento (Figura 12).

Cuadro1. Oligonucleótidos empleados en el desarrollo de este trabajo.

FragmentoClaveTM (°C)	Secuencia de oligonucleótido 5' 🏓 3'.
-----------------------	---------------------------------------

2	7
2	/

iscS	IscS1	56.2	CACATGTCGCAACTGGGTAAG				
	IscS2	57.1	ACGTGGGTTCTCGTAGTGGTC				
isc U	IscU1	56.0	AGTTGCTCGACCATTTGCAG				
	IscU2	53.8	GCGTACTGCAGCAACCAGAG				
hscB	HscB1	53.8	GCAGGTCGAAAATCTGGAAG				
	HscB2	55.7	TGGACAGTTGCTTCAGCTTG				
hscA	HscA1	55.0	AGTGCGCCAGTTAGAAGAGC				
	HscA2	57.7	CGGCTCCACTTCTACAACCAG				
aphA-3	aphA3-1	61.6	CCGTGCGCATGACTAACTAGGAGGAATAAATG				
	aphA3-2	64.1	GCGTGCGCATCATTATTCCCTCCAGGTAC				
	aphA3-3	59.0	CCTTAGCAGGAGACATTCCTTCCG				
	aphA3-4	64.1	GACATTGCCTTCTGCGTCCGGTCG				
aadA7(Spc ^R	Cond1	60.8	TCATTGGCTGGCACCAAGCAG				
)-araC-	Cond2	61.3	TTCACTCCATCCAAAAAAACGGGTATGGAG				
pBAD							
	Cond3	58.1	CGCGCCAAAGGATGTTGC				
	Cond4	60.1	AGATTAGCGGATCCTACCTGACGC				
ITs	L1	59.7	GCCAAGGCATCCACCGTG				
	G1	50.3	GGTGAAGTCGTAACAAGG				
Los nucleótidos resaltados con color verde indican sitios de restricción para la enzima FspI, TM indica							

AGTTGCTCGACCATTTGCAG

GTGTCGAGGACAGCCTTGTG





Figura 12. Representación esquemática del fragmento RiscU. Este fragmento se obtuvo a partir del genoma de P. syringae pv. phaseolicola que contienen a iscU (en azul) y las zonas de recombinación a cada lado nombrado como RiscU.

7.6 LIGACIÓN.

Una vez amplificados los fragmentos, se procedió a la clonación en un plásmido (pGEM promega) que es replicativo en E. coli (a su vez es un plásmido suicida en P.



iscR

IscR1

IscR2

56.0

58.2







syringae pv. phaseolicola) que contiene el origen de replicación del fago lambda F1, un sitio múltiple de clonación, el promotor de la lactosa, y el gen reportero *lacZ* que codifica por una β -galactosidasa y además está abierto con extremos cohesivos en forma T (Figura 13). Mediante una ligación con 3 U μ L⁻¹ de la enzima T4 ligasa y una solución amortiguadora, la reacción se llevó a cabo durante una noche a 16°C. La ligación fue purificada utilizando 10 volúmenes de butanol en relación al volumen de la reacción de ligación y se realizó un lavado con etanol al 70%. La pastilla se resuspendió en 20 μ L de agua destilada y desionizada estéril. Para llevar a cabo la reacción de ligación, se determinó la concentración de ADN necesaria para la ligación utilizando la siguiente fórmula:

 $\frac{[(ng \ de \ vector) \times (tamaño \ de \ inserto)]}{tamaño \ de \ vector} \times \frac{3}{1} = ng \ de \ inserto$ (Promega, 2012)



Figura 13. Esquema general del mapa del vector pGemT (Invitrogen) utilizado como vector de clonación (Promega, 2012).





7.7 ELECTROTRANSFORMACIÓN DE E. coli.

Se tomaron 10 μ L de la reacción de ligación (100ng) y se mezclaron con 70 μ L de células electrocompetentes de la cepa DH5- α de *E. coli* en una celda de 0.1 cm y se dio un pulso de 1.8 KV en un electroporador (Biorad Modelo: MicroPulserTM), se recuperaron las células con 1 mL de medio SOC y se dejaron en agitación en tubos de 15 mL durante 1 hora a 200 rpm. Las células fueron sembradas y la selección se realizó mediante la identificación de las colonias transformadas crecidas en placa con LB que contenía ampicilina 50 μ g·mL⁻¹ y X-gal 20 μ g·mL⁻¹ mediante coloración azul-blanco en medio selectivo con antibiótico, siendo las colonias blancas las que incorporaron el plásmido ligado con el fragmento R*iscU* obteniendo el plásmido **pG-R***iscU*.

7.8 ELABORACIÓN DE CONSTRUCCIÓN PARA EL MUTANTE NULO *iscU*.

Se realizó un análisis de restricción para el fragmento R*iscU* utilizando el programa NEBcutter (http://tools.neb.com/NEBcutter2/) del cual se determinó una enzima (HpaI) que corta al gen. Después de verificar el corte de la enzima *HpaI* en pG-R*iscU* se realizó una reacción de ligación con una cassette de resistencia a la kanamicina (*aphA-3*) tomando en cuenta la relación molar 3:1, inserto:vector. El procedimiento para la ligación fue: 40 ng de inserto, 50.6 ng de vector y una unidad de enzima T4 ligasa a 16°C durante 24 horas. El proceso para la precipitación de la ligación fue descrito previamente y fue utilizado para la transformación en la cepa DH5- α (electroporación), y se seleccionaron en medio LB con antibióticos (ampicilina y kanamicina). Se tomó una colonia aislada y se inoculó en 10 mL de medio líquido LB/antibióticos y se purificó el plásmido para realizar un análisis de restricción de la construcción para verificar la inserción de la *cassette*, de este procedimiento resultó el plásmido **pG-R***iscU***::km^R**

7.9 CONSTRUCCIÓN DEL MUTANTE CONDICIONAL ISC EN P. syringae pv. phaseolicola.

Para el estudio del sistema ISC se realizó un mutante condicional de este sistema mediante la transformación con el plásmido **pG-Cond-***iscS* que posee una *cassette* de resistencia a la espectinomicina e inducible por arabinosa ($aadA7(Spc^R)$ -araC-pBAD) y dos zonas de recombinación que las componen los genes *yhfQ* (*trmj*) e *iscS* de *D. dadantii* (Rincón-Enriquez *et al.*, 2008). Para la transformación se tomaron 500 ng del plásmido **pG-Cond-***iscS* linearizado (Figura 14), se mezclaron con 100 µL de células (células electrocompetentes de *P. syringae* pv. *phaseolicola*) y se colocaron en una celda de 2 mm y





se les dio una pulsación de 2.5 KV utilizando un electroporador Biorad. Las células electroporadas se resuspendieron en 1 mL de KB y se agregó 14 mL de medio KB en tubos de capacidad 15 mL, dejándose en anaerobiosis durante una noche. Se tomaron los 15 mL de medio de cultivo y se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 min, la pastilla se resuspendió en 100 μ L de KB y se sembró sobre KB espectinomicina/rifampicina 50 μ g·mL⁻¹/100 μ g·mL⁻¹ dejando las placas en una cámara de anaerobiosis hasta la aparición de colonias en un transcurso de dos días. Posterior a la transformación de *P. syringae* pv. *phaseolicola* se realizó el aislamiento y selección de colonias transformadas y a partir de estas colonias se obtuvo la cepa DNL001.



Figura 14. Representación de la construcción pG-Cond-iscS. Construcción utilizada para obtención de mutante condicional con la estructura genética *yhfQ-aadA7*(Spc^R)-araC-pBAD-*iscS*.

El plásmido pG-Cond-*iscS* es un derivado del PGemT (plásmido suicida) que contiene los genes yhfQ-aadA7(Spc^{R})-araC-*iscS*, este plásmido se construyó en varios pasos. Primero se obtuvo el plásmido pE-*iscS* que fue construido mediante la ligación de un fragmento que contienen el gen *iscS* de *D. dadantii* al plásmido pET-22b en el sitio de restricción NdeI-Xho. Después a partir de la cepa TG1 *spec*RExBAD (Roux *et al.*, 2005) se amplificó el fragmento de la *cassette aadA7* (Spc^R)-*araC* y se insertó en el plásmido pE-*iscS* dando como resultado al plásmido pE-Cond-*iscS*. Por último el fragmento *aadA7* (Spc^R)-*iscS* fue subclonado en el plásmido pG-*yhfQ* (este plásmido es derivado del PGemT que contiene al gen *yhfQ*) (Rincón-Enríquez *et al.*, 2008).

7.10 TRANSFORMACIÓN DE *P. syringae* pv. *phaseolicola* PARA OBTENCION DEL MUTANTE NULO *ISCU*.

A partir del plásmido **pG-R***iscU::km*^{*R*} se liberó el del fragmento Ri*scU::Km*^{*R*} mediante la enzima *EcoRI* (3 unidades de enzima por cada μ g de DNA plasmídico a 37°C durante una





hora) que reconoce dos sitios en el sitio múltiple de clonación pertenecientes al plásmido PGem donde originalmente se insertó el fragmento RiscU y que permite la liberación del mismo. Se tomaron 500 ng del fragmento pG-R*iscU::Km*^R purificado y se siguió el mismo procedimiento para la trasformación y recombinación del mutante condicional. Esto es, se tomaron los 70 µL de las células y se adicionaron junto con los 500 ng de fragmento R*iscU::Km*^R en una celda de 2 mm y se dio un pulso de 2.5 KV y se tomó el volumen mezclando con 1 mL de medio KB y se inoculó en 14 mL de medio KB dejando en anaerobiosis por una noche. El cultivo de una noche se centrifugó y la pastilla se resuspendió en 100 µL de medio KB y se sembró sobre placas KB con kanamicina/rifampicina en una cámara de anaerobiosis (marca BD GasPakTM EZ) hasta la formación de colonias. De las colonias que resultaron resistentes a kanamicina se aislaron de nuevo en placas con KB kanamicina y se realizaron replicas en ampicilina para descartar la incorporación de posibles restos del plásmido. De las colonias que fueron resistentes únicamente a kanamicina se aislaron y se verificaron por PCR y de esta transformación resultó en la cepa DNL002.

7.11 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS MUTANTES DE *P. syringae* pv. *phaseolicola*.

7.11.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE P. SYRINGAE PV. PHASEOLICOLA.

Para evaluar el crecimiento de la cepa 1448A de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* y las cepas derivativas DNL001 y DNL002, se utilizaron medio de cultivo enriquecido KB (King`s Medium) y medio mínimo (M9) con glicerol 0.2% como fuente de carbono. Se inocularon las cepas silvestres 1448A, las cepas DNL001 y DNL002 en los dos medios de cultivo antes mencionados con agitación constante a 200 rpm y a una temperatura de 26°C, registrando densidad óptica a 600 nm de longitud de onda, cada hora por ocho horas hasta alcanzar la fase estacionaria, obteniéndose el tiempo de duplicación (tiempo de generación) utilizando la siguiente fórmula:

 $\frac{n = \log N(t) - \log N(0)}{\log 2}$





Dónde:

N(0)= número inicial de células en la población

N(t)= número final de células en un tiempo t

 $N_{(t)} = N_0 x$ 2n donde n= número de generaciones en un tiempo t

 $\log N_{(t)} = \log N_0 + n \ (\log 2)$

7.11.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS DNL001 Y DNL002 EN CONDICIONES DE ESTRÉS OXIDATIVO Y CARENCIA EN HIERRO.

Para este análisis se realizaron dos evaluaciones en condiciones de estrés para la biogénesis de los centros [Fe-S], para la inducción de estrés oxidativo se utilizó paraquat (Dicloruro de 1,1'-dimetil- 4,4'-bipiridinio), un agente superóxido que causa estrés oxidativo en las células; para la inducción de estrés por carencia en hierro se utilizó un quelator de hierro intracelular (2,2'dipyridil). La prueba de estrés oxidativo se realizó en medio KB en concentraciones de paraquat de 10, 20, 30, 40, 60 y 80 μ M en las que se inocularon diluciones seriales de 0 a 10⁻⁶ de un cultivo en fase exponencial de las cepas DNL00I, DNL002 y la cepa silvestre de *P. syringae* pv. *phaseolicola*. Para la prueba de carencia en hierro se prepararon cajas con medio KB con 2,2'Dipyridil en concentraciones de 150, 300, 450 y 600 μ M. Se prepararon e inocularon las cepas DNL001, DNL002 y silvestre de *P. syringae* pv. *phaseolicola* que para la prueba de estrés oxidativo.

7.11.3 EVALUACION DE LA VIRULENCIA.

Se realizaron pruebas de virulencia sobre plantas de fríjol haciendo escisiones (de aproximadamente de 1 mm²) sobre las hojas de fríjol e inoculando 2 μ L de células a una concentración de 3x10⁷ UFC. Las células que se utilizaron para la prueba fueron obtenidas a partir de un cultivo en fase exponencial y las plantas fueron infectadas después de 15 días de la germinación. Se inocularon 18 plantas para cada cepa (DNL001, DNL001 con 0.2% arabinosa, DNL001 con 0.2% glucosa y DNL002) y se compararon con la cepa silvestre. Se evaluaron los síntomas de la enfermedad en las plantas infectadas con la cepa silvestre





mediante una escala de medición visual de virulencia y se compararon con las cepas mutantes.

7.11.4 PRUEBA DE PRODUCCIÓN DE FASEOLOTOXINA.

Para esta prueba se siguió la metodología utilizada por Staskawicz y Panopopoulos (1979). Se inocularon las cepas DNL001, DNL002 y la cepa silvestre de *P. syringae* pv. *phaseolicola* en medio mínimo M9 con glicerol 0.2% como fuente de carbono a 18°C a 200 rpm por 3 noches para inducir la producción de faseolotoxina. Para la obtención de la faseolotoxina se filtró el medio de cultivo mediante filtros de 0.2 μm.

También se inoculó la cepa DH5- α de *E. coli* en medio mínimo M9 con glicerol 0.2% a 37°C, 200 rpm y a partir de este cultivo se reinoculó para llevar de 0.1 a 0.6 de densidad óptica a 600 nm en mismas condiciones de crecimiento (fase exponencial). Se tomó 1 mL de este cultivo y se sembró sobre toda la placa cubriendo toda la superficie. Después se adicionaron 5 µL del filtrado de las cepas DNL001, DNL 002 y silvestre de *P. siringae* pv. *phaseolicola* (faseolotoxina) y se mantuvo incubando a 37°C hasta la formación de los halos de inhibición.





8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

8.1 CONTEXTO GENÉTICO DE LOS SISTEMAS DE BIOGÉNESIS DE CENTROS [FE-S] DE P. syringae pv. phaseolicola CON RESPECTO A A. vinelandii, E. coli Y D. dadantii.

El sistema ISC de diferentes microorganismos en los que se ha estudiado hasta ahora, se encuentra organizado en un operón compuesto por los genes iscRSUA-hscBA-fdx y es altamente conservado, como se ha reportado en A. vinelandii, E. coli y D. dadantii (Takahashi y Nakamura, 1999; Zheng et al., 1998; Rincón Enríquez et al., 2008). Mediante un análisis bioinformático del genoma de la bacteria Pseudomonas syringae pv. phaseolicola utilizando la herramienta BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) se realizó la búsqueda de los sistemas de biogénesis descritos por otros autores (NIF, SUF e ISC) en el que se determinó de manera putativa la presencia únicamente del sistema ISC. En este sentido, Vinella et al. (2009) mostraron mediante un análisis filogenómico la presencia de la proteína IscA en varias especies del género de *Pseudomonas* entre las que se encuentra la especie syringae y el patovar phaseolicola. Analizando genes del genoma río abajo y río arriba de la cepa 1448A de P. syringae pv. phaseolicola se realizó un esquema que representa su contexto genético en comparación con A. vinelandii, E. coli y D. dadantii, como se muestra en la Figura 15, donde se puede observar que existe una conservación de algunos genes como son trmj e iscX que codifican putativamente por una tRNA metiltransferasa y una proteína hipotética aún sin identificar respectivamente.







Figura 15. Representación esquemática del contexto genético sistema de biogénesis ISC. Se analizó la presencia del sistema ISC compuesto de los genes *iscRSUA-hscBA-fdx* y genes río abajo y río arriba que comprenden su contexto genético de *P. syringae* pv. *phaseolicola* (1448A)y se comparon con el de *A. vinelandii, E. coli* y *D. dadantii.*

Estos resultados permitieron comprobar de manera putativa la presencia del sistema ISC y a su vez abrir la pregunta acerca de si este sistema cumple con la función biológica de la síntesis de centros [Fe-S] en *P. syringae* pv. *phaseolicola*. Para comenzar a responder esta cuestión se comenzó con el análisis *in silico* de la secuencias de aminoácidos de las proteínas IscR, IscU y Fdx del sistema ISC de *P. syringae* pv. *phaseolicola* mediante el *"software CLC sequence"*, en las que se comparó con los microorganismos mencionados anteriormente, se evaluó el porcentaje de similitud y además se determinó las regiones conservadas en las proteínas IscR e IscU mediante la búsqueda de las regiones conservadas presentes en cada una de ellas de acuerdo a lo reportado en la literatura, los resultados de este análisis se en muestran en el Cuadro 2, es claro que hay una gran similitud entre las proteínas (IscR, IscU y Fdx) de *Pseudomonas* y las de microorganismos. Además, se determinó que existe mayor similitud con la secuencia de *A. vinelandii* para el caso de la proteína IscU (*Agar et al.*, 2000).





Cuadro 2.	Porcentaje	de s	similitud	de]	las	proteínas	IscR,	IscU	у	Fdx	de	Р.	syringae	pv.
	phaseolice	ola co	on A. vin	elan	dii,	D. dadan	tii y E	. coli.						

ue pv. la	Proteínas Organismo	A. vineandii (%)	D. dadantii (%)	E. coli (%)
inge licol	IscR	77	58	58
syr	IscU	92	80	77
P. pha	Fdx	64	61	62

Se determinó y analizó la presencia de regiones conservadas encontradas en cada una de las proteínas IscR e IscU, los resultados se presentan en la Figura 16. La proteína IscR posee la región conservada CysX5CysX5Cys2Hys en el que se ha demostrado que los tres residuos de cisteína son necesarios para la función de regulación de esta proteína (Giel et al., 2006), en conjunto con una histidina estudiada recientemente por Fleischhacker et al. (2012) que permiten el acople exitoso del centro [2Fe-2S]. Las posiciones de las cisteínas Cys92, Cys97, Cys102 e His107 coinciden con la secuencia de aminoácidos del regulador IscR de P. syringae pv. phaseolicola. IscR está vinculado con la proteína correspondiente al producto del primer gen del operón ISC y además como se ha reportado su estructura conformacional permite su función como regulador negativo para el sistema ISC (Johnson et al., 2005; Kuo et al., 1992). La comparación de secuencia de la proteína IscR con las secuencias de A. vinelandii, E. coli y D. dadantii muestran una similitud significativa (Figura 16a). Por otro lado, la proteína IscU es un dímero que tiene homología con la función de NifU como una proteína de andamio, como se mencionó antes, IscU posee una región conservada compuesto por Cys³⁷Cys⁶³Cys¹⁰⁶ que permite la interacción con una cisteína desulfurasa (Zheng y Dennin, 1994; Agar et al., 2000) como se muestra en la Figura 16b. También se determinó la presencia de la región conservada LPPVK (Figura 16b) de la proteína IscU que permitió elucidar aún más la potencial función del sistema ISC de P. syringae pv. phaseolicola como la maquinaria de biosíntesis de centros [Fe-S], puesto que es altamente conservado y necesario para el funcionamiento celular de la bacteria (Bonomi et al., 2008; Kim et al., 2012).







Figura 16. Análisis de secuencias de los aminoácidos y regiones conservadas de las proteínas lscR e IscU. Se analizaron las secuencias aminoacídicas de las proteínas IscR (a) e IscU (b) del sistema ISC presentes en *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A y se compararon con las de *Azotobacter vinelandii, Escherichia coli, Dickeya dadantii.* Los aminoácidos resaltados en rojo indican sitios altamente conservados entre las proteínas. Los aminoácidos resaltados con azul muestran las regiones menos conservadas. Las flechas de color negro en IscR (a) indican la posición de la región conervada CysX5CysX2CHis. Las flechas de color azul en IscU (b) indican la presencia de la región conservada Cys³⁷Cys⁶³Cys¹⁰⁶. El símbolo de corchete indica la región conservada LPPVK de la proteína IscU.

Para la evaluación de la función biológica del sistema ISC tanto *in vitro* como *in vivo* en *P. syringae* pv. *phaseolicola* se procedió a la realización de mutaciones utilizando construcciones genéticas que permitieran su análisis, los procedimientos técnicos para realizar estas construcciones se mencionan en el apartado de metodología descrito anteriormente y fueron analizadas previas a su uso para la mutagénesis. Dichos análisis se presentan a continuación:





8.2 ANÁLISIS DE LAS CONSTRUCCIONES GENÉTICAS UTILIZADAS PARA LA MUTAGÉNESIS DEL SISTEMA ISC.

8.2.1 ANÁLISIS DE LA CONSTRUCCIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE LA CEPA DNL001.

La evaluación de las construcciones se realizó mediante un análisis de restricción. Primero se verificó in silico con una carta de restricción del plásmido construido para la obtención del mutante condicional del operón ISC (plásmido pG-Cond-iscS, construido con secuencias de D. utilizando dadantii) el software NEBcutter V2.0 (http://tools.neb.com/NEBcutter2/). El resultado del análisis determinó un sitio de restricción de la enzima HpaI que reconoce únicamente una posición en la secuencia *aadA7*(Spc^R)-araC-pBAD, que permitió obtener un fragmento de 7.5 Kpb que coincide con el tamaño de la construcción (Figura 17).



Figura 17. Análisis de restricción de la construcción pG-Cond-iscS. En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular (1KB plus DNA ladder, Invitrogen), en el segundo carril se muestra el producto de la digestión de pG-Cond-iscS con la enzima HpaI y en el tercer carril se muestra el plásmido pG-Cond-iscS sin el tratamiento con la enzima.

8.2.2 ANÁLISIS DE LA CONSTRUCCIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE LA CEPA DNL002.

El análisis de la construcción del plásmido pG-R*iscU::km*^R que se empleó para la mutagénesis del gen *iscU* y obtención de la cepa DNL002 se hizo mediante una carta de restricción de la secuencia. Para esta construcción se analizó *in silico* la carta de restricción obtenida por el software antes mencionado, del que se determinó la enzima XcmI que





reconoce cuatro regiones en la secuencia del plásmido $pG-RiscU::km^{R}$ como se muestra en la Figura 18.



Figura 18. Representación esquemática del análisis de restricción in silico con la enzima Xcml de la construcción del plásmido pG-RiscU::kmR. Los fragmentos esperados son de 3.39, 1.9, 1.2 y 0.84 Kpb en el que uno de los sitios de restricción se encuentra dentro de la casette *aphA*-3.

El resultado obtenido de la digestión con la enzima XcmI se muestra en la Figura 19, en dicha figura se observan los fragmentos esperados respecto al esquema anterior. De acuerdo a estos resultados se pudo determinar que la *cassette aphA-3* se encontraba insertada en el mismo sentido de la transcripción del gen *iscU*.



Fragmento esperado3.39, 1.9, 1.2 y 0.84 ~KpbFigura 19. Verificación de la construcción para mutagenizar el gen iscU. En el carril 1 se muestra el marcador de
peso molecular (1KB plus DNA ladder, Invitrogen), el carril 2 muestra el resultado de la digestión del
plásmido pG-RiscU::km^R con la enzima XcmI. El carril 3 muestra el plásmido (pG-RiscU::km^R) sin
tratamiento con enzima.





8.3 ANÁLISIS DE LAS INSERCIONES EN LA CEPA *P. syringae* pv. *phaseolicola.*

8.3.1 ANÁLISIS DE LA CEPA DNL001.

En general lo que se pretendió con el análisis fue la identificación de la presencia de algún evento de doble recombinación homóloga del plásmido pG-Cond-iscS en el genoma de P. syringae pv. phaseolicola para lo que se realizaron diferentes pruebas. Comenzando con las cepas transformadas obtenidas en primera instancia por la selección en antibióticos, seleccionando únicamente las que crecían en espectinomicina y descartando las que poseían también la resistencia a ampicilina, esto con el fin de descartar que las cepas que probablemente hayan integrado todo el plásmido. Las cepas fueron aisladas nuevamente para continuar con el "screening" en el que se identificó las cepas que presentaron menor crecimiento, suponiendo que pudieran ser cepas con alguna deficiencia fisiológica ocasionada por la mutación generada tomando como referencia a la cepa silvestre. Debido a que el evento de doble recombinación homóloga se generaría sobre la secuencia del gen rio arriba y rio a bajo de *iscR* nos preguntamos en principio si este gen se encontraba presente en la cepa DNL001. Se realizó la verificación de la ausencia de este gen por PCR en que se obtuvo un fragmento de 1.2 Kpb que corresponden al gen *iscR* y se determinó su presencia dentro de la cepa DNL001 al igual que la cepa silvestre (Figura 20a). Otra pregunta que se elucidó fue la presencia de la cassette aadA7(Spc^R)-araC-pBAD por lo que las cepas seleccionadas se analizaron por PCR obteniendo la amplificación del fragmento de 2.27 Kpb generando como resultado preliminar a la cepa DNL001 como se muestra en la Figura 20c. Después de determinar la presencia de la cassette se analizó la secuencia río abajo donde se esperaba que hubiese ocurrido el evento de recombinación de secuencias homólogas en el operón ISC, no obstante se obtuvo un resultado negativo debido a que no se trataba de un evento de doble recombinación homóloga si no de un evento de inserción al azar dentro del genoma de la bacteria en cuestión, ya que los fragmentos amplificados obtenidos en la cepa DNL001 se observaron de igual manera en la cepa silvestre (Figura 20c).







Figura 20. Verificación del mutante condicional ISC (DNL001). La figura (a) muestra la amplificación de la *cassette aadA7*(Spc^R)-araC-pBAD de una cepa con recombinación del plásmido; la figura (b) muestra el fragmento río abajo de la *cassette* donde se muestra la amplificación de los fragmentos de forma homogénea en la cepa silvestre y la cepa DNL001. En los carriles 1 se muestra el marcador de peso molecular (1KB plus DNA ladder, invitrogen), 2 y 3 se muestran los productos de las reacciones de PCR. Los signos de interrogación indican que el resultado que se obtendría no se conocía.

8.3.2 ANÁLISIS DE LA CEPA DNL002.

Las cepas fueron transformadas con la construcción $iscU::km^R$, que fue obtenido a partir del plásmido pG-R $iscU::km^R$ mediante la digestión con la enzima EcoRI como muestra la Figura 21 en la que se observa la liberación del fragmento del plásmido con un tamaño resultante de 4.47 Kpb.









Estos transformantes fueron preliminarmente seleccionadas como potenciales mutantes *iscU*, aquellas cepas que poseían la resistencia a la kanamicina y sensibilidad a la ampicilina, posteriormente diversos aislamientos fueron realizados para la identificación y separación de cepas homogéneas en cuanto a características visuales en medio sólido KB. Estas cepas no poseían diferencias visibles pero fueron aisladas cada una de ellas debido a la baja densidad de transformantes. Para la continuación del "*screening*" se procedió a la amplificación del gen *iscU*, esperando obtener una única señal correspondiente al tamaño del gen más el tamaño de la cassette *aphA-3* es decir obtener como resultado un fragmento uno correspondiente al gen silvestre *iscU* que corresponden a un tamaño de amplificación de 1.06 Kpb y otro al mutado *iscU::km^R* que corresponde a uno de 1.9 Kpb como muestra la Figura 22 lo que podría resultar de un evento de inserción al azar. A una de estas cepas se le denomino DNL002.



Figura 22. Análisis por PCR del mutante iscU (DNL002) para la verificación de la recombinación. En los carriles 1 se muestra el marcador de peso molecular (1KB plus DNA ladder, Invitrogen), en el carril 2 se muestra la amplificación del gen *iscU* en la cepa silvestre y en el carril 3 se muestra la amplificación del gen *iscU* silvetre y mutado de la cepa DNL002.

Después de la obtención de estos resultados se generó la cuestión de si se trataba de algún evento de inserción al azar o bien si se trataba de algún evento de recombinación simple dentro del operón ISC, para lo que se realizaron múltiples reacciones de PCR río arriba y río abajo de la *cassette aphA-3*. Se logró determinar que potencialmente se generó un evento de recombinación simple entre los genes *hscB* y *hscA*, puesto que al amplificar secuencias río arriba de la cassette se generaron tres fragmentos uno de aproximadamente 5.1, 2.4 y 1.6 kpb utilizando los oligonucleótidos IscR1-IscS1-aphA3-3, indicando que la secuencia de la construcción se encuentra dentro del genoma de la bacteria en cuestión y que





además se encuentra por debajo del gen *hscB* (Figura 23a). Al mismo tiempo se buscó la amplificación de secuencias río abajo obteniendo una señal de aproximadamente 3.3 Kpb que corresponden a las secuencias pertenecientes a la construcción en conjunto con la secuencia del gen *hscA*, que es un gen fuera de la zona de recombinación y a su vez fue el punto crucial para determinar la zona en la que fue recombinada la secuencia introducida dentro de la célula (Figura 23b).



Figura 23. Análisis por PCR de la cepa DNL002 para la verificación de la zona de recombinación. En los carriles 1 se muestra el marcador de peso molecular (1KB plus DNA ladder, Invitrogen) y en los carriles 2 se muestran los productos del PCR a partir del genoma de la cepa DNL002.

El resultado que se observó en los productos de la PCR del genoma de la cepa DNL002 generó una idea de cómo se llevó acabo un evento de inserción dentro del operón ISC y permitió diseñar un esquema sobre la probable organización de los genes en el operón ISC de la cepa DNL002 (Figura 24).







Figura 24. Representación esquemática general de la recombinación del gen iscU mutado en el operón ISC del genoma de la cepa DNL002. En el esquema se muestran las posiciones de los oligonucleótidos utilizados para la búsqueda de la mutación los sentidos de cada uno y los tamaños de amplicones.

El análisis molecular finalizó con la evaluación de fragmentos amplificados correspondientes a las regiones intergénicas (ITS) de ambas cepas y se compararon con la cepa silvestre, esto con el fin de descartar que se trate de alguna cepa contaminante la que generó los resultados. A través de un previo análisis *in silico* mediante la herramienta BLAST se determinó la presencia de cinco operones que codifican por los genes ribosomales con una región intergénica de 600 pb como se muestra en la Figura 25.



Figura 25. Representación esquemática de las regiones intergénicas de *P. syringae* **pv.** *phaseolicola*. Se realizó el análisis mediante un BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) utilizando los oligonucleótidos L1 y G1 (Cuadro 1). Se determinaron los operones que codifican por los genes ribosomales rrsA-rrlA-rrfA, rrsB-rrlB-rrfB, rrfC-rrlC-rrsC, rrfD-rrlD-rrsD y rrfE-rrlE-rrsE.

El resultado del análisis ITS fue el esperado en ambas cepas generaron fragmentos de 600 pb similar al de la cepa silvestre determinando que se trata de la misma cepa modelo





que se utilizó en un inicio para la transformación. En la Figura 26 se muestran los fragmentos amplificados con los oligonucleótidos L1 y G1 (las secuencias se muestran en el Cuadro 1).



Figura 26. Amplificación por PCR de las regiones intergénicas ribosomales (ITS) de la cepa DNL001 y DNL002. En los carriles 1 se muestra el marcador de peso molecular (1KB plus DNA ladder, Invitrogen), en los carriles 2 se encuentra el ITS de cepas DNL001 y DNL002; en los carriles 3 se muestra el ITS de la cepa silvestre.

Las observaciones que se realizaron en ambas cepas (DNL001 y DNL002) permitieron determinar algunos puntos importantes que se analizaron: primero en el caso de la cepa DNL001 se verificó si la mutación que se obtuvo por la inserción dentro del genoma de *P. syringae* pv. *phaseolicola* generó deficiencias fisiológicas en condiciones óptimas y hostiles (de estrés) para el desarrollo de la bacteria, además si se afectó su principal factore de virulencia que es la producción de faseolotoxina. Respecto al mutante DNL002 las preguntas planteadas fueron: si se generó alguna modificación en los marcos de lectura de genes del operón ISC y si estas modificaciones afectaron la fisiología de las células al momento de exponerse a efectos ambientales restrictivos para el crecimiento y virulencia de la bacteria.

8.4 EFECTO DE LAS INSERCIONES EN EL CRECIMIENTO BACTERIANO DE LAS CEPAS DNL001 Y DNL002 DE *P. syringae* pv. *phaseolicola*.

Para estudiar los efectos de las inserciones que se generaron en ambas cepas (DNL001 y DNL002), se comenzó con la determinación de su tiempo de generación en medio rico y se hizo una comparación con la cepa silvestre para poder evaluar los efectos en el crecimiento.





Los cálculos mostraron un tiempo de duplicación celular de la cepa DNL001 de 2 h 46 min y de aproximadamente 2 h para las cepas silvestre y DNL002. En el caso de la cepa DNL001 mostró un efecto de retraso en su crecimiento respecto a la cepa silvestre, es decir tanto el tiempo necesario para que comenzara su fase exponencial como el tiempo de generación fueron notablemente incrementados. Este resultado podría interpretar una noción acerca de si la inserción generada tendría un efecto aun cuando el promotor (pBAD) se encontraba sin inducir o reprimir la transcripción del gen *iscS*. En la Figura 27 se presenta la curva de crecimiento de la cepa DNL001 y la cepa silvestre, en dicha figura se aprecia un incremento en el tiempo de generación (pendientes de la curva de crecimiento en la fase exponencial de crecimiento). Un trabajo realizado por Tokumoto y Takahashi (2001) en cepas mutantes del sistema ISC de *E.coli* en los genes *iscSU-hscBA-fdx* en el que también mostraron deficiencias en crecimiento de los mutantes incrementando su tiempo de duplicación celular. Por su parte, Rincón-Enríquez *et al.* (2008) obtuvieron fenotipos similares al analizar mutantes de los genes *iscU, hscA y fdx* en *D. dadantii.*



Figura 27. Cinética de crecimiento bacteriano de las cepas DNL001 y la cepa silvestre en medio rico KB. Este experimento se observó durante 8 horas consecutivas y se determinó en las primeras 6 horas su fase exponencial, por último se observó una lectura a las 24 horas después del inóculo para determinarlo como crecimiento final. Las flechas indican los puntos en donde se observó la fase exponencial de cada una de las cepas. La denotación 1448A se refiere a la cepa silvestre de *P. siringae* pv. *phaseolicola*. Este grafico es el resultado representativo de cuatro experimentos independientes.





Se procedió a indagar sobre el efecto que generó el inducir o reprimir el promotor pBAD (gen *iscS*) de la cepa DNL001. Los resultados de este punto se presentan en la Figura 28, para inducir el promotor pBAD se utilizó arabinosa (a), mientras que para reprimirlo se hizo con glucosa (g). El resultado no mostró alguna diferencia de la cepa DNL001 cuando se aplicaba un tratamiento u otro es decir, el fenotipo observado en el experimento anterior (Figura 27) se seguía presentando, mostrando un déficit del crecimiento bacteriano de la cepa DNL001 con respecto a la silvestre en medio rico KB, por lo cual se piensa que posiblemente este fenotipo es ocasionado por la inserción, mas precisamente al efecto generado por la presencia del gen *iscS* de *D. dadantii* de la construcción genética ya que el promotor cuando se encuentra sin inducir o reprimir su transcripción se generan pequeñas cantidades de transcrito de *iscS* de igual manera cuando se encuentra en presencia de glucosa (Roux *et al.*, 2005), pudiendo generar un efecto sobre el crecimiento bacteriano relacionado a la homeostasis de centros [Fe-S].



Figura 28. Efecto del promotor pBAD sobre la cinética de crecimiento bacteriano de las cepas DNL001. El rótulo "a" indica que la cinética de la cepa se desarrolló en presencia de arabinosa, "g" indica que la cinética de la cepa fue en presencia de glucosa. Este experimento se observó durante 8 horas consecutivas y se determinó en las primeras 6 horas su fase exponencial, por último se observó una lectura a las 24 horas después del inóculo para determinarlo como crecimiento final y las observaciones se compararon con la cepa silvestre. La flecha indica los puntos en donde se observó la fase exponencial de cada una de las cepas. La denotación 1448A se refiere a la cepa silvestre de *P. siringae* pv. *phaseolicola*. Este grafico es el resultado representativo de cuatro experimentos independientes.





En el caso de la cepa DNL002 no generó diferencia de crecimiento bacteriano respecto a la cepa silvestre en medio rico KB. La Figura 29 se muestra un comportamiento similar entre la cepa silvestre y DNL002, esta cepa tuvo un tiempo de generación de 2 h 10 min, mientras que la cepa silvestre fue de 2 h. La fase exponencial en ambas cepas inicio al mismo tiempo. Este resultado en conjunto con el mostrado por Cuellar-Torres (2010) permiten elucidar que los efectos por inserciones no generan deficiencias fenotípicas en el crecimiento bacteriano de *P. syringae* pv. *phaseolicola*.



Figura 29. Cinética de crecimiento bacteriano de las cepas DNL002 y silvestre. Este experimento se observó durante 8 horas consecutivas y se determinó en las primeras 6 horas su fase exponencial, por último se observó una lectura a las 24 horas después del inóculo para determinarlo como crecimiento final. La flecha indica el punto en donde se observó la fase exponencial de cada una de las cepas. La denotación 1448A se refiere a la cepa silvestre de *P. siringae* pv. *phaseolicola*. Este grafico es el resultado representativo de cuatro experimentos independientes.

También se mostró el efecto del medio mínimo en ambas cepas para determinar diferencias fenotípicas puesto que en el caso de la cepa DNL001 aun en medio rico mostró deficiencias para su crecimiento, por lo que se esperaba que en medio mínimo tuviera alguna variación en el crecimiento aun mayor debida al medio de cultivo limitante en el que





se encontraba. En los resultados se observó el mismo comportamiento que el presentado en medio rico tanto para la cepa DNL001 como la DNL002 con respecto a la cepa silvestre (datos no mostrados).

Puesto que la construcción pG-Cond-*iscS* con la que fue obtenida la cepa DNL001 posee el gen *iscS* relacionado con la biogénesis de centros [Fe-S] (Rincón-Enríquez *et al.*, 2008; *Shi et al.*, 2010; Urbina *et al.*, 2001) y además la cepa DNL002 contiene una mutación dentro del operón ISC se procedió a evaluar ambos mutantes en condiciones delimitantes y perjudiciales para el crecimiento y a su vez para la biogénesis de los centros [Fe-S] como son el estrés oxidativo y la carencia en hierro, de acuerdo a los antecedentes revisados en el presente trabajo. Esto con el fin de determinar si las inserciones generadas tanto dentro del genoma de *P. syringae* pv. *phaseolicola* como la que se produjo dentro del operón ISC

8.5 EFECCTO DE LAS INSERCIONES DE LAS CEPAS DNL001 Y DNL002 EN CONDICIONES DELIMITANTES PARA LA BIOGÉNESIS DE LOS CENTROS [Fe-S].

8.5.1 ESTRÉS OXIDATIVO DE TIPO SUPEROXIDO.

Para la evaluación de las pruebas de estrés que generaron condiciones hostiles para la biogénesis de los centros [Fe-S] con las que se analizaron las cepas DNL001 y DNL002 fueron en presencia de paraquat (generador de estrés oxidativo por un radical superóxido) y 2,2'dipyridil (DIP) un agente quelator de hierro (generador de estrés por carencia en hierro). Primeramente se evaluó la susceptibilidad al estrés oxidativo en la cepa DNL001 en medio rico sin inducir el promotor pBAD (es decir en ausencia de arabinosa ó glucosa), esto para determinar el efecto de la inserción a nivel fenotípico. El resultado obtenido mostró una diferencia de crecimiento a partir de la dilución 10^{-2} (Figura 30), en dicha dilución se observa una notable disminución del crecimiento bacteriano a una concentración de 10 μ M de paraquat en comparación con la cepa silvestre que crece en una proporción mayor que la cepa DNL001 (Figura 30). Resultados similares se generaron en un trabajo realizado por Rincón-Enríquez *et al.* (2008) en el que se evaluó el efecto del estrés oxidativo en mutaciones de genes del operón ISC en *D. dadantii* en el que encontraron fenotipos deficientes a crecimiento bacteriano por efecto del estrés oxidativo, atribuido a la





incapacidad de la célula para realizar la biosíntesis de centros [Fe-S] y adaptación a estas condiciones ambientales.



Figura 30. Evaluación del estrés oxidativo provocado por el paraquat (PQ) en la cepa DNL001. Se evaluaron las diluciones seriales tanto de la cepa DNL001 como de la cepa silvestre de 0 hasta 10^{-6} en medio rico KB con presencia de distintas concentraciones de PQ. Se muestra una deficiencia de crecimiento a partir de 10 µM de paraquat en la cepa mutante. La cepa silvestre comenzó a mostrar un fenotipo de susceptibilidad a una concentración de 20 µM de paraquat, a diferencia del mutante que mostró deficiencia de crecimiento a partir de la concentración de 10 µM de paraquat. El resultado es representativo de 3 experimentos independientes.

Para poder elucidar si el fenotipo observado estaba dado completamente a la inserción, o bien si se generarían diferencias fenotípicas en la cepa DNL001 al momento de ser inducido o reprimido el promotor pBAD (producción de IscS) se procedió a evaluarlo en presencia de arabinosa y de glucosa. El resultado fue contundente debido a que se observó que la cepa DNL001 en presencia de arabinosa o de glucosa mantenía el mismo fenotipo susceptible al estrés oxidativo el cual pudiera estar atribuido a la presencia del gen *iscS* de *D. dadantii* generando un fenotipo similar al de la cepa cuando no se inducia o reprimía el promotor más notoriamente en la concentración de 10 μ M de paraquat (Figura 31a y b). Este resultado podría relacionarse con alguna deficiencia atribuida a algún efecto de descompensación en la homeostasis de los centros [Fe-S].



60

80





Figura 31. Evaluación del efecto de la inducción del promotor pBAD de la cepa DNL001 en presencia de estrés oxidativo. Se inocularon diluciones seriales de la cepa silvestre (a) y de la cepa DNL001 (b) de 0 hasta 10⁻⁶ y se analizaron en presencia tanto de arabinosa y de glucosa en medio rico con distintas concentraciones de PQ. Se observa un incremento en la resistencia a una concentración de 20 μM de PQ en la cepa DNL001 en presencia de arabinosa o glucosa a una concentración de 20 μM de PQ nen la silvestre con arabinosa o glucosa a una concentración de 20 μM de PQ no se muestra diferencias significativas.

En el caso de la cepa DNL002 la hipótesis generada después de analizar el genotipo fue que el evento de recombinación generado dentro del operón ISC tendría algún efecto al ser expuesto a estrés oxidativo, ya que existen reportes (Nachin *et al.*, 2001; Nachin *et al.*, 2003; Djaman *et al.*, 2004; Rincón-Enríquez *et al.*, 2008) que muestran las deficiencias de cepas mutantes del operón ISC al estrés oxidativo. Sin embargo cuando se realizó la evaluación no





se presentó ningún fenotipo de la cepa DNL002 en comparación con la cepa silvestre como se muestra en la Figura 32.



Figura 32. Evaluación del efecto del estrés oxidativo generado por PQ en la cepa DNL002. Se inocularon diluciones seriales de 0 hasta 10⁻⁶ tanto de la cepa silvestre como de DNL002 sobre medio rico en presencia de PQ. La cepa DNL002 no mostró diferencias fenotípicas con respecto a la cepa silvestre.

Notoriamente se pudo concluir con estos experimentos que la presencia del gen *iscS* de *D. dadantii* generó diferencias fenotípicas en relación a la cepa silvestre y estas diferencias pudieran ser atribuidas a que las células disminuyeron su capacidad de tolerancia al estrés oxidativo debido al déficit de síntesis de centros [Fe-S]. Además la presencia de arabinosa o de glucosa en el medio nutritivo KB no tuvo un efecto sobre las células en incrementar su tolerancia o susceptibilidad a este tipo de estrés muy posiblemente dado al gen *iscS* de *D. dadantii*. Además los resultados mostrados por la cepa DNL002 demuestran que el efecto de una inserción dentro del genoma de *P. syringae* pv. *phaseolicola* no genera diferencias fenotípicas al estrés oxidativo. Por otra parte un trabajo realizado por Cuellar-Torres (2010) mostró que no se presentaban efectos fenotípicos relacionados con el estrés oxidativo en cepas de *P. syringae pv. phaseolicola* que contenían inserciones dentro de su genoma.

8.5.2 ESTRÉS POR CARENCIA EN HIERRO PROVOCADO POR DYPIRIDIL.

También se determinó el efecto fenotípico en la cepa DNL001 generado por la carencia en hierro provocado por un agente quelante intracelular manteniendo la zona promotora pBAD de la cepa DNL001 de la construcción insertada en el genoma sin inducir o reprimir





el promotor de *iscS* de *D. dadantii*. La cepa DNL001 mostró un fenotipo de sensibilidad al DIP, dado que la presencia de este agente quelante disminuyó el desarrollo de la cepa DNL001 en medio KB, haciéndose más evidente a partir de una concentración de 300 μ M en comparación con la cepa silvestre (Figura 33).



Figura 33. Evaluación del estrés por carencia en hierro provocado por dypiridil (DIP) en la cepa DNL001 y silvestre en medio rico KB. Se evaluaron las diluciones seriales de las cepas DNL001 y silvestre de 0 hasta 10⁻⁶, en las que se muestra una deficiencia de crecimiento a partir de 150 μM de DIP en la cepa DNL001. La cepa silvestre comenzó a mostrar un fenotipo de sensibilidad más aparente en una concentración de 600 μM de DIP.

Después se determinó si el fenotipo estaba asociado a la inserción o si podría haber alguna diferencia fenotípica al inducir o reprimir la expresión del promotor pBAD (transcripción del gen *iscS*) que contenía la construcción y determinar la participación de la inserción al estrés por carencia en hierro. El resultado esperado era similar al observado en el estrés oxidativo puesto que pudiese tratarse de un efecto fisiológico ocasionado por la inserción del gen *iscS de D. dadantii* en el genoma de *P. syringae* pv. *phaseolicola* como se mencionó anteriormente. A pesar que la cepa DNL001 mostró una sensibilidad a DIP cuando no se inducia o reprimía la expresión del pBAD (Figura 33) en comparación con la cepa silvestre; en las condiciones de represión o inducción del promotor (pBAD) no se logró encontrar alguna diferencia (en presencia de arabinosa ó glucosa), en ambas condiciones se presentaron un mismo fenotipo la cepa DNL001 comenzó a ser susceptibles a una concentración de 300 μ M (Figura 34). En cepas que poseen tanto el sistema ISC como el SUF se ha demostrado que el sistema SUF participa en la capacidad de la células al adaptarse a este tipo de estrés por carencia en hierro y el sistema ISC tiene una mayor





participación al estrés oxidativo (Nachin *et al.* 2001; Rincón-Enríquez *et al.*, 2008), por lo que podría concluirse que la susceptibilidad al estrés por carencia en hierro se atribuye a la presencia del gen *iscS* de *D. dadantii* y su posible implicación en la homeostasis de la biosíntesis de centros [Fe-S], determinando así que el sistema ISC es el principal mecanismo de biosíntesis de centros [Fe-S] de *P. syringae* pv. *phaseolicola* participa tanto en presencia de estrés oxidativo como de carencia en hierro lo que se corrobora con el análisis *in silico* de los sistemas de biogénesis de centros [Fe-S].



Figura 34. Evaluación del efecto de la inducción del promotor pBAD de la cepa DNL001 en presencia de estrés por carencia en hierro. Se analizó el efecto provocado por dypiridil (DIP) sobre la fisiología de la cepa DNL001 y silvestre en medio rico KB. Se evaluaron las diluciones seriales de la cepa silvestre (a) y de la cepa DNL001 (b) de 0 hasta 10⁻⁶ y se analizaron en presencia tanto de arabinosa y de glucosa. Se observa una sensibilidad de la cepa silvestre el estrés por carencia en hierro en presencia arabinosa ó glucosa; además en la cepa silvestre el estrés por carencia en hierro en presencia de arabinosa o glucosa no mostró diferencias significativas





Se determinó el efecto fisiológico generado por la inserción generada dentro del operón ISC en la cepa DNL002 en presencia de DIP y se comparó con la cepa silvestre. La cepa DNL002 logró observarse resultado que mostrara alguna diferencia fenotípica en comparación con la cepa silvestre, ambas generaron comportamientos de crecimiento bacteriano similares en limitación de hierro como se muestra en la Figura 35.



Figura 35. Evaluación del estrés por carencia en hierro provocado por el dypiridil (DIP) de la cepa DNL002. Se evaluaron las cepas DNL002 y silvestre en medio rico KB bajo condiciones limitantes de hierro, se inocularon diluciones seriales tanto de la cepa DNL001 como de la cepa silvestre de 0 hasta 10⁻⁶, en las que la cepa DNL002 no presentó alguna diferencia significativa en el crecimiento en comparación con la cepa silvestre.

Se evaluó el grado de virulencia de las cepas DNL001 y DNL002 y se compararon sus fenotipos con la cepa silvestre para determinar si tenían alguna implicación ambas inserciones en la adaptación de la bacteria a su hospedero, debido a que mostraron deficiencias fisiológicas al crecimiento en presencia de un agente generador de superóxido y la limitación del hierro.

8.6 EFECTO DE LAS INSERCIONES SOBRE LA VIRULENCIA DE *P. syringae* pv. *phaseolicola* EN PLANTAS DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*).

Ambas cepas (DNL001 y DNL0002) fueron evaluadas *in vivo* en plantas de frijol para determinar su grado de virulencia y determinar si las inserciones realizadas tienen una participación en la adaptación de cada cepa a su hospedero natural (frijol). Se comenzó con el establecimiento de una escala de medición de la virulencia realizando pruebas en 18 plantas de frijol infectadas con *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A. El inóculo se colocó en





uno de los foliolos de la hoja y se observó la evolución de la sintomatología durante 24 días. La escala de medición se muestra en la Figura 36, dicha imagen presenta los síntomas que van desde el foliolo sano hasta generar su desprendimiento de la hoja.



Figura 36. Escala de medición de la virulencia de P. syringae pv. phaseolicola 1448A. Los síntomas observados fueron realizados en un periodo de 24 días después de la inoculación. Los síntomas comienzan con la clorosis en el sitio de infección y se expande hasta alcanzar todo el foliolo y generar el desprendimiento del mismo. Los cuadros mostrados en la parte superior son los colores usados para cada grado de virulencia en los gráficos.

Con el fin de tener un control para cada cepa (DNL001 y DNL002) evaluada se procedió como sigue: en cada planta infectada se inoculo sobre la misma hoja la cepa silvestre como control positivo (*P. syringae* pv. *phaseolicola*) en un foliolo y la cepa con alguna de las inserciones en otro, esto con la finalidad de tener las mismas condiciones fisiologías del hospedero. En las próximas Figuras se mostrarán las evaluaciones de cada mutante con su propio control (cepa silvestre).

Para la cepa DNL001 sin inducción o represión del promotor (glucosa o arabinosa) los síntomas fueron apareciendo lentamente en comparación con la silvestre, posiblemente debido a la incapacidad de adaptación a las condiciones generadas por la planta, así a los 20 días después de infección se comenzaron a diferenciar 3 síntomas. Y al final del experimento la cepa DNL001 mostro solo un 12.5% de plantas que presentaron el síntoma 5 en comparación con la cepa silvestre, la cual generó 37.5% (Figura 37).







Figura 37. Escala de medición de la virulencia de P. syringae pv. phaseolicola 1448A. Se infectaron plantas de frijol con la cepa DNL001 (a) y silvestre (b) observando la sintomatología durante un periodo de 24 días. Los síntomas fueron apareciendo más rápidamente en la cepa silvestre, se observa claramente que la evolución de la virulencia de la cepa DNL001 se presentó con mayor deficiencia debido que presento hasta el día 24 el grado de virulencia 5. n=18.

El efecto encontrado en las plantas infectadas con la cepa DNL001 podría ser atribuido a la capacidad de adaptación a las condiciones limitantes generadas dentro del hospedero debido a que al contacto con la planta, esta genera estrés oxidativo y además barreras físicas que limitan la absorción de nutrientes e impiden que el patógeno se propague fácilmente al mismo tiempo genera una serie de diversos metabolitos secundarios que desempeñan un papel relevante en la protección de la planta (Agrios, 2005; Dixon, 2001; Ospina *et al.*, 1981). Rincón-Enríquez *et al.* (2008) mostraron que los sistemas de biogénesis de centros [Fe-S] SUF e ISC, están implicados en la virulencia de *D. dadantii* contra *A. thaliana* determinando que tienen un papel clave que le permite a *D. dandantii* adaptarse a las condiciones encontradas en hospederos infectados particularmente en términos de estrés oxidativo y carencia en hierro. Otro trabajo relacionado con la virulencia y los sistemas de biogénesis de centros [Fe-S] fue el que realizó Nachin *et al.* (2001) en el que mostraron que el sistema SUF era necesario para una completa virulencia de *D. dadantii* en *Saintpaulia ionantha.* Por lo que podría determinarse que el sistema ISC de *P. syringae* pv. *phaseolicola* funciona como única y además está involucrado en su virulencia en plantas de frijol.

También se determinó si los síntomas observados en el experimento anterior eran determinados por el efecto de la inserción y no por el gen *iscS* de *D. dadantii* al ser inducido por el promotor o bien si se trató de un efecto generado por la inserción, se




procedió a evaluarlo mediante la inducción (arabinosa) o represión (glucosa) de la transcripción de gen río abajo de este promotor. La cepa DNL001no mostró tener efecto sobre el hospedero comparando con el resultado de cuando no se inducia o reprimía el promotor (Figura 38b), lo que es comparable con los experimentos realizados *in vitro* en los que se obtuvo una susceptibilidad tanto al estrés oxidativo como al de carencia en hierro ya que como se mencionó antes, la planta genera este tipo de estrés como mecanismo de defensa en primera instancia (Agrios, 2005).



Figura 38. Evaluación de la virulencia las cepas DNL001 y silvestre en presencia de arabinosa. Se evaluó la evolución de la virulencia sobre hojas de plantas de fríjol durante un periodo de 24 días. Los síntomas fueron apareciendo más rápidamente en la cepa silvestre, además se observó que la cepa DNL001 mostró una disminución en la capacidad de virulencia respecto a la cepa silvestre, pero la presencia del síntoma 5 tanto en DNL001 y la cepa silvestre fue casi la misma proporción sin embargo no logró recuperar el fenotipo de la cepa silvestre. n=18.

En el caso la represión del promotor pBAD (glucosa), la cepa DNL001 mostró una evolución de su virulencia similar que con arabinosa o sin inducir o reprimir la transcripción de *iscS* de *D. dadantii*. A diferencia con el experimento anterior, en este no se observó el síntoma 5 en ninguna de las plantas infectadas en el día 24 después de la infección, en el caso de la aparición de los síntomas estos fueron presentándose de igual manera en presencia de arabinosa o cuando había ausencia de ambos azúcares y mostrando una afectación en comparación con la cepa silvestre (Figura 39b).







Figura 39. Evaluación de la virulencia las cepas DNL001 y silvestre en presencia de glucosa. Se evaluó la evolución de la virulencia sobre hojas de plantas de fríjol durante un periodo de 24 días. Los síntomas en hojas con la cepa silvestre apareciendo más rápidamente que en DNL001, además se observó que la cepa DNL001 disminuyo su capacidad de virulencia al no aparecer el síntoma 5 al término del periodo de experimentación generando únicamente un 18.75% de plantas con síntoma 3 al día 24 después de la infección. n= 18.

Los efectos generados en la cepa DNL001 tanto cuando se induce o no el promotor pBAD permiten determinar un efecto de la inserción sobre varios fenotipos (sensibilidad a estrés y disminución de la virulencia), por lo que podría sugerirse que la inserción que contiene el gen *iscS* de *D. dadantii* está implicada en los fenotipos encontrados en este trabajo de investigación.

En el caso de la cepa DNL002 no presentó diferencias en su grado de virulencia en comparación con la cepa silvestre, es decir, el mutante generó un nivel de virulencia similar a una cepa silvestre por lo que la inserción dentro del operón ISC no generó ningún efecto sobre su adaptación a su hospedero, ni en la producción de sus factores de virulencia en el hospedero tal como muestra la Figura 40.







Figura 40. Evaluación de la virulencia de las cepas DNL002 y silvestres. Se analizó la evolución de la virulencia sobre hojas de plantas de fríjol durante un periodo de 24 días. Los síntomas de las dos cepas (DNL002 y silvestre) fueron apareciendo de una forma similar, se observó que el mutante no genero alguna diferencia significativa en el su capacidad de virulencia con respecto a la silvestre. n=18.

La cepa DNL002 mostró fenotipos similares al silvestre tal como sucedió con las pruebas *in vitro* de estrés oxidativo y de carencia en hierro por lo que se puede probar que el efecto de la inserción no genera deficiencias fisiológicas relacionadas a estos tipos de estrés y además a su virulencia.

Después interesó saber es si estas deficiencias en la virulencia presentadas por la cepa DNL001 y si una inserción (DNL002) tenían una relación con la biosíntesis de faseolotoxina por lo que se evaluó la producción de este factor de virulencia de *P. syringae* pv. *phaseolicola*.

8.7 EFECTO DE LAS INSERCIONES SOBRE LA PRODUCCIÓN DE FASEOLOTOXINA.

Para conocer si las inserciones estaban involucradas en la producción de uno de los principales factores de virulencia de *P. syringae* pv. *phaseolicola*, se realizó una prueba *in vitro* para evaluar la síntesis de esta toxina (faseolotoxina, esta toxina inhibe la biosíntesis de arginina). Se determinó que la presencia de la mutación no genero diferencias en la producción y secreción de la faseolotoxina debido a que tanto las cepas DNL001 y DNL002 como la cepa silvestre generaron halos de inhibición en el crecimiento *E. coli* en medio mínimo M9 (Figura 41).







Figura 41. Evaluación de la producción de faseolotoxina. Se analizó la producción en las cepas la silvestre de *P. syringae* pv. *phaseolicola* (1), DNL001 sin estímulo (2), DNL001 en presencia de arabinosa (3), DNL001 en presencia de glucosa (4) y la cepa DNL002 (5). Se evaluó la inhibición del crecimiento de *E. coli* en medio mínimo M9 tanto en ausencia de arginina (a) y el crecimiento presencia (b) de L-arginina. Las flechas rojas indican los sitios donde se agregaron 5 μL de extracto crudo del sobrenadante del cultivo bacteriano (que contenía faseolotoxina). Los puntos blancos que se observan en el medio de cultivo son colonias de *E. coli*.

Con este experimento se pudo determinar que la inserción de la cepa DNL001 no generó un efecto sobre este factor de virulencia de la bacteria por lo que las deficiencias encontradas son asociadas con el efecto generado por el gen *iscS* de *D. dadantii*. Un trabajo previo realizado por Cuellar-Torres (2010) en el que se obtuvo un mutante producto de una inserción en el genoma de *P. syringae* pv. *phaseolicola* se determinó que el efecto generado por la inserción al igual que en las cepas DNL001 y DNL002, no tuvo alguna repercusión en la síntesis de la faseolotoxina por lo que el resultado de ambas inserciones no afectaron este factor de virulencia y que genera la pregunta sobre el efecto que las cepas DNL001 y DNL002 generarían en la virulencia al tener contacto con la planta.





9 CONCLUSIONES.

El sistema ISC es un sistema altamente conservado demostrándose su función biológica en los múltiples organismos en los que se ha estudiado que participa como maquinaria de biogénesis de centros [Fe-S]. El análisis *in silico* realizado en el presente trabajo genera un amplio panorama de la función con la que pudiese contribuir este sistema en *P. syringae* pv. *phaseolicola*, se mostró que ISC es el único sistema completo de biogénesis de centros [Fe-S] que se encuentra en esta bacteria y que pudiese contribuir con la función antes mencionada. Las proteínas IscR e IscU mostraron contener uno el principal motivo (secuencia aminoacidica) que definen su función como regulador en el caso de IscR y como una proteína de andamio en el caso de IscU.

La transformación con dos construcciones genéticas de la cepa silvestre mediante recombinación homóloga no fue posible, solo se generaron cepas con inserciones de las dos construcciones constituyendo a las cepas DLN001 y DNL002. En el caso de la cepa DNL001 mostró distintos fenotipo con respecto a la cepa silvestre: un crecimiento en medio rico o mínimo fue menor a la silvestre, sensible a estrés oxidativo y a estrés por carencia en hierro, además que disminuyo su virulencia. Todas las observaciones experimentales de los fenotipos de la cepa DNL001 se atribuyeron al efecto ocasionado por alguna pérdida de la homeostasis de la biogénesis de los centros [Fe-S] ocasionada posiblemente por la presencia del gen *iscS* de *D. dadantii*. La cepa DNL002 no generó fenotipo distinto respecto a la cepa silvestre. Al analizar el factor de virulencia más importante para *P. syringae* pv. *phaseolicola*, que es la producción de la faseolotoxina, se encontró que las cepas DNL001 y DNL002 produjeron un fenotipo igual a la cepa silvestre. Por lo que se especula que el sistema ISC de alguna manera está involucrado en la producción del tizón del halo en frijol y que es probable ISC sea un operón esencial para la célula, razones por la cuales se tuvieron problemas en su recombinación homóloga para mutagenizar algunos de sus genes.





10 PERSPECTIVAS.

Un factor que pudo influir en el resultado para la obtención del mutante condicional de *P. syringae* pv. *phaseolicola* fue que las secuencias de la construcción **pG-Cond-***iscS* con las que se pretendía lograr la recombinación homóloga provino de *D. dadantii*, a pesar de que las secuencias genéticas poseen una alta similitud con las de *P. syringae* pv. *phaseolicola* no fue posible recombinarse por la heterogeneidad presente. Es decir, esta metodología puede emplearse para generar una estrategia que permita en principio poder obtener un mutante condicional del sistema mediante una construcción utilizando la secuencia genética de *P. syringae* pv. *phaseolicola* y el promotor inductible pBAD.

Para poder determinar más puntualmente la zona de inserción de la contrición *aadA7*(Spc^R)-araC-pBAD y descartar que el fenotipo sea dado al lugar de inserción en la cepa DNL001, podría recurrirse a la búsqueda de las zonas río arriba y río abajo de esta construcción mediante la técnica de TAIL-PCR para la que se necesita emplear oligonucleótidos que amplifican río arriba y río abajo de los extremos de la cassette y así poder concluir de forma más precisa los efectos fenotípicos de la cepa DNL001.





2. ANEXOS

A. Apéndice de medios de cultivo.

Medio KB	
Componentes	Proporción en volumen final de 1 L
Peptona de carne	20 g
K ₂ HPO ₄	1.5 g
MgSO ₄ H ₂ O	1.5 g
Glicerol (100%)	12 mL
Agar	15 g
рН	7.2

Medio LB		
Componentes	Proporción en volumen final de 1 L (g)	
Extracto de levadura	5	
NaCl	10	
Triptona	10	
Agar	15	

Medio SOC	
Componentes	Proporción en volumen final de 1 L (g)
Extracto de levadura	5
Triptona	20
KCl	0.186
MgCl ₂	0.952
NaCl	0.584
Glucosa (20%)	3.603

Medio M9		
Componentes	Proporción en volumen final de 1 L (mL)	
M9X5	200	
MgSO ₄ (1M)	2	
$CaCl_2$ (1M)	0.1	
M9X5 proporción en un volumen de 1 L (g)		
Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	64	
KH_2PO_4	15	
NaCl	2.5	
NH ₄ Cl	5	





11 BIBLIOGRAFÍA.

- Agar J.N., Frazzon J., Huynh B. H., Dean D. R., Johnson M. K. **2000**. IscU as a scaffold for iron-sufur cluster biosynthesis: sequential assembly and [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters in IscU. *Biochemistry* 39: 7856-7862.
- Aguilera S., Lopez K., Nieto Y., Piña R., Guzman H.G., Hernández F.J., Álvarez M. A. 2007. Functional characterization of the gene cluster from Pseudomonas syringae pv. Phaseolicola NPS3121 involved in synthesis of phaseolotoxin. *Journal of Bacteriology* 189: 2834-2843.
- Agrios G. 2005. Plant Pathology. *New York Elsevier Academic press*. 85-107a, 490-508b.
- Aldon D., Brito B., Boucher C., Genin S. **2000**. A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. *EMBO Journal* 19: 2304-2314.
- Alfano J. R. and Collmer A. **1996**. Bacterial pathogens in plants life up against the wall. *Plant Cell* 8: 1683-1698.
- Angelini S., Gerez C., Choudens S. O., Sanakis Y., Fontecave M., Brras F., Py P.
 2008. NfuA, a new factor required for maturing Fe/S proteins in Escherichia coli under oxidative strees and iron starvation conditions. *Journal of Biological Chemistry* 283: 14084-14091.
- Asahara H. Wistor P.M. Bank J.F. Bakerian R.H. and Cunningham R.P. **1989**. Purification and Characterization of *Escherichia coli* endonuclease III from the cloned *nth* gene. *Journal of Bacteriology* 28: 4444-4449.
- Ayala Castro K., Saini A., Outten W. 2008. Fe-S assembly pathways in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 72:1:110-125.
- Bachmann A.S., Matile P.H. and Slusarenko A.J. **1998**. Inhibition of ornithine decarboxylase activity by phaseolotoxin: Implications for symptom production in halo blight of french bean. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 53:287-299.
- Balk J., Lobreaux S. **2005**. Biogenesis of iron-sulfur proteins in plants. *Trends in Plants Science* 10: 324–331.
- Bandyopadhyay S., Chandramouli K. and Johnson M.K. **2008**. Iron-sulfur cluster biosynthesis. *Biochemical Society Transactions* 36: 1112-1119.
- Barras F., Loiseau L. and Py B. **2005**. How *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* build Fe/s proteins. *Advances in Mricrobial Physioology* 50: 48-101.
- Beinert H., Holm R.H., Munck E. **1997**. Iron-sulfur clusters: Nature's modular, multipurpose structures. *Science*. 277: 653-659.
- Beinert H. **2000**. Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises. *Journal* of *Biological Inorganic Chemistry* 5: 2-15.
- Bretz J.R., Hutcheson S.W. **2004**. Role of type III effector secretion during bacterial pathogenesis in another kingdom. Infection Immunity 72: 3697-3705.
- Bonomi F., Iametti S., Morleo A., Ta D. and Vickery L.E. **2008**. Studies on the mechanism of catalysis of Iron-Sulfur cluster transfer from IscU [2Fe2S] by HscA/HscB chaperones. *Biochemestry* 47: 12795-12801.





- Cabiscol E., Tamarit J., Ros J. **2000**. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology* 3: 3-8.
- Chahal H.K., Dai Y., Saini A., Ayala castro C., Outten F.W. **2009**. The SufBCD Fe-S scaffold complex interacts with SufA for Fe-S cluster transfer. *Biochemistry* 48: 10644-10653.
- Chandramouli K. Unciuleac M.C., Naik S., Dean D. R., Huynh D.H., Johnson M.K. 2007. Formation and properties of [4Fe-4S] clusters on the IscU scaffold protein. *Biochemistry* 46: 6804-6811.
- Choi K.H., Kumar A., Schweizer H. **2005**. A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: Application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *Journal of Microbiological Methods*.
- Crane B.R., Siegel L.M., Getzoff E.D. **1995**. Sulfite reducatase structure at 1.6A: evolution and catalysis for reduction of inorganic anions. *Science* 270: 59-67.
- Collmer A., Badel J.L., Charkowski A.O., Deng W.L., Fouts D.E., Ramos A.R., Rehm A.H., Anderson D.M., Schneewind O., van Dijk K., Alfano J.R. **2000**. *Pseudomonas syringae* Hrp type III secretion system and effector proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of AMerica* 97: 8770-8777.
- Cuellar-Torres E.A. **2010**. Implicación del sistema Csd en la biogénesis de centros [Fe-S] y en la patogenicidad de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Tesis Profesional. CUCEI-UdeG, Guadalajara Jalisco, México.
- De la Fuente-Martínez J.M., Mosqueda-Cano G., Alvarez-Morales A. and Herrera-Estrella L. **1992**. Expression of a bacterial phaseolotoxin-resistant ornithyl transcarbamylase in transgenic tobacco confers resistance to Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola*. *Biotechnology* 10: 905-909.
- De la Garza Amaya M., Vaca S.P. **2010**. La lucha por el hierro patógeno vs hospedero. Primera edición, pp. 114-117.
- Dixon R. 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature*. 14:411: 843-847.
- Djaman O., Outten W., Imlay J. **2004**. Repair of oxidized iron-sulfur cluster in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 43: 44590-44599.
- Dobbek H., Svetlitchnyi V., Gremer L., Huber R., Meyer O. **2001**. Crystal structure of a carbon monoxide dehydrogenase reveal a [Ni-4Fe-5S] cluster. *Science* 293: 1281-85.
- Dos Santos P.C., Dean D.R., Hu Y., Ribbe M.W. **2004**. Formation and insertion of the nitrogenase iron-molybdenum cofactor. *Chemical Reviews* 104: 1559-1173.
- Doukov T.L., Iverson T.M., Seavalli J., Ragsdale S.W., Drennan C.L. **2002**. A Ni-Fe-Cu center in a bifunctional carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase. *Science* 298: 5593: 567-572.
- Enard C., Franza T., Neema C., Gill P. R., Permark M. **1991**. The requirement of chrysobactin dependent iron transport for virulence incited by *Erwinia chrysanthemi* on *Saintpaulia ionantha*. *Plant soil* 130: 263-271.
- Ferguson A., Jonhnston J. **1980**. Phaseolotoxin: chlorosis, ornithine accumulation and inhibition of ornithine carbamoyltransferase in different plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 16: 269-276.





- Fleischhacker A.A., Stubna A., Hsueh K.L., Guo Y., Teter S.J., Rose J.C., Bunold T. C., Markley J., Münck E., Kiley P.J. **2012**. Characterization of the [2Fe-2S] cluster of *Escherichia coli* Transcription Factor IscR. *Biochemistry* 5: 4453-4462.
- Flint D.H. **1996**. *Escherichia coli* contains a protein that is homologous in function and N-terminal sequence to the protein encoded by the *nifS* gene of *Azotobacter vinelandii* and that can participate in the synthesis of the Fe-S cluster of dihydroxy-acid dehydratase. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 16068-16074.
- Fontecave M. **2006**. Iron-sulfur clusters: ever-expanding roles. *Nature Chemical Biology* 2: 171-174.
- Franza T., Sauvage C., Expert D. **1999**. Iron regulation and pathogenicity in *Erwinia chrysanthemi* strain 3937: role of the Fur repressor protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12: 119-128.
- Giel J.L., Rodlonov D., Llu M., Blattner F.R., Killey P.J. **2006**. IscR-dependent gene expression links iron-sulhur cluster assembly to the control of O₂-regulated genes in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 60:4: 1058-1075.
- Guzmán-Hernández G., Morales-Álvarez A. **2001**. Isolation and characterization of the gene coding for the amidinotransferase involved in the biosynthesis of phaseolotoxin in *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*. *American Phytopathological Society* 14: 545-554.
- Hall D.O.; Cammack, R.; Rao, K.K. **1971**. Role for ferredoxins in the origin of life and biological evolution. *Nature* 233: 136-138.
- Hernández J.A., Curatti L., Aznar C.P., Perova Z., Britt D.R., Rubio L.M. **2008**. Metal trafficking for nitrogen fixation: NifQ donates molybdenum to NifEN/NifH for the biosynthesis of the nitrogenase FeMo-cofactor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 11679-11684.
- Hernández M.A. De la Torre Z.S. Ibarra L.E. Hernández F.J.L., Jofre G.A., Martínez A.A., Álvarez M.A. **2009**. Transcriptional profile of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121 in response to tissue extracts from a susceptible *Phaseolus vulgaris* L. cultivar. *BMC Microbiology* 9: 257.
- Hirano S.S., Upper C.D. **2000**. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*: A pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64: 624-653.
- Hu Y., Corbett C., Fay A., Webber J., Hodgson K., Hedman B. y Ribbe M.W. **2006**. FeMo cofactor maturation on NifEN. *Proceedings of National Academy of Sciences* 103: 17119-17124.
- Hu Y., Fay A.W., Lee C.C., Yoshizawa J. y Ribbe M.W. 2008. Assembly of Nitrogenase MoFe protein. *Biochemistry* 47: 3973-3981.
- Hueck C.J. **1998**. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology and Molecular Biology* 62: 379-433.
- Humphries K.M., Szweda L.I. **1998**. Selective inactivation of α-ketoglutarate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase: reaction of lipoic acid with 4-hidroxy-2nonenal. *Biochemistry* 37: 15835-15841.
- Hunsicker-Wang L. M, Heine A. Chen Y., Luna P.E., Todaro T., Zhang M.Y., Williams A.P., McRee D.E., Hirst J., Stout D., Fee J.A. **2003**. High resolution structure of the soluble, respiratory-type rieske protein from *Thermus thermophiles*: analysis and comparison. *Biochemistry* 42: 7303-7317.



.



- Jackson R.W., Athanassopoulos, E., Tsiamis G., Mansfield J.W., Sesma A., Arnold D.L., Gibbon M.J., Murillo J., Taylor J.D., Vivian A. **1999**. Identification of a pathogenicity island, which contains genes for virulence and avirulence, on a large native plasmid in the bean pathogen Pseudomonas syringae pathovar *phaseolicola*. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA* 96: 10875-10880.
- Jacobson M.R., Cash V.L., Weiss M.C., Laird N.F., Newton W.E., Dean D.R. **1989**. Biochemical and genetic analysis of the nifUSVWZM cluster from *Azotobacter vinelandii*. *Molecular Genetics and Genomics* 1: 49-57.
- Jacques S., Sung Z.R. **1981**. Regulation of pyrimidin and arginine biosynthesis investigated by the use of phaseolotoxin and 5-fluorouracil. *Plant Physiology* 67: 287-291.
- Jang S., Imlay J. A. **2010**. Hydrogen peroxide inactives the Escherichia coli Isc ironsulfur assembly system, and OxyR induces the Suf system to compensate. *Molecular Microbiology* 76: 1448-1467.
- Jin Q., Thilmony R., Zwiesler-Vollick J., Sheng-Yang H. **2003**. Type III protein secretion in Pseudomonas syringae. *Microbes and Infection* 5: 301-310.
- Johnson D.C., Unciuleac, M.C. and Dean D.R. **2005**. Controlled expression and functional analysis of ironsulfur cluster biosynthetic components within *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology* 188: 7551-7561.
- Johnson M.K. **1994**. In *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*, ed. RB King, pp. 1896-915. Chichester, UK: Wiley
- Joardar V., LindebergM., Jackson R.W., Selengut J., Dodson R., Brinkac L.M., Daugherty S.C., DeBoy R., Durkin A.S., Giglio M.G., Madupu R., Nelson W.C., Rosovitz M.J., Sullivan S., Crabtree J., Creasy T., Davidsen T., Haft D.H., Zafar N., Zhou L., Halpin R., Holley T., Khouri H., Feldblyum T., White O, Fraser C.M., Chatterjee A.K., Cartinhour S., Schneider D.J, Mansfield J., Collmer A., and Buell C.R. 2005. Whole-Genome Sequence Analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448A Reveals divergence among Pathovars in Genes Involved in Virulence and Transposition. *Journal of Bacteriology* 187: 6488-6498.
- Justino M.C., Vicente J.B., Teixeira M., Saraiva L.M. **2005**. New Genes Implicated in the Protection of anaerobically grown *Escherichia coli* against nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry*. 280: 2636-43.
- Kato S., Mihara H., Kurihara T., Takahashi Y., Tokumoto U., Yoshimura T., Esaki N. **2002**. Cys-328 of IscS and Cys-63 of IscU are the sites of disulfide bridge formation in a covalently bound IscS/IscU complex: implications for the mechanism of iron-sulfur cluster assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 5948-5952.
- Kim J. H., Tonelli M., Frederick R. O., Chow D. C., Markley L. 2012. Specialized Hsp70 chaperone (HscA) binds preferentially to the disordered form whereas J-protein (HscB) binds preferentially to the structured form of the Iron-Sulfur cluster scaffold protein (IscU). The Journal of Biological Chemistry 287: 31406-31413.
- King E.D., Ward K.M., Raney D.E. **1954**. Two simple media for the demostrations of pyocyanin and fluorescin. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44: 301-307.
- Kunkel B.N., Chen Z. **2006**. Virulence strategies of plant pathogenic bacteria. *Prokaryotes* 2: 421-440.





- Kuo C.F., McRee D.E., Fisher C.L., O'Handley S.F., Cunningham R.P., Tainer J.A. **1992**. Atomic structure of the DNA repair [4Fe-4S] enzyme endonuclease III. *Science* 258: 434-440.
- Lill R., Muhlenhoff U. **2005**. Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes. *Trends in Biochemical Science* 30: 133-41.
- Loiseau L., Gerez C., Bekker M., Choudens S.O., Py B., Sanakis Y., Mattos T.J., Fontecave M., Barras F. **2007**. ErpA, an iron-sulfur (Fe-S) protein of the A-type essential for respiratory metabolism in *Escherichia coli*. PNAS 104: 13626-13631.
- Mansfield J., Genin S., Magori S., Citovsky V., Sririyanum M., Ronald P., Dow M., Verdier V., Beer S., Machado M., Toth I., Salmond G. Foster G. **2012**. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology. 13: 614-629.
- Mansy S.S, Cowan J.A. **2004**. Iron-sulfur cluster biosynthesis: toward an understanding of cellular machinery and molecular mechanism. *Accounts of Chemical Research* 37: 719-725.
- Mahé B., Masclaux C., Rauscher L., Enard C., Expert D. **1995**. Differential expression of two siderophore-dependent-iron acquisition pathways in *Erwinia chrysanthemi* 3937: characterization of a novel ferrisiderophore permase of the ABC transporter family. *Molecular Microbiology* 18: 33-43.
- Mihara H., Kurihara T., Yoshimura T., Soda T., Esaki N. **1997**. Cysteine ulfinate desulfinase, a NIFS-like protein of Escherichia coli with selenocysteine lyase and cysteine desulfurase activities. Gene cloning, purificacition and characterization of a novel pyridoxal enzyme. *The Journal of Biological Chemestry* 5: 22417-22424.
- Mihara H., Maeda M., Fujii T., Kurihara T., Hata Y., Esaki N. **1999**. A nifS-like gene, csdB encodes an Escherichia coli counterpart of mammalian selenocysteine lyase. Gene cloning, purification, characterization and preliminary x-ray crystallographic studies. The Journal of Biological Chemestry 21: 14768-14772.
- Mitchell R.E. **1978**. Halo blight of beans: toxin production by several Pseudomonas *phaseolicola* isolates. *Physiol Plant Pathol* 13: 37-49.
- Nachin L., Hassouni M., Loiseau L., Expert D., Barras F. **2001**. SoxR-dependent response to oxidative stress and virulence of *Erwinia chrysanthemi*: the key role of SufC, and orhan ABC ATPase. *Molecular Microbiology* 39: 960-972.
- Nachin L., Loiseau L., Expert D., Barras F. **2003**. SufC: an unorthodox cytoplasmic ABC/ATpase required ofr [Fe-S] biogenesis under oxidative stress. *The EMBO Journal* 22: 427-437.
- Nakamura M., Saeki K., Takahashi Y. **1999**. Hyperproduction of recombinant ferredoxins in *Escherichia coli* by coexpression of the ORF1-ORF2-*iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx*-ORF3 gene cluster. *The Journal of Biochemistry* 126: 10-18.
- Navarro-Franco F., Zavaleta Mejia E. **2001**. Estado Actual del Conocimiento Acerca del Modo de Acción de Toxinas no Selectivas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19: 237-244.
- Ospina F.H. Schwartz H. Rivero R. Otoya M. Correa F. y Katherman M. **1981**. Enfermedades bacterianas de frijol, identificación y control. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Pp. 34-37.





- Outten F.W., Djaman O., Storz G. **2004**. A *suf* operón requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*. *Molecuar Microbiology* 52: 861-72.
- Outten F.W., Wood M.J., Munoz F.M., Stortz G. **2003**. The SufE protein and SufBCD complex enhance SufS cysteine desulfurase activitie as part of a sulfur transfer phatway for Fe.S cluster assembly in Escherichia coli. The Journal of Biological Chemistry 14: 45713-45719.
- Patil S.S., Hayward A.C., Emmons R. **1974**. An ultraviolet induced non-toxigenic mutant of Pseudomonas *phaseolicola* of altered pathogenicity. *Phytopathology* 64: 590-595.
- Persmark M., Expert D., Neilands J.B. **1989**. Isolation, characterization and synthesis of chrysobactin, a compound wih a siderophore activity from Erwinia chrysanthemi. *Journal of Biological Chemistry* 264: 3187-3193.
- Porello S.L., Cannon M.J., David S.S. **1998**. Specific recognition of substrate analogs by the DNA mismatch repair enzyme Muty. *Biochemistry* 37: 6465-6475.
- Promega, **2012**. Technical Manual: pGEM®-T and pGEM®-T, Easy Vector Systems, instructions for use of products. Disponible en internet: http://worldwide.promega.com/~/media/files/resources/protocols/technical%20manual s/0/pgem-t%20and%20pgem-t%20easy%20vector%20systems%20 protocol.pdf?la=en
- Py B., Barras F. **2010**. Building Fe-S proteins: bacterial strategies. *Microbiology* 8: 436-446.
- Quiñones A. E., Rincón Enríquez G. Implication of the iron-sulfur (Fe/S) clusters in the plant bacteria pathogenicity. Rodriguez H. R., Aguilar C. N., Simpson-Williamson J. K., Sanchez G.G. Kerala, India. S. G. Pndalai. 2011.
- Rahme L.G., Mindrinos M.N., Panopoulos N.J. **1992**. Plant and environmental sensory signals control the expression of *hrp* genes in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Journal Bacteriology* 174: 3499-3507.
- Rubio L.M., Ludden P.W. **2005**. Maturation of nitrogenase: A biochemical puzzle. *Journal of Bacteriologyl* 187: 405-414.
- Rincón-Enríquez G., Crété P., Barras F., Py B. **2008**. Biogenesis of Fe/S proteins and pathogenicity: IscR plays a key role in allowing *Erwinia chrysanthemi* to adapt to hostile conditions. *Molecular Microbiology* 67: 1257-1273.
- Roux A., Beloin C., Ghigo J.M. **2005**. Combined inactivation and expression strategy to study gene function under physiological conditions: application to identification of new *Escherichia coli* adhesins. *Journal of Bacteriology* 187: 1001-1013.
- Runyen-Janecky L., Daugherty A., Lloyd B., Wellington C., Eskandrian H., Sagransky M. **2008**. Role and Regulation of Iron- Sulfur cluster biosynthesis genes in *Shigella flexneri* virulence. *Infection and Immunity* 76: 1083-1092.
- Sawada H., Takeuchi T. and Matsuada I. **1997**. Comparative analisys of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidae and* pv. *phaseolicola* based on phaseolotoxin-resistant ornithine carbamoyltransferase gene (argK) and 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Sequences. *Applied Environmental Microbiology* 63: 282-288.
- Saini A., Mapolelo D.T., Chahal H.K., Johnson M. K., Outten W.F. **2010**. SufD and Suf C ATPase activity are required for iron acquisition during in vivo Fe-S cluster formation on SufB. *Biochemistry* 49: 9402-9412.





- Sains P.J.M., Navarrete Maya R., Navarrete Maya J. y Acosta Gallegos J.A. **2008**. Dinámica de los tizones común y de halo del frijol en el Valle de México. *Agricultura Técnica en México* 34: 201-212.
- Schwartz C.J., Giel J.L., Patschkowski T., Luther C., Ruzicka F.J., Beinert H. and Kiley P.J. **2001**. IscR, an Fe-S cluster-containing transcription factor, represses expression of Escherichia coli genes encoding Fe-S cluster assembly proteins. Proceeding of the National Academy of Sciences 98: 14895-14900.
- Shi R., Proteau A., Villarroya M., Moukadiri I., Zhang L., François T., Matte A., Armengod E., Cygler M. 2010. Structural basis for Fe-S cluster assembly and tRNA thiolation mediated by IscS protein-protein interactions. PLoS Biology 8: e1000354.
- Staskawicz B., Panopoulos N. **1979**. A rapid and sensitive microbiological assay for phaseolotoxin. *Phytopathology* 69: 663-666.
- Swati R., Stemmler T.L. **2011**. Key Players and Their Role During Mitochondrial Iron-Sulfur Cluster Biosynthesis. *Chemistry European Journal* 17: 746-753.
- Takahashi Y., Nakamura M. **1999**. Functional assignment of the ORF2-iscS-iscUiscA-hscB-hscA-fdx-ORF3 gene cluster involved in the assembly of Fe-S clusters in Escherichia coli. *Biochemistry* 128: 917-926.
- Takahashi Y., Tokumoto U. **2002**. A third bacterial system for the assembly of ironsulfur clusters with homologs in archaea and plastids. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 28380-28383.
- Tokumoto U., Takahashi Y. **2001**. Genetic analysis of the *isc* operon in *Escherichia coli* involved in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *The Journal of Biochemistry* 130: 63-71.
- Tsiamis G., Mansfield J.W., Hockenhull R. Hockenhull R., Jackson R. W., Sesma A., Athanassopoulos E., Bennett M. A., Stevens C., Vivian A., Taylor J. D., Murillo J. **2000**. Cultivar specific avirulence and virulence functions assigned to avrPphF in Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola*, the cause of bean halo-blight disease. *EMBO Journal* 19: 3204-3214.
- Urbina H.D., Silberg J.J., Hoff K.G., Vickery L.E. **2001**. Transfer of sulfur from IscS to IscU during Fe/S cluster assembly. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 44521-44526.
- Vinella D., Brochier-Armanet C., Loiseau L., Talla E. and Barras F. **2009**. Iron-Sulfur (Fe/S) protein biogenesis: phylogenomico and genetic studies of A-type carriers. *Plos Genetics* 5: 1-12.
- Volbeda, A., Charon M.-H., Piras C., Hatchikian E.C., Frey M., Fontecilla-Camps J.C. **1995**. Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from Desulfovibrio gigas. *Nature* 373: 580-587.
- Yeo W.S., Lee J.H., Chang K., Roe J.H. **2006**. IscR acts as an activator in response to oxidative stress for the suf operon encoding Fe-S assembly proteins. *Molecular microbiology* 61: 206-218.
- Zheng L., Cash V.L. Flint D. Dean D. **1998**. Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an iscSUA-hscBA-fdx gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *The journal of Biological Chemistry* 273: 1364-1372.
- Zheng L., Dennis R.D. **1994**. Catalytic formation of a nitrogenase iron-sulfur cluster. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 18723-1876.