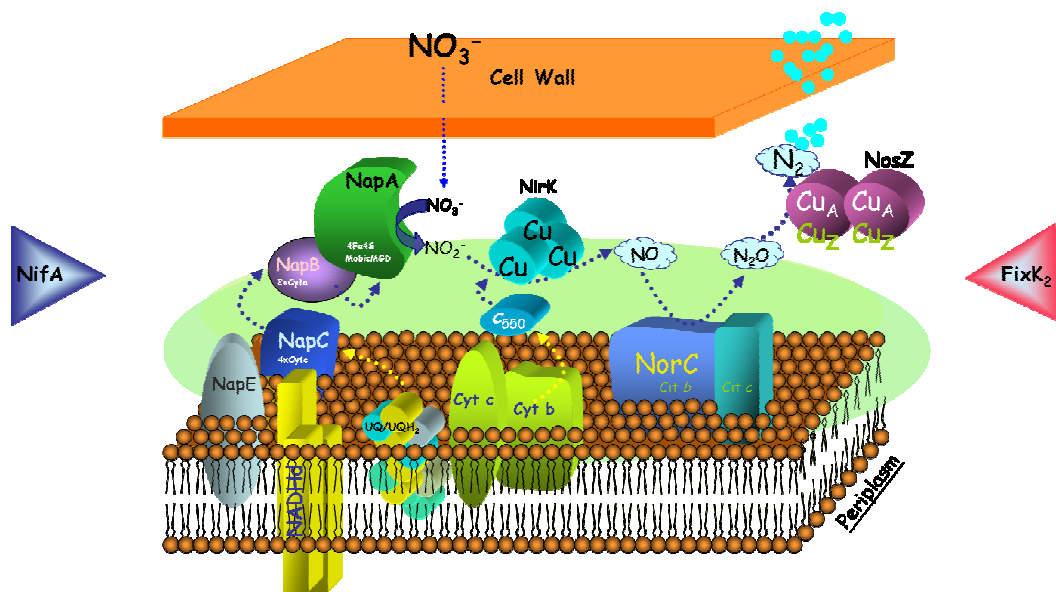




UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS

DESNITRIFICACIÓN EN *Bradyrhizobium japonicum*.
IMPLICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS
REGULADORAS FIXK₂ Y NIFA.



EMILIO BUENO ROMERO

TESIS DOCTORAL

GRANADA 2008

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS



DESNITRIFICACIÓN EN *Bradyrhizobium japonicum*.

IMPLICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS FIXK₂ Y NIFA

Emilio Bueno Romero

TESIS DOCTORAL

GRANADA 2008

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

DESNITRIFICACIÓN EN *Bradyrhizobium japonicum*.

IMPLICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS FIXK₂ Y NIFA

**Memoria que presenta el Licenciado en Biología Emilio Bueno Romero
para aspirar al grado de Doctor.**

Fdo. Emilio Bueno Romero

Vº Bº La Directora

Vº Bº El Codirector

Fdo. María Jesús Delgado Igeño

Fdo. Eulogio Bedmar Gómez

Científico Titular del CSIC

Profesor de Investigación del CSIC

**Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el
Departamento de Microbiología del Suelo y
Sistemas Simbióticos de la Estación
Experimental del Zaidín (C.S.I.C.),
Granada, durante los años 2004-2007**

Agradecimientos

Durante la escritura de esta Tesis han sido muchos los recuerdos de anécdotas, agradables algunas y otras quizás algo menos, y por supuesto nombres de personas, algunas relacionadas directamente con el trabajo, y otras no tan directamente, pero que a su manera, han tenido que ver con la realización del mismo. Imposible citarlos a todos y en la medida que se merecen. Por este motivo me limitaré a citar brevemente a aquellas personas e instituciones que más directamente han influido en la realización de esta Tesis Doctoral de un modo más directo.

Por supuesto, en primer lugar, agradezco a los doctores María Jesús Delgado Eulogio J. Bedmar y por su excelente trabajo de dirección. Por haber mostrado una gran paciencia conmigo, y por su calidad humana y profesional.

Al Consejo Superior de Investigaciones Científicas y al Ministerio de Educación y Ciencia, por la concesión de sendas becas de Introducción a la Investigación y FPU, respectivamente, sin las cuales desde luego hubiera sido imposible la realización de este trabajo.

A la doctora Carmen Lluch, por su disponibilidad y gran eficacia en la resolución de los problemas administrativos.

A los doctores Socorro Mesa, Haucke Hennecke, Hans-Martin Fischer, y David Richardson ,por haberme acogido en sus laboratorios para realizar estancias breves.

Igualmente a los doctores Socorro Mesa y Hans-Martin Fischer, por su ayuda a nivel profesional, y sobre todo por su hospitalidad, que me hizo la estancia mucho más agradable.

Por último, doy las gracias de modo general a la gente de la Estación Experimental del Zaidín, que me han ofrecido su ayuda en diversos campos. Especial recuerdo a la gente del grupo de Investigación del que he formado parte. Han sido muchos los que han formado parte de él a lo largo de estos

años, y de todos he obtenido ayuda. Algunos quizás no hayan sido conscientes de lo importante que ha sido para mí.

ÍNDICE

Abstract of the Thesis.

In this thesis we have studied different aspects of the denitrification process in the *Bradyrhizobium japonicum* symbiont. The first chapter of the Thesis is an up-to-date revision of the respiratory systems in bacteria involved in the energy obtaining under aerobics, microaerobics and denitrifying conditions.

It is known that in the *B. japonicum* denitrification pathway are involved different reductases which reduce sequentially nitrogen oxides, obtaining energy in very low oxygen conditions where even the high affinity terminal oxidases are not able to use oxygen as final electron acceptor. In addition to those reductases have been demonstrated the presence of a small periplasmic cytochrome *c* in this system, this is the cytochrome *c*₅₅₀. In order to investigate the role of this protein in the denitrification process we have studied in the second chapter the involvement of cytochrome *c*₅₅₀ in electron transfer to the Cu-containing nitrite reductase of *B. japonicum*. We also show that cytochrome *c*₅₅₀ has an indirect effect on *nap* expression caused by a decrease in *cbb*₃-type cytochrome *c* oxidase expression.

In the third chapter we have demonstrated that in denitrifying condition the expression of the high affinity terminal oxidase *cbb*₃ is subjected to redox control. Under denitrifying conditions, where the *cbb*₃ oxidase is also fully expressed, inactivation of the *cycA* gene, encoding the cytochrome *c*₅₅₀, reduced O₂ consumption rates and expression of the heme-stained FixP and FixO components of the *cbb*₃ oxidase. In order to establish the role of cytochrome *c*₅₅₀ in electron transport to the *cbb*₃ oxidase, in this work, we have analyzed cytochrome *c* oxidase activity, and *cbb*₃ expression in the *cycA* mutant incubated under low oxygen conditions without nitrate, where only the *cbb*₃ pathway is induced, and with nitrate, where *cbb*₃ and denitrification pathways are induced. Only when cells were incubated under denitrifying conditions, levels of cytochrome *c* oxidase activity, as well as, expression of a *fixP*'-*lacZ* translational fusion, were highly reduced in the *cycA* mutant. Similarly, *cbb*₃ oxidase was expressed very weakly in a *napC* mutant lacking the membrane-bound *c*-type cytochrome which transfers electrons to the NapAB structural subunit of the periplasmic nitrate reductase. The presence of a highly reduced carbon substrate or myxothiazol, a specific inhibitor of the cytochrome *bc*₁ complex, inhibited β -galactosidase activity in the wild type cells

incubated anaerobically with nitrate. These results suggest that a change in the flow of electrons through the denitrification network may affect the cellular redox state, leading to alterations in *cbb₃* expression. We propose a redox-dependent regulation of the *cbb₃* cytochrome oxidase under denitrifying conditions.

In the fourth chapter, we show that the NifA regulatory protein is implicated in the activity of the Nap and NirK denitrifying proteins as revealed by the defect in the nitrate reduction and nitrite consumption. The expression and MV⁺-dependent activities of *napE*, and *nirK* genes respectively were measured in the A9 *nifA* and *fixK₂* mutants under denitrification conditions. In the presence of nitrate and anaerobic conditions, the maximal expression of *napE*, and *nirK* were not observed in the *nifA* mutant strain compared with the parental strain, a drastic inhibition was detected in cells of *fixK₂* mutant strain compared with the parental and *nifA* mutants strains. With this study we propose a dual oxygen control over the *napE*, and *nirK* denitrification genes, a first essential microaerobic activation mediated by the fixLJ-fixK₂ two-components regulatory-system and an accessory anaerobic activation mediated by the NifA protein, necessary for the maximal induction of these denitrification genes, but not for the basal denitrification genes expression. Therefore, we assigning a novel involvement of the nitrogen fixation NifA regulatory protein, as an enhancer of denitrification *napE*, and *nirK* genes.

In the fifth chapter, we demonstrate the *B. japonicum napE*, *nirK* and *norE* in vitro experiments by FixK₂. Our findings that the *napE* and *nirK* promoters are direct targets of the FixK₂-mediated activation but not the *norE* promoter. In addition we showed that the *napE* gene is transcribed from to different promoters, P1 and P2, in vitro and in vivo. P1 and P2 promoters are situated to 66.5 and 41.5 bp respectively from the symmetry axis of the FixK₂ binding site.

ÍNDICE
Capítulo 1. Introducción general y objetivos

1.1. La respiración bacteriana.....	7
1.1.1. Citocromo <i>c</i> oxidasa de tipo <i>cbb</i> ₃	9
1.1.2. Regulación de la citocromo <i>c</i> oxidasa <i>cbb</i> ₃	11
1.2. Cadenas respiratorias en rizobios.....	15
1.2.1. Cadenas respiratorias en <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	16
1.2.1.1. Caracterización bioquímica de la oxidasa <i>cbb</i> ₃	18
1.2.1.2. Regulación de la oxidasa <i>cbb</i> ₃	22
1.3. Cascadas regulatorias en respuesta a oxígeno en <i>B. japonicum</i>	
1.3.1. Sistema FixLJ-FixK2.....	22
1.3.2. Sistema RegSR-NifA.....	30
1.4. Desnitrificación.....	34
1.4.1. Nitrato reductasas.....	36
1.4.2. Nitrito reductasas.....	40
1.4.3. Óxido nítrico reductasas.....	42
1.4.4. Óxido nitroso reductasas.....	44
1.4.5. Otros componentes del transporte de electrones asociados a la desnitrificación.....	45
1.5. Desnitrificación en el orden <i>Rhizobiales</i>.....	47
1.6. Desnitrificación en <i>Bradyrhizobium japonicum</i>.....	49
1.6.1. Nitrato reductasa periplásmica.....	50
1.6.2. Nitrito reductasa.....	51
1.6.3. Óxido nítrico reductasa.....	51
1.6.4. Óxido nitroso reductasa.....	52
1.6.5. Regulación de la desnitrificación en <i>B. japonicum</i>	53
1.6.5.1. Regulación por microaerobiosis.....	54
1.6.5.2. Regulación por óxidos de nitrógeno.....	54
1.7. Objetivos.....	55
1.8. Referencias.....	58

Capítulo 2. *Bradyrhizobium japonicum* cytochrome c_{550} is the in vivo electron donor to Cu-containing respiratory nitrite reductase

2.1. Abstract.....	74
2.2. Introduction.....	75
2.3. Matherials and Methods.....	76
2.4. Results and discussion.....	78
2.5. References.....	89

Capítulo 3. Expression of *B. japonicum* cbb_3 terminal oxidase under denitrifying conditions is subjected to redox control.

3.1. Abstract.....	92
3.2. Introduction.....	93
3.3. Matherials and Methods.....	96
3.4. Results and discusión	98
3.5. References.....	111

Capítulo 4. The NifA regulatory protein is involved in the regulation of denitrification genes in *Bradyrhizobium japonicum*

4.1. Abstract.....	120
4.2. Introduction.....	121
4.3. Matherials and Methods.....	124
4.4. Results and discussion.....	127
4.5. References.....	139

Capítulo 5. Transcription activation *in vitro* of denitrification genes by the *Bradyrhizobium japonicum* regulatory protein FixK₂.

5.1. Abstract.....	148
5.2. Introduction.....	149
5.3. Matherials and Methods.....	152
5.4. Results and discussion	154
5.6. References.....	163
Discusión general.....	167
Conclusiones.....	181

CAPÍTULO 1.

INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS.

1.1. LA RESPIRACIÓN BACTERIANA.

La función primordial de la respiración es la obtención de la energía a través de la fosforilación oxidativa, proceso que consiste en la transferencia de electrones (e^-) desde sustratos carbonados reducidos hasta aceptores terminales de e^- . Debido a la diferencia de potencial redox entre el donador y aceptor, la energía libre liberada durante este proceso de transferencia electrónica es usado para crear un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana o fuerza protón motriz (Δp) que puede ser utilizada por la célula para multitud de procesos celulares, el más significativo es la síntesis de ATP a través de la F_1F_0 ATP-sintasasa asociada a la membrana, aunque también destacan el movimiento flagelar o la adquisición de solutos.

Además de mantener un balance H^+/E^- óptimo, la respiración posee otras funciones no menos importantes, como son la eliminación del exceso de equivalentes de reducción o la disminución de la concentración libre de O_2 con objeto de proteger a enzimas sensibles al mismo sin producir radicales libres perjudiciales.

A diferencia del sistema respiratorio mitocondrial eucariótico, que consta de una única oxidasa terminal, todas las especies bacterianas aeróbicas se caracterizan por presentar cadenas respiratorias ramificadas con múltiples oxidasas terminales que presentan distinta afinidad por el aceptor terminal de e^- el O_2 . Esta particularidad permite a las bacterias adaptarse a medios con tensiones de oxígenos muy variables (Fig. 1.1).

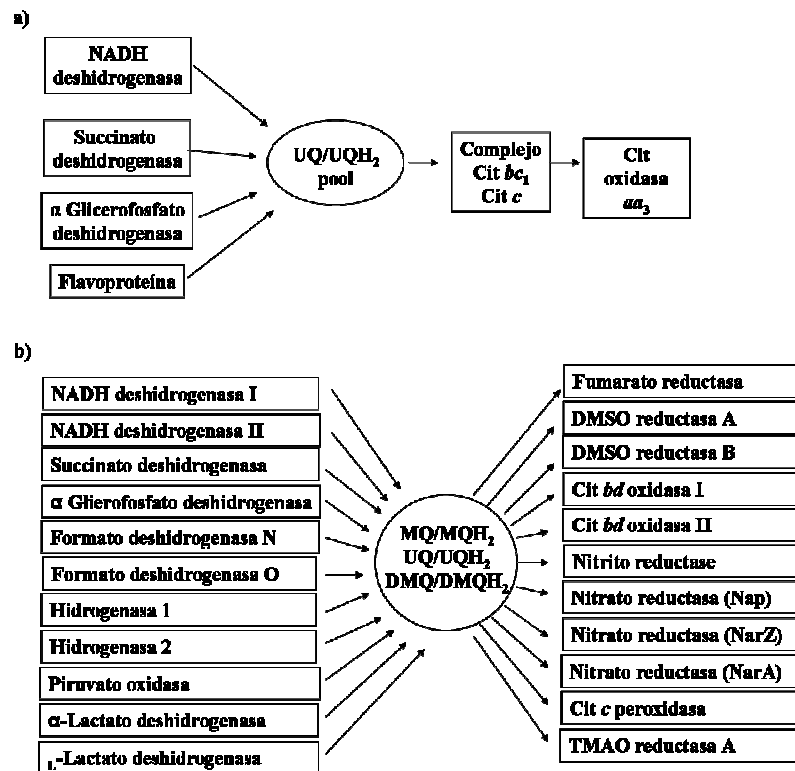


Figura 1.1. Flexibilidad respiratoria en mitocondrias de mamíferos. ubiquinone; (a) y en *E. coli* (b). MQ, menaquinona; UQ, ubiquinona; DMQ, demethylmenaquinona. UQH₂, ubiquinol; Cyt, cytochrome. (Adaptado de Richardson D.J. 2000).

Las cadenas respiratorias bacterianas comienzan con la reducción de sustratos carbonados (succinato, lactato, malato, butirato, glucosa) o cofactores reducidos (NADH) mediante la acción de deshidrogenasas específicas. Los e^- liberados son transferidos hasta las quinonas localizadas en la membrana citoplasmática, reduciéndolas hasta quinoles. A partir de este punto, los e^- pueden ser conducidos a dos tipos de oxidasa terminales: citocromo *c* oxidasa o quinol oxidasas, que son los lugares de reducción de O_2 hasta agua (H_2O), o bien a reductasas alternativas que emplean sustratos distintos al O_2 como aceptores terminales de e^- , como son el nitrato, nitrito, óxido nítrico, óxido nitroso, DMSO, sulfato, sulfito, fumarato, etc. (fig 1.2). Las citocromos *c* oxidasas son más eficaces desde el punto de vista energético, pues generan una mayor proporción de H^+/e^- que las quinol oxidasas. Las cadenas respiratorias bacterianas se componen de elementos transportadores de e^- de distinta naturaleza, entre ellos flavoproteínas, proteínas de hierro y azufre, quinonas y citocromos.

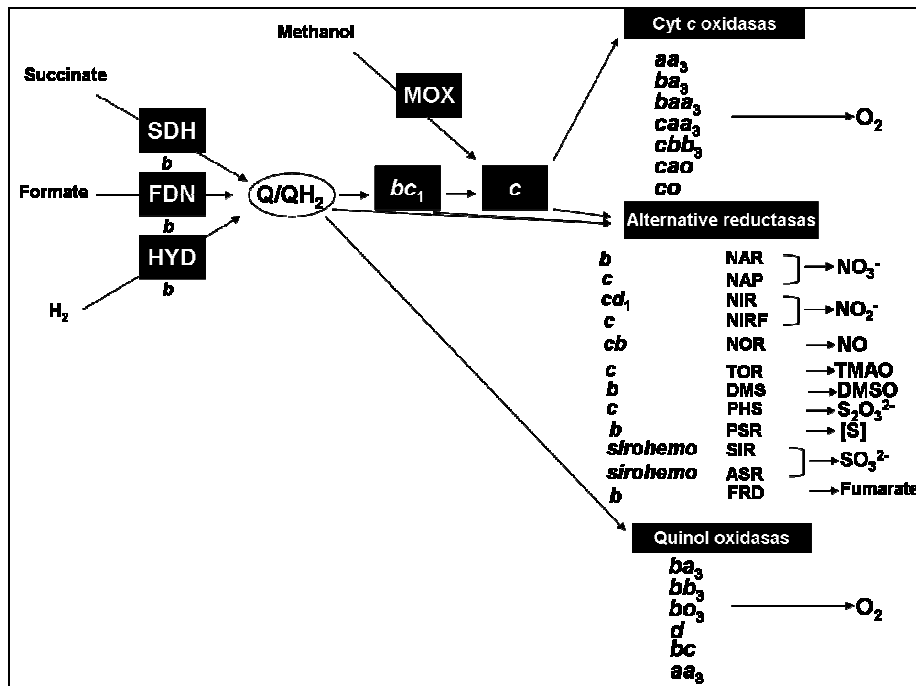


Figura 1.2. Cadenas respiratorias de bacterias. A la izquierda se representan los sustratos que pueden ser oxidados para la obtención de energía. A la derecha los aceptores de electrones usados por las distintas reductasas (Adaptado de Meyer *et al.*, 1997).

1.1.1. Citocromo c oxidasa de tipo *cbb*₃.

Los miembros de la superfamilia de oxidasas de hemo y cobre (HCOs) terminan las cadenas respiratorias de los organismos eucariotas y procariotas (García-Horsman *et al.*, 1994; Gray *et al.*, 1994). Estas enzimas catalizan la reducción del oxígeno molecular a H₂O, acoplado el potencial redox a la translocación de protones a través de la membrana (Malatesta *et al.*, 1995; Schultz and Chan, 2001). La superfamilia HCOs es bastante diversa en cuanto a los donadores de electrones que utilizan, composición de subunidades y tipos de grupos hemo que contienen. Investigaciones en las que se ha estudiado las relaciones evolutivas entre estas oxidasas han permitido clasificarlas en tres distintas familias (Pereira *et al.*, 2001). Las oxidasas de tipo A (oxidasa de tipo *aa*₃), las cuales son estructural y funcionalmente cercanas a las oxidasas mitocondriales. Oxidasas de tipo B, agrupadas como citocromos oxidasas *ba*₃. Y finalmente, oxidasas de tipo C, donde se incluyen las citocromo c oxidasas *cbb*₃ tipificadas por la proteína FixN de *Bradyrhizobium japonicum* (Preisig *et al.*, 1993). Se ha propuesto que las

oxidasas de tipo *cbb₃* son las más antiguas filogenéticamente. Debido a que su secuencia presenta similitudes con las óxido nítrico reductasas se ha propuesto que estas oxidasas respiratorias provienen de enzimas implicadas en el proceso de desnitrificación (Vanderoost *et al.*, 1994). En contraste con esta teoría, se ha sugerido estas enzimas no son más antiguas sino que han evolucionado independientemente en proteobacterias influidas por las condiciones ambientales (Pereira *et al.*, 2001).

La expresión de los distintos tipos de oxidasas anteriormente nombradas permiten a las bacterias adaptarse a diferentes concentraciones de oxígeno en el medio (Anraku 1988; Delgado *et al.*, 1998). La oxidasa *cbb₃* ha sido identificada como una oxidasa de hemo y cobre que cataliza la reducción de oxígeno a agua y presenta una afinidad por oxígeno muy elevada (Pitcher *et al.*, 2002). Consecuencia de ello es capaz de mantener la respiración bajo condiciones de oxígeno muy limitantes (microóxicas) como ocurre en los nódulos simbióticos de los rizobios en leguminosas, donde la concentración de oxígeno estimada no es mayor de 30 nM (Layzell *et al.*, 1990). Por ello no es sorprendente que el oxígeno sea el principal inductor del operón *ccoNOQP* que codifica la oxidasa *cbb₃*.

La oxidasa *cbb₃* está formada de tres a cuatro subunidades, la subunidad I está codificada por el gen *ccoN* y es un citocromo *b* transmembrana con un centro binuclear hemo-CuB de alto spin y un hemo de bajo spin. Las subunidades II y III son codificadas por *ccoO* y *ccoP*, respectivamente, y son citocromos *c* anclados a la membrana que transfieren electrones desde el citocromo *c* a la subunidad I. Como es sabido en *Rhodobacter sphaeroides* y *Bradyrhizobium japonicum* la expresión de los genes *ccoN*, *ccoO* and *ccoP* es esencial para la actividad y ensamblaje de la oxidasa *cbb₃*. En contraste, la subunidad CcoQ, la cual constituye la subunidad IV, no es requerida para el ensamblaje ni para la actividad de la oxidasa en condiciones limitantes de oxígeno (Oh y Kaplan 1999; Zufferey *et al.*, 1996). *CcoNOQP* ha sido extensivamente estudiada en *Rhodobacter sphaeroides*, donde se ha demostrado que no solo está implicado en el mantenimiento de la respiración microaeróbica (Garcia-Horsman *et al.*, 1994) sino que también puede actuar como sensor redox del complejo de ubiquinonas y activar el sistema de dos componentes RegBA el cual regula procesos biológicos tanto generadores como dependientes de energía (Oh and Kaplan 2002, Kim *et al.*, 2007). Específicamente, fotosíntesis, fijación de Carbono, fijación de nitrógeno, oxidación de

hidrógeno, desnitrificación, respiración aeróbica y anaeróbica, transporte de electrones y aerotaxis son procesos controlados por el regulón RegBA (Elsen *et al.*, 2004). Además en concentraciones elevadas de oxígeno la inactivación de la subunidad *ccoQ* lleva a cabo un control postranscripcional sobre *cbb₃* disminuyendo la abundancia y actividad de la oxidasa.

La oxidasa *cbb₃* está ampliamente distribuida en proteobacterias pero su presencia no está restringida a ese grupo. Los genes que codifican el complejo *cbb₃* fueron aislados inicialmente de especies de rizobios y denominados *fixNOQP* por su requerimiento en la fijación simbiótica de nitrógeno (Batut *et al.*, 1989; Mandon *et al.*, 1994; Preisig *et al.*, 1993). Desde entonces, han sido identificados genes ortólogos en otras bacterias gram negativas y han sido llamados *ccoNOQP* en organismos no fijadores de nitrógeno (Myllykallio and Liebl 2000). Mediante el uso del software blastP, Batut y Cosseau (2004) llevaron a cabo la búsqueda de proteínas ortólogas a FixN de *Sinorhizobium meliloti* encontrando la presencia de los genes *ccoO*, *ccoQ* y *ccoP* corriente abajo del gen candidato *ccoN* (*fixN*), lo que corrobora la conocida agrupación de los genes *ccoNOQP* como un operón. Sin embargo, el gen *ccoQ* no siempre estuvo presente en dicho operón. Se detectó la presencia de 47 secuencias *ccoNOQP* en 39 genomas distintos pertenecientes todos a la subrama de proteobacterias, tanto diazotrofos como no. Fuera de la rama de proteobacterias, se ha demostrado la presencia del operón *ccoNOQP* en *Cytophaga hutchinsonii*, una bacteria aeróbica gram negativa del grupo de los CFB (Cytophaga, Flexibacter, Bacteroides). Otra bacteria perteneciente a este grupo en la que se ha detectado la oxidasa del tipo *cbb₃* fue en *Rhodothermus marinus* (Pereira *et al.*, 2000). La ausencia de los genes *ccoNOQP* en las bacterias gram positiva Firmicutes sugieren que la presencia de la oxidasa *cbb₃* en este linaje de bacterias es muy rara o ausente.

1.1.2. Regulación de la citocromo *c* oxidasa *cbb₃*.

La regulación de la expresión del operón *ccoNOQP* que codifica la citocromo *c* oxidasa *cbb₃* ha sido investigada en muchas bacterias. De forma repetitiva se ha encontrado que el oxígeno constituye un elemento clave en la regulación de dichos genes. La proteína reguladora Fnr capaz de sensor oxígeno regula la expresión del operón *ccoNOQP* en *Rhodobacter sphaeroides*, *Paracoccus denitrificans*,

Pseudomonas aeruginosa PAO1, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* UMP791, *Rhodobacter capsulatus* MT1131 (Colombo *et al.*, 2000; Mouncey and Kaplan 1998; Otten *et al.*, 2001; Ray and Williams 1997; Swem and Bauer 2002). Este regulador transcripcional fue primeramente identificado en *Escherichia coli*, en la cual controla la inducción de genes en respuesta a bajas concentraciones de oxígeno. La proteína Fnr incluye un cluster [4Fe-4S] capaz de sensor oxígeno en su extremo amino terminal. En bajas concentraciones de oxígeno, la forma dimérica de la proteína activa la transcripción de genes mediante su unión a una secuencia específica de DNA, la caja Fnr. En algunas especies de rhizobios, el operón *fixNOQP* no está regulado por la proteína Fnr, sino por un parálogo denominado FixK, que también reconoce las cajas Fnr (Batut *et al.*, 1989; Fischer 1996), sin embargo no presenta ningún cluster [4Fe-4S] por lo que no puede sensor oxígeno directamente, no siendo su actividad regulada por dicho elemento (Soupene *et al.*, 1995). En tal caso, es el sistema regulador de dos componentes FixLJ, el encargado de sensor el oxígeno y en condiciones microaeróbicas activar la transcripción del gen *fixK*. gen que regulado por el sistema regulador de dos componentes (ver capítulo 1.3.1).

Hasta ahora han sido descritas cuatro estrategias mediante las cuales los genes que codifican la oxidasa terminal *cbb₃* son regulados en respuesta a oxígeno (Cosseau y Batut, 2004) (Fig. 1.3). En la primera estrategia descrita, Fnr es la sensora y reguladora directa de los genes que codifican la oxidasa terminal *cbb₃*. Esta estrategia de regulación se encuentra en bacterias que no presentan en su genoma los genes *fixLJ-fixK*, habiendo sido demostrada en *Rhodobacter sphaeroides*, *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (UPM791), y *Rhodobacter capsulatus*. Esta estrategia podría ampliarse a 22 bacterias adicionales, siendo dicho mecanismo probablemente el más extendido.

En la segunda estrategia, es el sistema FixLJ/FixK el implicado en la regulación por oxígeno de la expresión del operón *ccoNOQP*. Este tipo de regulación ha sido demostrado en las especies de rhizobios *Sinorhizobium meliloti*, *Bradyrhizobium japonicum* and *Azorhizobium caulinodans* (Fischer *et al.*, 1996), las cuales carecen del gen que codifica para la proteína Fnr. Se piensa que esta estrategia también interviene en α -Proteobacterias que no son rhizobios como *Caulobacter crescentus*. Una tercera estrategia de regulación se encuentra en bacterias que presentan las proteínas Fnr y

FixLJ/FixK como son las bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno *Rhizobium leguminosarum* (VF39) y *Rhizobium etli* CFN42 (Lopez *et al.*, 2001; Schluter *et al.*, 1997), aunque también hay evidencias de que dicho sistema se encuentra en *Mesorhizobium loti* y en especies no fijadoras de nitrógeno como *Rhodopseudomonas palustris* y *Novosphingobium aromativorans*. Una cuarta estrategia se encuentra en bacterias patógenas de humanos como *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni* (ϵ -Proteobacteria), las cuales carecen de los genes *fnr* y *fixLJ-fixK*. Ha sido propuesto que la expresión de la oxidasa *cbb₃* en dichos organismo puede ser constitutiva respecto a la disponibilidad de oxígeno en esa bacteria, las cuales crecen en un ambiente microaeróbico en sus hospedadores (Smith *et al.*, 2000).

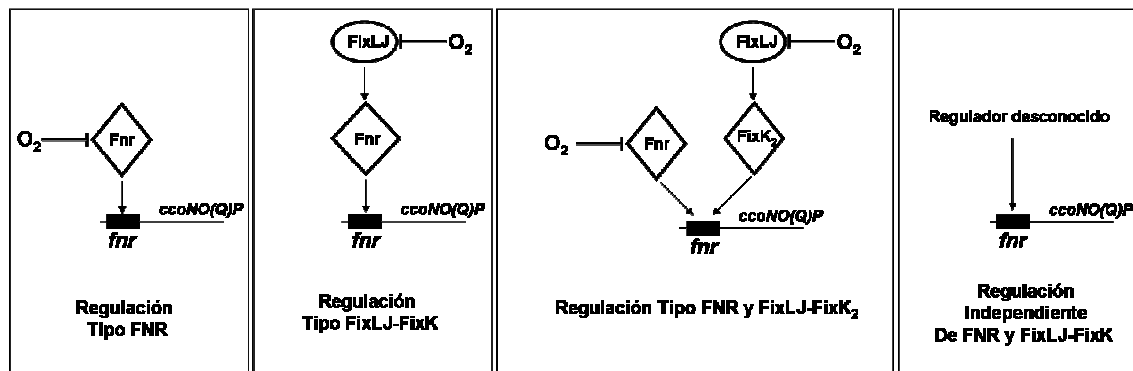


Figura 1.3. Estrategias de regulación por oxígeno de la expresión del operón *ccoNOQP*. Han sido identificadas cuatro estrategias de regulación que implican a las proteínas reguladoras Fnr, y FixLJ-FixK, y a un regulador desconocido. (Adaptado de Cosseau y Batut, 2004).

En algunas bacterias, se ha demostrado que la concentración de oxígeno en el medio no es la única señal implicada en la regulación de la oxidasa terminal *cbb₃*, sino que otras señales intracelulares pueden influir en la expresión de dicha oxidasa. Se han descrito proteínas reguladoras capaces de responder ante estos cambios intracelulares, por ejemplo las proteínas CcoQ de *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.2 implicada en la expresión de genes de la fotosíntesis (Eraso *et al.*, 2000), las proteínas Aer y Tsr de *E. coli* implicadas en aerotaxis (Rebbapragada *et al.*, 1997), ArcB del sistema de dos componentes ArcB/ArcA que controla la respiración aeróbica en *E. coli* (Luchi *et al.*, 1993). Aer y ArcB contienen dominios PAS que son sensores citoplasmáticos capaces

de sensar cambios intracelulares de oxígeno, potencial redox, luz, pequeños ligandos y el nivel energético celular en general.

Otras proteínas de respuesta a potencial redox son las pertenecientes a la familia de los sistemas reguladores de dos componentes. Esas proteínas se denominan RegSR en *Bradyrhizobium japonicum* y *Rhodopseudomonas palustris*, RegBA en *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodovulum sulfidophilum* y *Roseobacter denitrificans*, PrrBA en *Rhodobacter sphaeroides*, ActSR en *Sinorhizobium meliloti* y *A. tumefaciens* y RoxSR en *Pseudomonas aeruginosa* (Emmerich et al., 2000a, Baek et al., 2008, Comolli et al., 2002; Rey et al., 2006). Estos reguladores, activan la expresión de diferentes regulones implicados en procesos que utilizan equivalentes de reducción como son fijación de nitrógeno, y fijación de CO₂, y reprimen la expresión de genes implicados en procesos que generan equivalentes de reducción como es el caso de la oxidación de hidrógeno (Elsen et al., 2004). Se ha descubierto recientemente, que la proteína RegB de *R. capsulatus* (Swem et al., 2005; Swem et al., 2006) y ArcB de *E. coli* (Malpica et al., 2006) son capaces de sensar el estado de oxido-reducción del pool de ubiquinonas el cual afecta la actividad kinasa de la proteína.

En *Paracoccus denitrificans* se ha demostrado, que señales intracelulares consecuencia de cambios en la redistribución de electrones en las cadenas respiratorias afectan la expresión de la oxidasa *cbb*₃ (Otten et al., 1999; Otten et al., 2001). En *Rhodobacter capsulatus* se ha demostrado que el sistema de regulación de dos componentes RegBA y el activador fotosintético HvrA regulan la expresión del operon *ccoNOQP* en respuesta a variaciones de potencial redox en el complejo de ubiquinonas (Swem and Bauer, 2002). En *Rhodobacter sphaeroides* la presencia de cinco sitios de inicio de la transcripción upstream de *ccoN* sugieren la implicación de múltiples mecanismos de regulación de la oxidasa terminal *cbb*₃ (Roh and Kaplan 2002). En *Pseudomonas aeruginosa*, RoxR activa la expresión de la terminal oxidasa insensible a cianida (Comolli and Donohue, 2002).

1.2. CADENAS RESPIRATORIAS EN LOS RHIZOBIOS.

Las principales responsables de la fijación simbiótica de nitrógeno son las bacterias conocidas genéricamente como rizobios. Dichas bacterias constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos distribuidos en 12 géneros: *Rhizobium*, *Allorhizobium*, *Ensifer* (antes *Sinorhizobium*), *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Blastobacter*, *Methylobacterium*, *Devosia*, *Burkholderia*, *Ralstonia* y *Ochrobactrum*. Los rizobios, miembros del orden *Rhizobiales* de la subdivisión α de Proteobacterias son bacterias del suelo gram negativas con la capacidad de establecer una relación simbiótica fijadora de nitrógeno con raíces de leguminosas.

Los rizobios son microorganismos aeróbicos que utilizan el oxígeno como aceptor final de la cadena de transporte respiratoria para la generación de ATP. Tras la oxidación de un compuesto orgánico los electrones liberados son aceptados por el pool de ubiquinonas mediante varias deshidrogenasas. De esta forma se inicia el transporte de electrones a través de distintos componentes de la cadena respiratoria hasta la reducción del oxígeno molecular hasta H_2O por una oxidasa terminal.

Mientras que la concentración de oxígeno en agua saturada de aire es cercana a $250 \mu M$, en nódulos la tensión de oxígeno es extremadamente baja, encontrándose entre 3 y 22 nM (Witty y Minchin, 1990; Hunt y Layzell, 1993). Bajo esas limitantes concentraciones de oxígeno el endosimbionte rizobio depende del ATP respiratorio para su metabolismo así como para el mantenimiento del costoso proceso de la fijación de nitrógeno molecular (N_2). Al menos 16 moléculas de ATP son requeridas para reducir una molécula de N_2 . Las condiciones microaeróbicas son esenciales para el funcionamiento de la nitrogenasa, la cual es irreversiblemente inactivada por oxígeno. El efecto combinado de células de la planta especializadas en actuar como barrera ante la difusión de oxígeno y concentraciones elevadas de leghemoglobina en el nódulo, permiten crear un microambiente con tensiones parciales de oxígeno muy bajas (Layzell *et al.*, 1993). En estas condiciones la bacteria induce la expresión de una citocromo *c* oxidasa de elevada afinidad que garantiza la óptima utilización del oxígeno presentes en el bacteroide a concentraciones inferiores a 30 nM.

En contraste con las sencillas cadenas respiratorias presente en la mayoría de las mitocondrias eucariotas, los rizobios presentan cadenas respiratorias ramificadas que terminan en oxidasas con distintas afinidad por el oxígeno. Mediante la expresión de estas oxidasas las células son capaces adaptarse a ambientes con concentraciones de oxígeno variables (Fig. 1.4.).

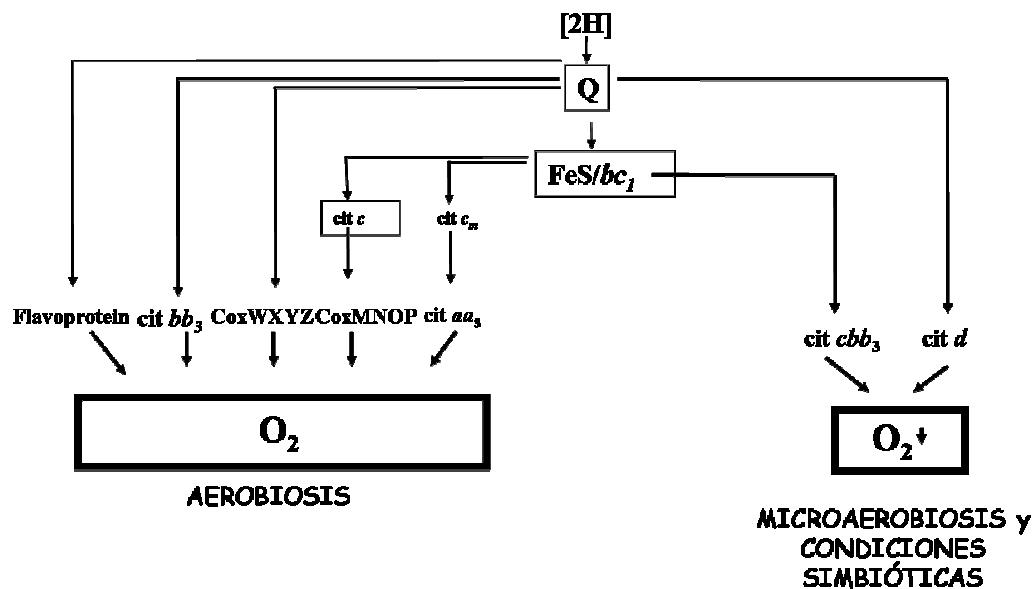


Figura. 1.4. Cadenas respiratorias expresadas bajo condiciones aeróbicas, microaeróbicas y simbióticas en Rhizobios (Adaptado de Delgado *et al.*, 1998)

1.2.1. Cadenas respiratorias en *Bradyrhizobium japonicum*.

La cadena respiratoria ramificada de *B. japonicum* es una de las mejor caracterizadas a nivel genético y bioquímico dentro del grupo de los rizobios (Fig. 1.5). La cadena respiratoria de *B. japonicum* de forma similar a la presente en otros organismos se caracteriza por estar constituida por distintos componentes individuales encargados de transportar los electrones de forma consecutiva desde una NADH deshidrogenasa, al complejo de ubiquinonas, complejo *bc1*, citocromo *c* y finalmente hasta una oxidasa terminal. Este transporte es llevado a cabo gracias al estado redox creciente de dichos componentes que oscila entre aproximadamente -400 mV a los +900 mV que presenta la oxidasa que termina la cadena respiratoria.

La conducción de electrones a través de este amplio rango de cofactores redox localizados en la membrana interna generará un gradiente electroquímico entre dicha membrana y el espacio periplásmico que permitirá la síntesis de ATP como molécula energética. Para que este proceso se lleve a cabo es necesario la reducción de un aceptor de electrones de elevado potencial redox, este es el oxígeno. Esta reacción enzimática, que termina el proceso de respiración, es catalizada por una citocromo *c* oxidasa. En *B. japonicum* se han descrito 4 oxidasas terminales. En condiciones aeróbicas, 2 citocromos *c* oxidasas alternativas llevan a cabo la reducción de O₂ a H₂O, la más abundante es la oxidasa de tipo *aa*₃ codificada por los genes *coxBA* y la segunda es la oxidasa codificada por el operón *coxMNOP*. En aerobiosis existe una tercera oxidasa, la quinol oxidasa de tipo *bb*₃ codificada por los genes *coxWXYZ*. Bajo condiciones limitantes de oxígeno (microaerobiosis) se expresa la citocromo *c* oxidasa de tipo *cbb*₃, codificada por los genes *fixNOQP*, con elevada afinidad por O₂ (Hennecke 1998), esta oxidasa es menos eficiente en la transducción de energía que la oxidasa aeróbica *aa*₃, sin embargo permite a la célula mantener su metabolismo ante bajas concentraciones de oxígeno. Una cuarta oxidasa terminal codificada por el gen *coxX* y que codifica una proteína de 666 aminoácidos fue clonada por el grupo de Robert J. Maier (surpin *et al.*, 1994), esta oxidasa presenta una gran homología con la subunidad I del citocromo *o* de *E. coli*.

Cabe destacar la existencia de una ruta respiratoria aeróbica alternativa que no contienen proteínas con grupos hemo, tal como se deduce de la habilidad de una mutante de *B. japonicum* defectuosas en la formación de ALA sintasa (y por tanto carente de grupos hemo) para crecer en aerobiosis (Frustaci *et al.*, 1991).

B. japonicum es considerada una bacteria de amplia distribución gracias a esta flexibilidad respiratoria a nivel de las oxidasas terminales lo cual le permite adaptarse a tensiones de oxígeno variables en el medio.

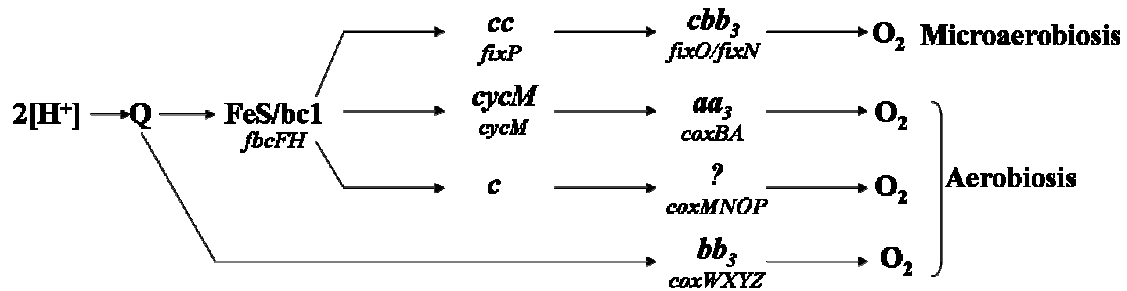


Figura 1.5. Representación esquemática de las cadenas respiratorias presentes en *B. japonicum* (Adaptado de Delgado *et al.*, 1998).

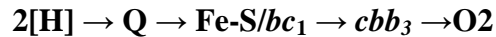
1.2.1.1. Caracterización bioquímica de la oxidasa *cbb₃*.

Bradyrhizbium japonicum es una bacteria del suelo con la capacidad de establecer una relación simbiótica con raíces de plantas de soja mediante la generación de nódulos fijadores de nitrógeno. Mientras que la concentración de oxígeno en agua saturada en aire es de aproximadamente 250 μM , en nódulos es extremadamente baja, de 3 a 22 nM (Witty y Minchin 1990; Hunt and Layzell, 1993). Las condiciones microaeróbicas en el nódulo son esenciales para el funcionamiento de la nitrogenasa, sin embargo, paradójicamente en este microambiente limitante en oxígeno se requiere una gran cantidad de ATP para mantener el costoso proceso de la fijación de nitrógeno. En los bacteroides de *B. japonicum* el problema es solventado con la inducción en los mismos de la oxidasa *cbb₃* de elevada afinidad por oxígeno, concretamente con una K_m para el oxígeno de 7 nM, este citocromo garantiza la óptima utilización del oxígeno dentro del bacteroide (Priesig *et al.*, 1993; Priesig *et al.*, 1996).

Un supercomplejo citocromo *c* oxidasa constituido por siete a ocho subunidades y con un peso molecular de 358-425 kDa fue purificado de membranas bacteroidales de *B. japonicum* (Keefe y Maier 1993). El complejo purificado era capaz de oxidar un citocromo *c* exógeno y contiene proteínas con grupos hemo *b* y *c* las cuales formaron complejos con CO. Dos de los componentes del complejo han sido identificados como citocromos *b* y *c₁* (Thöny-Meyer *et al.*, 1991). Además, el complejo funciona eficientemente a concentraciones de oxígeno inferiores a 1 mM.

distintas afinidades por el oxígeno en células de *B. japonicum* crecidas anaeróbicamente.

Estos resultados indican que la oxidasa *cbb₃* codificada por el operón *fixNOQP* mantiene la respiración microaeróbica en bacterioides endosimbióticos (Preisig *et al.*, 1993, 1996a; Thöny-Meyer *et al.*, 1995, Zufferey *et al.*, 1996a) en la ruta:



El estudio de la fijación simbiótica de nitrógeno, actividades TMPD y citocromo *c* oxidasa, espectroscopía diferencial, haem staining y western blots de cepas con mutaciones no polares en *fixN*, *fixO*, *fixQ* y *fixP* mostraron que para el ensamblaje de la oxidasa terminal *cbb₃*, FixN y FixO son los elementos primeramente requeridos para formar el complejo. FixP es incorporado al complejo posteriormente. FixQ no es esencial para dicho ensamblaje (Zufferey *et al.*, 1996a; Thöny-Meyer *et al.*, 1995) y no parece tener un papel esencial porque una mutante con una delección en el gen *fixQ* presenta un fenotipo Fix⁺ (Zufferey *et al.*, 1996a).

Durante la caracterización genética de la subunidad I (FixN) de la citocromo oxidasa *cbb₃*, se detectaron 12 histidinas altamente conservadas seis de ellas fueron asignados a los grupos hemo o cobre (Preisig *et al.*, 1993), las otras seis son específicas de FixN y su función no es muy conocida.

El reemplazamiento por mutagenesis dirigida de la histidina 43 por alanina resultó en una cepa mutante en la cual las tres proteínas Fix, FixN, FixO y FixP presentaron similares concentraciones a las detectadas en la cepa parental. Por el contrario, la proteína FixN no fue detectada en las mutantes cuando la histidina 131 fue reemplazada por alanina, y las proteínas FixO y FixP fueron debilmente detectadas. Estos resultados indican que el reemplazo de la histidina 131 causa un defecto en el ensamblaje o la estabilidad de la oxidasa y sugiere que la His 131 sirve como ligando para el grupo hemo B (Zufferey *et al.*, 1996b). H280, H330 e H331 son los ligandos de CuB y finalmente, H418 es el ligando del grupo hemo B de alto spin. H316 parece participar en la translocación de H⁺. H410 podría ser ligando de un metal como Mg²⁺ o Mn²⁺. Por último H457 parece estar relacionado con el ensamblaje o estabilidad del complejo. Las

3 histidinas restantes (H227, H246 e H333) no son importantes para ninguna función (Zufferey *et al.*, 1998). La identificación de los seis residuos de histidina y su localización en la cara periplásmica de la membrana permitieron establecer un modelo topológico de la subunidad FixN de la citocromo c oxidasa de hemo-cobre *cbb₃*, es una proteína de aproximadamente 61 kDa asociada a la membrana. Presenta 14 α -hélices hidrofóbicas, 12 de ellas transmembranales, con 12 residuos de histidina conservados (Zufferey *et al.*, 1996b, 1998)(Fig. 1.7). Esta organización es similar a que encontramos en la subunidad I de las oxidasas de hemo-cobre (Iwata *et al.*, 1995; Tsukihara *et al.*, 1996).

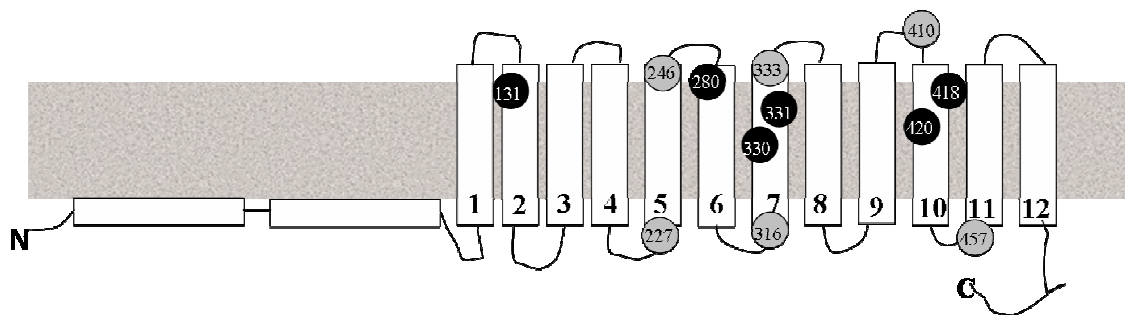


Figura 1.7. Modelo topológico de la proteína FixN de la citocromo oxidasa *cbb₃* de *B. japonicum*. Los círculos negros representan las histidinas conservadas en todas las oxidasas de hemo y cobre. Los círculos grises corresponden a las histidinas específicas de las proteínas FixN/CcoN. La numeración de las histidinas corresponde a la secuencia aminoacídica. Los rectángulos simbolizan los segmentos hidrofóbicos. C= extremo carboxilo, N= extremo amino. (Adaptado a partir de Zufferey *et al.*, 1998).

La oxidasa de tipo *cbb₃* carece de subunidades II y III típicas, siendo sustituidas por citocromos de tipo *c*: FixO y FixP. Estos citocromos llevan asociado un grupo hemo C y fixP dos. La incorporación de dichos grupos hemo C es un requisito imprescindible para el ensamblaje de la oxidasa (Zufferey *et al.*, 1997). El ensamblaje comienza con la asociación de las subunidades FixN y FixO en la membrana y posteriormente se incorpora la subunidad FixP (Zufferey *et al.*, 1996a). FixO y FixP proteínas transmembranales de 27 y 31 kDa respectivamente. FixP es la subunidad que media el transporte de e^- entre el complejo *bc₁* y el núcleo estructural de la oxidasa formado por las subunidades FixN-FixO. El papel de la proteína de 6 kDa FixQ no se conoce, siendo prescindible para la actividad de la oxidasa (Preisig *et al.*, 1994, Zufferey *et al.*, 1996a).

1.2.1.2. Regulación de la oxidasa *cbb*₃.

En *B. japonicum* el operón *fixNOQP* está regulado por la proteína FixK₂, que forma parte de la cascada regulatoria FixLJ/K₂ que responde a condiciones limitantes de oxígeno (ver capítulo 1.3.1). Concretamente, se llevaron a cabo estudios de expresión de la oxidasa terminal *cbb*₃ de *B. japonicum* mediante la construcción de fusiones al gen informador *lacZ*. Para ello, el gen *lacZ* se fusionó con el sexto codón del gen *fixP*. Tras análisis de la expresión génica en la cepa parental y en mutantes alteradas en los genes *fixL*, *fixJ*, y *fixK*₂, se observó una clara inducción de la expresión de dicha oxidasa en condiciones microaeróbicas, así como la dependencia de dicha inducción del sistema regulador FixLJ/K₂ (Preisig *et al.*, 1993 and 1996). La esencialidad de FixK₂ para la activación del operón *fixNOQP* se ha demostrado recientemente mediante experimentos de transcripción *in vitro* usando la proteína FixK₂ purificada (Mesa *et al.*, 2005).

1.3. CASCADAS REGULATORIAS EN RESPUESTA A OXÍGENO EN *B. japonicum*.

1.3.1. Sistema regulador FixLJ-FixK₂

Como ya hemos comentado anteriormente *B. japonicum* posee un eficaz sistema de regulación que responde a condiciones limitantes de oxígeno, el sistema FixLJ-FixK₂. Los genes *fixLJ* y *fixK* se identificaron en *S. meliloti* como elementos necesarios para la activación transcripcional de los operones *fixNOQP* y *fixGHIS* (Batut *et al.*, 1989). El operón *fixLJ* codifica 2 proteínas de 55 y 22 kDa, respectivamente, que pertenecen a la familia de sistemas regulatorios de dos componentes que permiten a la bacteria responder a las condiciones ambientales. La proteína FixL es una proteína sensora unida a la membrana con un dominio central capaz de unir O₂ gracias a un grupo hemo y un dominio C-terminal que porta un residuo de histidina para la fosforilación de la proteína. La proteína FixJ es un activador transcripcional con 2 dominios funcionales: el dominio N-terminal, con un residuo de ácido aspártico necesario para la fosforilación de la proteína y un dominio C-terminal, que muestra homología con activadores transcripcionales (Fischer 1994).

Entre los genes activados por FixJ se encuentra *fixK*. La proteína FixK se incluye en la clase I de la familia de proteínas reguladoras Crp/Fnr, representada por la proteína Fnr de *E. coli* ("Fumarate and nitrate reductase regulation) y que agrupa a proteínas relacionadas con la regulación por O₂ de diversos procesos celulares (Fischer 1994). En condiciones limitantes de oxígeno, la hemoproteína FixL se autofosforila y transfiere su grupo fosfato al regulador transcripcional FixJ. Fosforilado FixJ activa la transcripción de *fixK*.

La existencia de Fnr se describió en *E. coli* para explicar la existencia de cepas mutantes incapaces de usar fumarato, nitrato o nitrito como aceptores de electrones durante el crecimiento en microaerobiosis. Precisamente, el término Fnr (*fumarate and nitrate reduction*) hace referencia a la deficiencia de las cepas mutantes en la reducción microaeróbica del fumarato y del nitrato (Lambden y Guest, 1976). Fnr es una proteína citoplasmática que presenta homología estructural y funcional con la proteína Crp (*Cyclic-AMP receptor protein*) de *E. coli* (Shaw et al. 1983), también llamada Cap (*Catabolite activator protein*). Fnr de *E. coli* está implicada en la expresión de más de cuarenta genes y operones que requieren limitación de oxígeno para su expresión, entre otros, los genes que codifican la alcohol deshidrogenasa, la aconitasa, el transporte del dicarboxilato, las citocromo *o* y *d* oxidasas, la dimetil sulfóxido reductasa, la fumarato reductasa, las nitrato y nitrito reductasas, la biosíntesis del cofactor de molibdeno, la hidrogenasa, etc. (ver revisión de Guest et al. 1996; Körner et al. 2003).

Crp y Fnr pertenecen a un grupo de proteínas al que dan nombre, por ser los miembros que primero se identificaron y caracterizaron. Se encuentran representados en los reinos *Bacteria* y *Eukaria*, aunque es la clase γ de las *Proteobacteria* la que más miembros contiene y donde su bioquímica y genética se han estudiado con mayor detalle (ver revisiones de Körner et al. 2003; van Spanning et al. 2005). Son proteínas de 230-250 aminoácidos que se caracterizan por presentar en su extremo C-terminal un motivo de unión a ADN (helix-turn-helix, HTH, N₅-(A/C)-N₃-G-N₅-(I/V)-N₅ (Brennan y Matthews, 1989), un dominio central α -hélice implicado en la dimerización de la proteína, y un extremo N-terminal compuesto por unos 170 residuos, de composición variable, donde radica la versatilidad de estos reguladores para responder a los diferentes estímulos ambientales a los que las bacterias pueden enfrentarse. En Fnr, el extremo N-terminal incluye tres cisteínas agrupadas en la secuencia Cys-X₂-Cys-X₅-

Cys que, junto otra cisteína en la región central, constituyen un dominio de unión de grupos [Fe-S].

Fnr se une de forma específica a las denominadas cajas de anaerobiosis cuya secuencia consenso es 5'-TTGAT-N₄-ATCAA-3' (Spiro y Guest, 1990; Guest et al. 1996), en las que el motivo TTGA interacciona con los aminoácidos Glu-209 y Ser-212 de cada monómero de la proteína (Vollack et al. 1999). Las cajas de anaerobiosis de la mayoría de los promotores regulados positivamente por Fnr están centradas en posición -41,5 respecto al sitio de inicio de la transcripción, aunque existen notables excepciones (para revisión ver Körner et al. 2003; van Spanning et al. 2005).

Mientras que en aerobiosis Fnr es monomérica e inactiva (Lazazzera et al. 1996; Green y Baldwin, 1997), en condiciones microaeróbicas la proteína es un dímero capaz de unirse a ADN. Cada dímero contiene dos grupos [4Fe-4S]²⁺ que se unen al motivo de cisteínas en condiciones anóxicas, por lo que el conjunto de tales cisteínas es clave para la actividad como regulador transcripcional de Fnr (Spiro y Guest, 1990; Guest et al. 1996). En presencia de oxígeno, la agrupación [4Fe-4S]²⁺ se oxida, separándose en dos monómeros inactivos (Unden y Schiravski, 1997). El tamaño molecular de la proteína inactiva es de unos 30 kDa (Trageser et al. 1990).

Que los genes de la desnitrificación están controlados por limitación de oxígeno se confirmó cuando se llevaron a cabo experimentos de fusión entre el gen *lacZ* y las regiones promotoras de los genes *nirS* (Arai et al. 1991), *nirQ* (Arai et al. 1994) y *nosR* de *P. aeruginosa* (Cuypers et al. 1995). Después de esos experimentos se estableció con claridad que el primer factor estrictamente necesario para que se expresen los genes de la desnitrificación es la ausencia de oxígeno (ver revisiones de Zumft, 1997; van Spanning et al. 2005).

Respecto al mecanismo de activación de la transcripción de los genes que regulan los activadores transcripcionales de la familia Crp/Fnr, el mejor conocido es el de Crp de *E. coli*. La activación de los promotores regulados por Cap requiere tres componentes: la proteína Cap, la ARN polimerasa (ARNP) y el ADN (para una revisión ver Busby y Ebright, 1999; Lawson et al. 2004).

La proteína Cap está formada por dos monómeros de 45 kDa cada uno. El dominio N-terminal que abarca los residuos 1 a 139 es el responsable de la interacción con el AMP-cíclico. El dominio C-terminal, que se extiende de los residuos 140 a 209, contiene un motivo HTH, ITRQEICQIVGCSRETVGRILK, que reconoce la secuencia palindrómica 5'-AATGTGATCTA-GATCACATTT-3' (Ebright et al. 1989). La proteína Cap se ha purificado y su estructura determinada mediante cristalografía (McKay y Steitz, 1981).

La holoenzima ARNP tiene una masa molecular de 450 kDa, y está compuesta por las subunidades $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ (Chamberlin, 1976). La subunidad α tiene un tamaño molecular de 37 kDa y está formada, a su vez, por dos dominios, el N-terminal, α NTD, responsable de su dimerización y de la interacción con la ARNP, y el C-terminal, α CTD, responsable de la interacción con el ADN, así como con otras moléculas que puedan actuar como activadores, represores o terminadores de la transcripción. Ambas subunidades están unidas por un puente de unos 13 aminoácidos que posee cierta flexibilidad, lo que le permite establecer diferentes contactos, según el modelo de activación, o el tipo de complejo de la transcripción (Blatter et al. 1994; Busby y Ebright, 1994). La subunidad β , de 151 kDa, es responsable de la actividad catalítica (Miller et al. 1997) y la subunidad σ , 70 kDa, es la responsable del reconocimiento de los elementos -35 y -10 de los promotores (Busby y Ebright, 1994). Existen otros factores σ de distinta masa molecular, que pueden reconocer otras secuencias específicas en los promotores, aunque el mecanismo de activación de la ARNP es similar. En *E. coli* se han identificado seis factores σ alternativos. El factor σ^{54} (54 kDa), codificado por el gen *rpoN*, está implicado en la expresión de gran variedad de genes, incluyendo los relacionados con la fijación y asimilación del nitrógeno (Magasanik, 1982). Los factores σ^{32} (32 kDa) y σ^{24} (24 kDa), están codificados por los genes *rpoH* y *rpoE*, respectivamente, e intervienen en respuesta al choque térmico (*heat shock genes*) (Erickson et al. 1987; Erickson y Gross, 1989). El factor sigma σ^{38} (38 kDa), el producto del gen *rpoS*, es un elemento clave en la respuesta al estrés durante la transición de la fase de crecimiento exponencial al estacionario (Hengge-Aronis, 1993). El factor σ^{28} (28 kDa) está codificado por el gen *rpoS* y controla la transcripción de los genes implicados en la formación del flagelo y en quimiotaxis (Arnosti y Chamberlin, 1989). Por último, FecI, una proteína implicada en el transporte de citrato férrico, se considera también un factor σ con funciones extracitoplasmáticas (Angerer et al. 1995).

Los promotores activados por Cap, en función de su interacción con esta proteína, se han clasificado en tres grupos, de manera que cada uno tiene un mecanismo de activación diferente (Busby y Ebright, 1994; Lawson et al. 2004).

Los promotores de la clase I sólo requieren una molécula de Cap para la activación de la transcripción, y se unen en una posición generalmente comprendida entre la -93 y la -62 respecto al sitio de inicio de la transcripción. En la activación interviene una región comprendida entre los residuos 156 a 164, llamada región activadora 1 (AR1, Activating Region 1). Esta región interacciona con la llamada región determinante 287 de la α CTD de la ARNP (Savery et al. 1998), zona en la que la mutación de algunos residuos afecta la interacción con la Cap. Las regiones determinantes 261 y 265 de α CTD son también esenciales para la activación, ya que intervienen en la interacción con el ADN (Gaal et al. 1996; Murakami et al. 1996; Ross y Gourse, 2005). Para que la transcripción ocurra en los promotores de la clase I, la proteína Cap debe estar en contacto directo con la subunidad α CTD de la ARNP, lo que facilitaría la unión de α CTD con el ADN adyacente comprendido entre Cap y la ARNP. La interacción entre Cap y ARNP incrementa la afinidad de la ARNP por el promotor, lo que favorece la iniciación de la transcripción (Malan et al. 1984; Kolb et al. 1993; Heyduk et al. 1993).

Los promotores incluidos en la clase II requieren para su activación por Cap que, además de AR1, la proteína posea otra región activadora, AR2, comprendida entre los aminoácidos His-19, His-21, Glu-21 y Lys-101 de su extremo N-terminal (Niu et al. 1996). Para la interacción con Cap, la ARNP requiere, además de los determinantes 265 y 287 de α CTD (Savery et al. 1998), un determinante adicional formado por los residuos 162 a 165 de α NTD (Niu et al. 1996). En el mecanismo de activación propuesto, el sitio de unión de Cap a los promotores de la clase II se solaparía con el elemento -35 del promotor y la transcripción se iniciaría a partir de la interacción de AR1 con α CTD y de AR2 con α NTD. Mientras que la unión entre Cap y la α CTD, como ya se ha indicado, incrementa la afinidad de la ARNP por el promotor (Niu et al. 1996; Rhodius et al. 1997), la interacción entre AR2 y α NTD facilita la formación del complejo cerrado al complejo abierto necesario para que se inicie la transcripción. Además de estas dos interacciones, la que ocurre entre el Glu-58 de una tercera región

activadora (AR3) de Cap y la subunidad σ^{70} de la ARNP es esencial para la activación (Williams et al. 1991; Niu et al. 1996) ya que dicha interacción parece implicada en la formación del complejo abierto (Busby y Ebright, 1997).

Para la activación de los promotores de clase III es necesaria la intervención de dos o más moléculas de Cap. Aunque estos promotores tienen distintas arquitecturas, con diferentes distancias entre los sitios de unión de Cap con la ARNP, la organización es relativamente simple, puesto que son combinaciones de las clases I y II. De este modo, un dímero de Cap unido al ADN en la posición -103 o -93 puede activar la transcripción actuando simultáneamente con otro dímero unido en la posición -62 (Joung et al. 1993; Law et al. 1999; Langdom y Hochschild, 1999). En estos casos, cada dímero de Cap funciona independientemente como en el caso de la clase I, contactando su AR1 con cada copia de la α CTD. Del mismo modo, un dímero de Cap centrado en las posiciones -103, -93 o -83 puede activar la transcripción actuando simultáneamente con un dímero centrado en la posición -42 (Busby et al. 1994; Belyaeva et al. 1998). De esta manera, un dímero activaría siguiendo el mecanismo de los promotores de clase I, esto es conectando su AR1 con una α CTD, y el otro dímero actuaría mediante un mecanismo de clase II, contactando su AR1, AR2 y, según el caso, su AR3 con la α CTD, α NTD y σ^{70} , respectivamente.

Entre las más de las 1.200 proteínas con un motivo de unión a ADN similar al localizado en N-terminal de Cap/Fnr, se han indentificado 369 que, además, poseen en su C-terminal un motivo HTH de unión a ADN. Por sus relaciones filogenéticas, se han clasificado en 14 grupos, cada uno de ellos representado, respectivamente, por las proteínas ArcR, CooA, Cprk, Crp, Dnr, FixK, Flp, Fnr, FnrN, MalR, NnrR, NtcA, PrfA y YeiL, que responden a un amplio espectro de señales tanto exógenas como intracelulares (Körner et al. 2003). Entre ellas, además de Fnr, otras proteínas implicadas en regulación de la desnitrificación son Anr de *P. aeruginosa* (Ye et al. 1995) y FnrP de *P. denitrificans* (Van Spanning et al. 1997), que controlan la expresión del operón *nar* y fueron los primeros reguladores tipo Fnr descritos en bacterias desnitrificantes. La expresión del gen *aniA*, que codifica la Cu-NirK nitrito reductasa de *Neisseria gonorrhoeae*, también depende de un regulador de la familia Crp/Fnr (Lissenden et al. 2000).

Todos los reguladores transcripcionales de respuesta a la limitación de oxígeno de la familia Crp/Fnr se agrupan en el mismo clado, lo que indica la identidad tanto en la secuencia aminoacídica como en las distintas características estructurales de los diversos ortólogos (Körner et al. 2003).

La proteína FixK₂ se descubrió en *B. japonicum* (Fisher 1994; Nellen-Anthamatten et al. 1998), donde controla la expresión de una serie de genes y operones implicados tanto en el metabolismo microaeróbico, como *fixNOQP/fixGHIS*, *hema*, *rpoN₁*, *hup*, etc. (ver Nellen-Anthamatten et al. 1998), como en la desnitrificación (ver capítulo 3.4). FixK₂ se incluye en el clado FixK de la familia Fnr/Crp, rama que se caracteriza por carecer tanto del motivo de cisteínas del extremo N-terminal como de la cisteína del dominio central de la proteína. Por tanto, la actividad de estos factores no está sometida a control redox como ocurre en Fnr/Crp. Entre las proteínas de esta rama cabe destacar, entre otras, a FixK de *S. meliloti* (Batut et al. 1989) y de *A. caulinodans* (Kaminski y Elmerich, 1991).

Puesto que los reguladores de tipo FixK carecen de mecanismo sensor de la concentración de oxígeno, su actividad ocurre en cooperación con el sistema regulador de dos componentes denominado FixLJ. FixL se describió por primera vez en *Sinorhizobium meliloti* en donde controla la expresión de genes relacionados con la fijación simbiótica de dinitrógeno (*fix* y *nif*) y con la desnitrificación (Virts et al. 1988; David et al. 1988; Anthamatten y Hennecke, 1991). Proteínas homólogas a FixL se han descrito también en *Caulobacter crescentus* (Crosson et al. 2005) y en *Rhodospseudomonas palustris* (Dispensa et al. 1992).

FixL contiene en su extremo N-terminal el dominio PAS (del inglés *Per-ARNT-Sim*). Este nombre es un acrónimo formado por las iniciales de las proteínas que contienen las secuencias características de este dominios: la proteína *period clock* de *Drosophila* (PER), el translocador nuclear del receptor aril-hidrocarbonado presente en vertebrados (ARNT) y la proteína *single-minded* de *Drosophila* (SIM) (ver revisión de Taylor y Zhulin, 1999). En el dominio PAS, no obstante, se localiza, de forma invariable, una histidina ligada a un grupo hemo con gran afinidad por el oxígeno (Gilles-Gonzalez et al. 1994; Bertolucci et al. 1996). En aerobiosis, el oxígeno se une al grupo hemo y FixL

es inactiva (Tuckerman et al. 2002; Dunham et al. 2003). La variabilidad en los residuos aminoacídicos del dominio PAS confiere a FixL una gran versatilidad ya que, además de oxígeno, puede unirse a monóxido de carbono y óxido nítrico (para revisión ver Gilles-Gonzalez y Gonzalez, 2005).

En ausencia de oxígeno, FixL se autofosforila por la actividad quinasa de su extremo C-terminal (Gong et al. 1998). La proteína FixL fosforilada activa, a su vez, a la proteína FixJ mediante la transferencia de un grupo fosfato a un aspartato (Tuckerman et al. 2001; 2002). FixJ es un regulador de respuesta capaz de activar las regiones promotoras de los genes que regula. En conjunto, FixL y FixJ constituyen un sistema sensor-regulador de dos componentes implicado en la activación de genes que se expresan en condiciones limitantes de oxígeno (Gilles-Gonzalez y Gonzalez, 1993; Anthamatten et al. 1992).

Las proteínas FixLJ/FixK₂ forman, en conjunto un sistema regulador global en respuesta a la limitación de oxígeno.

En la región promotora de todos los genes controlados por FixK₂ existe una secuencia tipificada por la secuencia consenso 5'- TTGAT-N₄-GTCAA- 3', donde se uniría la proteína. Esta secuencia se denomina caja FixK y es homóloga a la secuencia que reconoce Fnr (Tabla 1.1). Todos los promotores regulados por FixK₂ tienen la arquitectura correspondiente a los promotores de clase II, con el sitio de unión centrado en la posición -41,5. El gen *hemN₂* puede ser una excepción a esto, ya que posee un sitio de unión de FixK₂ adicional en la posición -78,5, lo que sugiere que pueda tratarse de un promotor de clase III.

Tabla 1.1. Cajas Fnr/FixK en *B. japonicum*. Se incluyen las secuencias correspondientes y su posición respecto al sitio de inicio de la transcripción.

Gen	Secuencia	Posición respecto al sitio de inicio de la transcripción	Referencia
<i>nnrR</i>	TTGCGctatCGCAA	Desconocido	Mesa et al. 2003
<i>napE</i>	TTGATccagATCAA	-66,5	Delgado et al. 2003
<i>nirK</i>	TTGTTgcagCGCAA	Desconocido	Velasco et al. 2001

<i>norC</i>	TTGCGccctGACAA	-45,5	Mesa et al. 2002
<i>nosR</i>	TTGATccagCGCAA	Desconocido	Velasco et al. 2004
Secuencia consenso Fnr	TTGAT-N ₄ -ATCAA	-41,5	Spiro y Guest, 1990
Secuencia consenso FixK	TTGAT-N ₄ -GTCAA	-40,5	Fischer, 1994

1.3.2. Sistema regulador RegSR-NifA

Además del control mediado por la cascada reguladora FixLJ/FixK₂, en *Bradyrhizobium japonicum* se ha descrito otro sistema en respuesta a bajas concentraciones de oxígeno, es el sistema RegSR/NifA. Esta cascada reguladora es activada a concentraciones de oxígeno mucho más limitantes (<2%) que la cascada iniciada por la proteína FixL y está implicada principalmente en la inducción de muchos genes requeridos para el proceso de fijación de nitrógeno en nódulos de soja (Evelin *et al.*, 1998) los cuales son activados en última instancia por la proteína NifA en cooperación con el factor sigma σ^{54} .

El sistema regulador de dos componentes RegSR fue asignado como un nuevo elemento en la cascada regulatoria de la proteína reguladora NifA (Evelin *et al.*, 1998). RegR es el regulador de respuesta del sistema de dos componentes RegSR. El único elemento conocido sobre el que actúa RegR es sobre el operón *fixR-nifA*, el cual codifica para el factor de transcripción sensor de potencial redox NifA.

La proteína reguladora NifA de *Bradyrhizobium japonicum* codifica una proteína de 582 aminoácidos y tiene un peso molecular de 63084, es la proteína más grande de las proteínas NifA identificadas: proteínas NifA de *R.meliloti* (Buikema, W. J. *et al.*, 1985, Weber, G., H. *et al.*, 1985), *R.leguminosarum* (Gronger, P. *et al.*, 1987) and *K. pneumoniae* (Buikema, W. J. *et al.*, 1985) tienen 541, 519 y 24 aminoácidos, y un peso molecular de 59864, 56131 y 58631, respectivamente. NifA es una proteína citoplasmática clasificada como proteína potenciadoras (EBPs) (Morett, E., *et al.*, 1993, Studholme, D. J. *et al.*, 2003), perteneciente a la superfamilia AAA+ de ATPasas que transforman energía en una función mecánica para utilizar sus substratos. Es una proteína modular constituida que se caracteriza por presentar un dominio N-terminal

(ND) de 194 aminoácidos, un dominio central (CD) de 240 aminoácidos implicado en la unión con el factor sigma 54 de la polimerasa y un dominio C-terminal de 78 aminoácidos en cuyo extremo presenta un motivo de unión a ADN (helix-turn-helix), estos dos últimos dominios se encuentran unidos por un dominio llamado IDL de 36 a 38 aminoácidos en el cual se encuentra una secuencia rica en cisteína (Cys-X11-Cys-X19-Cys-X4-Cys) encargada unir covalentemente iones metálicos como Fe_2^+ mediante los cuales la proteína es capaz de sensor variaciones de oxígeno en el medio y potencial redox (Fig. 1.8).

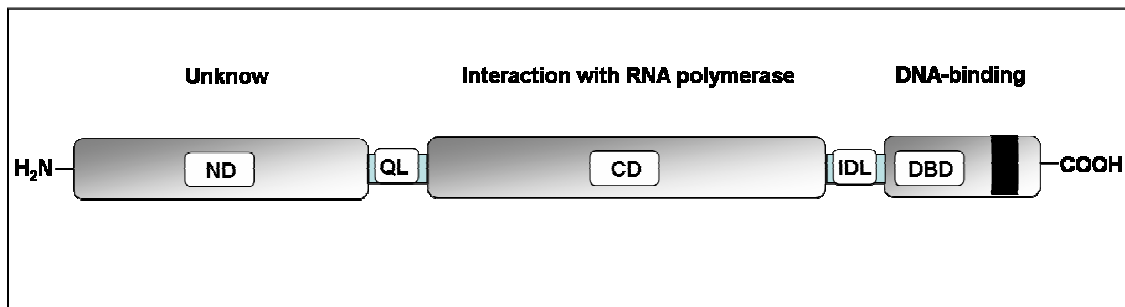


Figura. 1.8. Dominios estructurales de la proteína NifA en *B. japonicum* (Adaptado de la revisión de Hans-Martin Fischer 1994).

La proteína NifA fue descrita por primera vez, como un activador transcripcional de los genes *nif*, en *K. pneumoniae*, y el respectivo gen *nif* fue el primero en ser clonado y secuenciado (Buchanan-Wollaston, V. *et al.*, 1981, Buikema, W. J. *et al.*, 1987, Drummond, M., P. *et al.*, 1986). Posteriormente, este gen fue usado como sonda para la identificación de otros genes *nif* en un gran número de bacterias diazotrofas. Hasta la fecha las secuencias de ADN correspondientes al gen *nif* han sido encontradas al menos en 15 especies: *K pneumoniae*, *Kiebsiella oxytoca* (Kim, Y. M., *et al.*,1986), *Azotobacter vinelandii* (Bennett, L. T. *et al.*,1988), *Azotobacter chroococcum* (Evans, D. *et al.*,1987, Evans, D. *et al.*,1988), *Azospirillum brasilense* (Liang, Y. Y. *et al.*,1991), *Azospirillum lipoferum* (Shigematsu, T. *et al.*,1992), *Herbaspirillum seropedicae* (Soto, M. J. *et al.*,1993), *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3855 and PRE (Gronger, P. *et al.*,1987,

Roelvink, P. W. *et al.*, 1989), *R. leguminosarum* bv. trifolii (Iismaa, S. *et al.*, 1989), *R. leguminosarum* bv. phaseoli (Merrick, M. *et al.*, 1985), *R. meliloti* (Buikema, W. J. *et al.*, 1985, Weber, G., H. *et al.*, 1985), *A. caulinodans* (Nees, D. W. 1998, Ratet, P. 1989), *Bradyrhizobium japonicum* (Thony, B. *et al.*, 1987), y *Rhodobacter capsulatus* (Martin-Verstraete, I. 1992).

La proteína NifA de *Bradyrhizobium japonicum* regula genes y operones principalmente implicados en el proceso de fijación de nitrógeno. Mutaciones en los genes *nif* de *Bradyrhizobium japonicum* dieron lugar a cepas incapaces de fijar nitrógeno en simbiosis con leguminosas (fenotipo Fix⁻), y, de forma similar, no se detectó actividad nitrogenasa en vida libre (fenotipo Nif⁻). Pero el control mediado por NifA no solo incluye a genes directamente relacionados con la fijación de nitrógeno, sino también genes que intervienen en otros procesos como el control de chaperoninas. Además, NifA está también implicado en otros procesos no directamente relacionados con la fijación de nitrógeno como genes que codifican chaperoninas como los groESL (Arigoni, F. *et al.*, 1991) o genes de la desnitrificación (resultados no publicados) (Fig. 1.9).

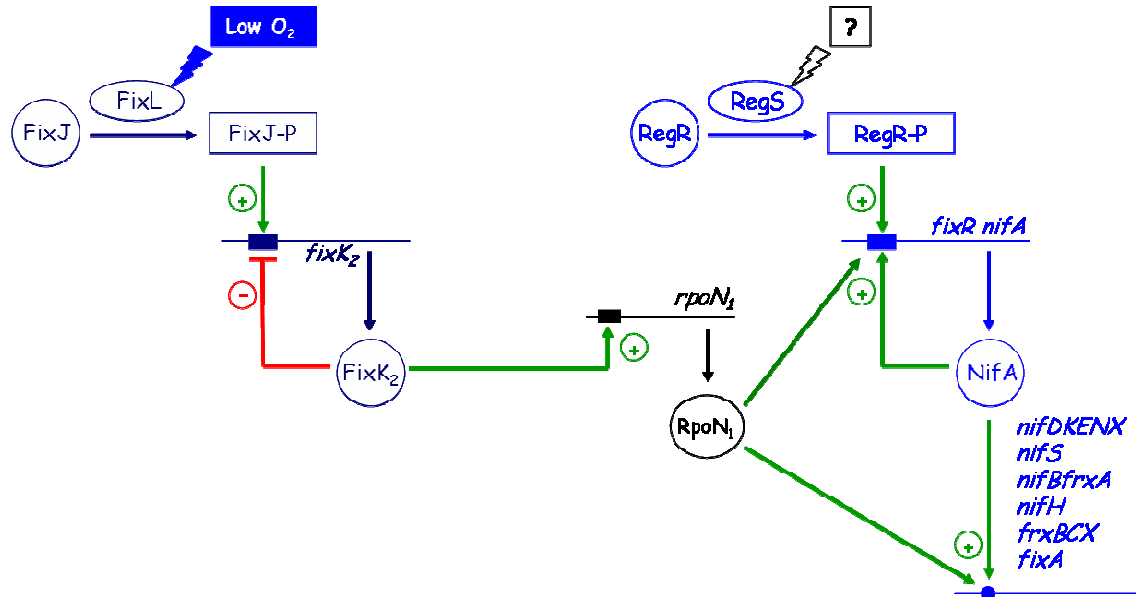


Figura 1.9. Representación esquemática de las dos cascadas reguladoras que controlan los genes requeridos para estilo de vida microaeróbico y anaeróbico y para fijación de nitrógeno en *Bradyrhizobium japonicum*. (Adaptado de Fischer *et al.*, 2003).

En la expresión de NifA están implicados dos promotores solapados, *fixRp₁* y *fixRp₂*, que son dependientes de NifA y RpoN, y RegSR respectivamente. La secuencia consenso de *fixRp₁* se encuentra en la posición -12/ -24 del inicio de la transcripción, dicho promotor es transcrito en condiciones anaeróbicas y es totalmente dependiente del factor sigma σ^{54} de la polimerasa. La expresión de dicho operón es potenciada por la unión de la proteína NifA en un sitio de activación delantero (UAS) que se encuentra en la posición -100 corriente arriba del inicio de la transcripción, cuya secuencia consenso es TGT-N10-ACA (Alvarez-Morales, A. *et al.*, 1996, Buck, M. *et al.*, 1987, Buck, M. *et al.*, 1986, Morett, E. *et al.*, 1988, Morett, E. *et al.*, 1991). A pesar de ser una secuencia altamente conservada, la expresión de muchos genes controlados por este promotor no se encuentran afectados por la mutación de dicha secuencia, lo que sugiere una compleja regulación del promotor *fixRp₁* en la que posiblemente intervengan otras proteínas y secuencias reguladoras distintas a las descritas. Reconstitución de condiciones aeróbicas da lugar a la inhibición de la proteína NifA y a la separación del factor sigma σ^{54} de su promotor, inhibiéndose la transcripción del promotor *fixRp₁*. Se ha demostrado que el promotor *fixRp₂* es transcrito de forma constitutiva a bajos niveles en condiciones aeróbicas, para su transcripción requiere la unión del factor sigma 96 en la posición -10/-35 y la interacción de la proteína reguladora RegR en un sitio de activador delantero (UAS) situado en la posición -68 aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción, (Fischer H.-M. *et al.*, 1994, Thöny B., *et al.*, 1987) (Fig. 1.10).

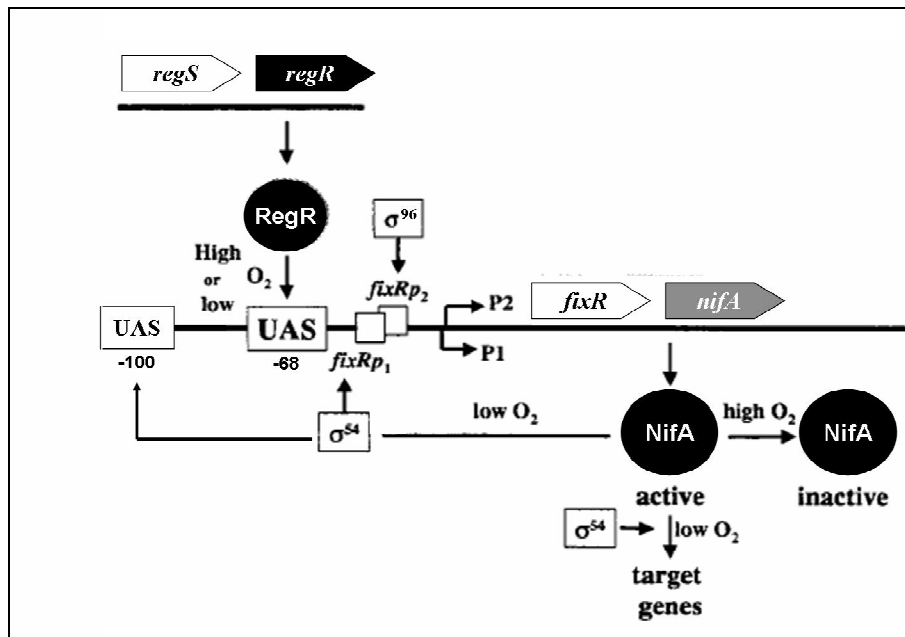


Figura 1.10. Regulación de los promotores solapados *fixRp₁* y *fixRp₂*. P₁ y P₂ son los sitios de inicio de la transcripción de t₁ y t₂. (Adaptado de Hennecke H. *et al.*, 1998).

La señal que es detectada por el sistema RegSR es desconocida. Por el contrario, como hemos mencionado anteriormente NifA es capaz de sensar oxígeno o potencial redox directamente por la presencia de un cofactor metálico (Fischer, H. M. *et al.*, 1989, Fischer, H. M., *et al.* 1987, Kullik, I. *et al.*, 1989), sin embargo el sistema RegSR no ha sido identificado como sistema sensor de oxígeno, dicho papel si ha sido demostrado en sistemas homólogos en otros microorganismos como los sistemas RegBA and PrrBA de *Rhodobacter capsulatus* y *Rhodobacter sphaeroides*, respectivamente. (Oh, J. *et al.*, 2000, Swem, L. R. *et al.*, 2001), debido a ello se especula que en *Bradyrhizobium japonicum* dicho sistema de dos componentes podría tener una función similar a la observada en otros organismos.

1.4. DESNITRIFICACIÓN

La desnitrificación es un proceso clave en el ciclo biogeoquímico del nitrógeno (N) en la biosfera, ya que es el mecanismo mediante el cual se devuelve a la atmósfera el dinitrógeno atmosférico fijado (N₂) (Figura 1.11). La desnitrificación es la principal reacción para eliminar el exceso de nitratos que, consecuencia del abuso en la utilización de fertilizantes nitrogenados en la práctica agrícola, contaminan los

ecosistemas terrestres y acuáticos. El óxido nítrico y el óxido nitroso, productos intermediarios de la desnitrificación, tienen también un enorme impacto sobre la contaminación atmosférica, ya que son gases que se liberan a la atmósfera e intervienen en la formación de la lluvia ácida, en el calentamiento global de la atmósfera, y en la destrucción de la capa de ozono de la misma. El óxido nítrico es, por otra parte, una importante molécula señal que participa en mecanismos de defensa frente a patógenos en eucariotas.

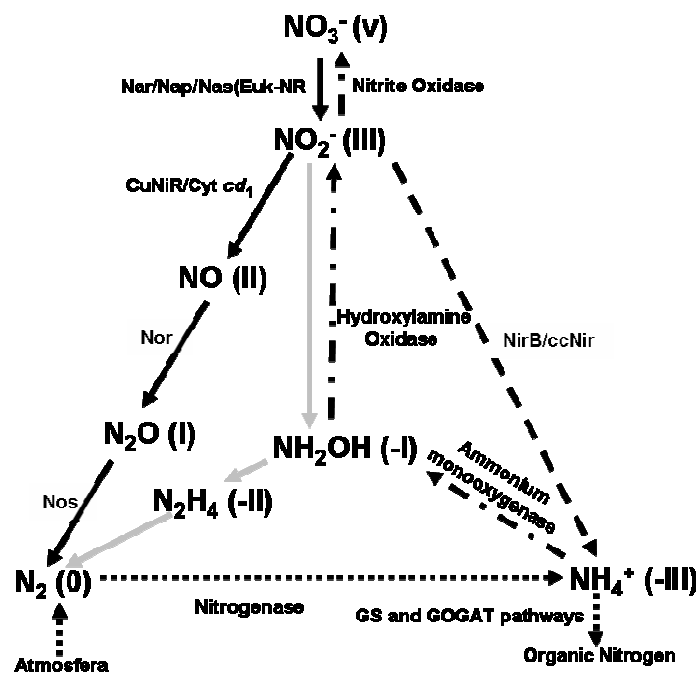
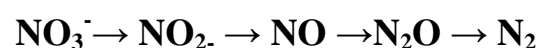


Figura 1.11. Ciclo biogeoquímico del Nitrógeno (adaptado de González *et al.*, 2006)

La desnitrificación es una forma alternativa de respiración por la que, en condiciones limitantes de oxígeno, los microorganismos pueden usar el nitrato, y sus óxidos de nitrógeno derivados (NOx), como aceptores de electrones en una cadena de transporte hasta la formación de dinitrógeno molecular, de acuerdo con la reacción:



La reducción de los NOx está acoplada a la producción de ATP, lo que permite a la célula crecer en ausencia de oxígeno.

La capacidad de desnitrificar está muy extendida en los procariotas y abarca a bacterias que pertenecen taxonómicamente a varias subclases de Proteobacterias, y a las Archeobacterias (Zumft, 1997). Aunque la desnitrificación es una característica propia de las bacterias anaerobias facultativas, y se considera que sólo ocurre en ausencia de oxígeno, se han descrito algunas especies del género *Paracoccus* (antes *Thiobacillus*) capaces de desnitrificar en condiciones aeróbicas (Stouthamer *et al.*, 1997). Igualmente, se ha demostrado la existencia de genes implicados en la desnitrificación en bacterias nitrificantes (DiSpirito *et al.*, 1985; Cebren y Garnier, 2005). Además, algunos hongos, como los del género *Fusarium* tienen también capacidad de desnitrificar (Kobayasi *et al.*, 1995; Takaya 2002).

La reducción del nitrato (NO_3^-) a dinitrógeno (N_2) lleva consigo la formación de nitrito (NO_2^-), óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N_2O) reacción que se lleva a cabo de forma secuencial por la actuación de las enzimas nitrato reductasa (Nap/Nar), nitrito reductasa ($\text{CuNir}/c_{d1}\text{Nir}$), óxido nítrico reductasa ($q\text{Nor}/c\text{Nor}$) y óxido nitroso reductasa (Nos), codificadas por los genes *nap/nar*, *niK/nirS*, *cnor/qnor* y *nos* respectivamente. Aunque la reducción de nitrato inicia la desnitrificación, se considera que la reducción de NO_2^- a NO es, en sentido estricto, la reacción clave que define el proceso ya que la reducción de nitrato también puede ocurrir en microorganismos no desnitrificantes. De hecho, *Escherichia coli*, una de las bacterias donde más se ha estudiado la fisiología, bioquímica y genética de la respiración del nitrato, es, sin embargo, incapaz de desnitrificar.

Mientras que la desnitrificación consiste en la reducción de nitrato/nitrito a N_2 , se han descrito bacterias que sólo llevan a cabo una desnitrificación parcial, incompleta, ya que no poseen, o no expresan, el equipo enzimático necesario para llevar a cabo la desnitrificación. El ejemplo más extendido es el de aquellas que carecen de óxido nitroso reductasa como *Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas aerofaciens* y diversas especies de la familia *Rhizobiaceae*. *Wollinella succinogenes* posee óxido nítrico y óxido nitroso reductasas y *Campylobacter fetus* sólo contiene óxido nitroso reductasa (Zumft, 1993). En *Rhizobium loti* se han descrito cepas que varían en el contenido de los genes de la desnitrificación, de manera que algunas sólo contienen genes *nir*, otras sólo genes *nor* y, unas terceras, sólo genes *nos* (Monza *et al.*, 2006). En

general, se considera que un microorganismo es un verdadero desnitrificante si es capaz de crecer microaeróbicamente con nitrato o nitrito como única fuente de nitrógeno y de energía (Fig. 12)

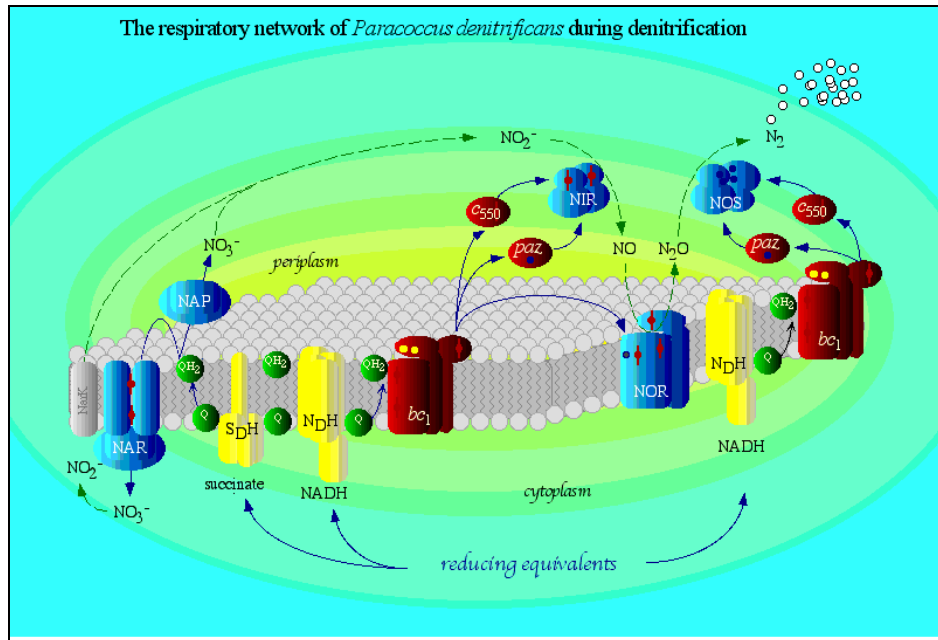


Figura 1.12. Representación esquemática del proceso de desnitrificación en *Paracoccus denitrificans* (adaptado de van Spanning *et al.*, 2005). Flechas discontinuas, transporte de óxidos de nitrógeno; Flechas continuas, transporte de electrones. SDH, succinato deshidrogenasa; NDH, NADH deshidrogenasa; Q, quinona; bc_1 , complejo bc_1 ; c_{550} , citocromo c ; paz, pseudoazurina; NAR, nitrato reductasa de membrana; NAP, nitrato reductasa periplásmica; NIR, nitrito reductasa de tipo cd_1 ; NOR, NO reductasa de tipo bc ; NOS, óxido nítrico reductasa.

1.4.1. Nitrato reductasas

La reducción del nitrato en bacterias se lleva a cabo con tres fines diferentes: como fuente de nitrógeno para su crecimiento (asimilación), para la obtención de energía cuando el nitrato actúa como aceptor final de electrones (respiración), y para la disipación del exceso de poder reductor y optimizar el crecimiento en ciertas condiciones metabólicas (desasimilación). En estos tres procesos intervienen, respectivamente, tres tipos de nitrato reductasas diferentes: la nitrato reductasa

citoplásmica asimilatoria (Nas), la nitrato reductasa respiratoria de membrana (Nar) y la nitrato reductasa periplásmica (Nap).

La reducción asimilatoria del nitrato da lugar a nitrito, el cual se reduce posteriormente a amonio, que, vía glutamina sintetasa/glutamato sintasa daría lugar a la formación de aminoácidos y proteínas. Existen dos tipos de nitrato reductasas asimilatorias: las que dependen de NADH y las que dependen de ferredoxina o flavodoxina. El primer grupo está constituido por proteínas formadas por dos subunidades de 95 y 45 kDa que están codificadas por los genes *nasA* y *nasC*, respectivamente, y que se han identificado en bacterias tales como *B. subtilis* (Ogawa *et al.*, 1993), *Klebsiella pneumoniae* y *Rhodobacter capsulatus* (Stewart, 1994; Moreno-Vivián *et al.*, 1999). Dentro del segundo grupo se encuentran las nitrato reductasas de *Azotobacter vinelandii* (Ramos *et al.*, 1993) y *Synechococcus* sp. (Luque *et al.*, 1992), entre otras. Estas enzimas están formadas por una única subunidad de 75 a 85 kDa, a excepción de la de *A. vinelandii* que es un polipéptido de 105 kDa (Ramos *et al.*, 1993).

La nitrato reductasa respiratoria de membrana se ha estudiado ampliamente en *E. coli* y está formada por tres subunidades, α , β y γ . La subunidad α corresponde a NarG, de 140 kDa, que contiene un cofactor de molibdeno y es la subunidad catalítica. La subunidad β corresponde a la proteína NarH, de 60 kDa, que se asocia en el citoplasma junto a NarG, y ambas se unen a la subunidad γ , NarI, por el dominio transmembrana de esta, localizada en su región C-terminal (Blasco *et al.*, 2001). Las proteínas Nar están codificadas por el operon *narGHJI* (Bonney y DeMoss 1994; Darwin y Stewart, 1996; Philippot y Højberg, 1999). Los genes *narG*, *narH* y *narI* codifican las distintas subunidades, y el gen *narJ* codifica una chaperona implicada en el proceso de maduración de la enzima. El operon *narGHJI* está conservado en distintas especies, de este modo que aparecen organizaciones génicas similares en *Paracoccus denitrificans* (Berks *et al.*, 1995), *Pseudomonas fluorescens* (Philippot *et al.*, 1997), *Pseudomonas stutzeri* (Härtig *et al.*, 1999) y *Bacillus subtilis* (Hoffman *et al.*, 1995) entre otros. *E. coli* posee también el operon *narZYWV*, que codifica una nitrato reductasa, enzima con función similar a la del producto del operon *narGHJI* (Blasco *et al.*, 1990).

Mientras que la nitrato reductasa respiratoria de membrana se expresa únicamente en condiciones limitantes de oxígeno, la nitrato reductasa periplásmica (Nap) puede ser activa en presencia de oxígeno. Las enzimas Nap se han estudiado en *Paracoccus denitrificans* (Sears *et al.*, 1995), *Paracoccus pantotrophus* (Bell *et al.*, 1993), *E. coli* (Grove *et al.*, 1996), *Rhodobacter sphaeroides* (Richardson *et al.*, 1990) y *Pseudomonas putida* (Carter *et al.*, 1995), entre otros microorganismos. Las enzimas Nap son heterodímeros formados por una subunidad catalítica de 90 kDa (NapA) y un citocromo *c* con dos grupos hemo y tamaño molecular de 15 kDa (NapB), codificadas por los genes *napA* y *napB*, respectivamente. Además de las subunidades estructurales, se ha identificado la proteína NapC, que es otro citocromo *c*, con cuatro grupos hemo, unido a la membrana, y de 25 kDa, codificado por el gen *napC*. La proteína NapC es la encargada de transferir electrones a la subunidad NapB (Cartron *et al.*, 2002). Los genes *napA*, *napB* y *napC* se encuentran agrupados con otra serie de genes que codifican proteínas adicionales necesarias para la síntesis y actividad enzimática, operones cuya organización difiere entre diferentes taxones. Un primer tipo corresponde al operon *napFDAGHBC*, presente en *Magnetospirillum magnetotacticum* (Taoka *et al.*, 2003), de la subdivisión α de las proteobacterias y en *E. coli*, y *Haemophilus influenzae* (Wang *et al.*, 1999; Stewart y Bledsoe, 2005), entre otros, de la subdivisión γ . Un segundo tipo corresponde al operon *napEFDABC*, descrito en miembros de la subdivisión α , como *Rhodobacter sphaeroides*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Sinorhizobium meliloti*, y en la subdivisión γ , como *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas G-179*. Un tercer tipo corresponde al operon *napFGDABC*, como el que se ha descrito en las γ proteobacterias *Vibrio cholerae* y *Yersinia pestis* (Van Spanning *et al.*, 2005). La transcripción de los genes *nap* depende de la concentración de oxígeno y de la presencia de nitrato o nitrito en el medio. En *E. coli*, la máxima expresión de Nap ocurre principalmente en condiciones de bajo oxígeno, y presencia de la proteína Fnr y NarP (Darwin *et al.*, 1998). En *P. pantotrophus*, la enzima Nap se expresa en aerobiosis (Bell *et al.*, 1990; Sears *et al.*, 1997). Se han postulado una serie de hipótesis acerca del papel fisiológico de esta enzima. Se ha demostrado que la enzima participa en la desnitrificación aeróbica y en los procesos de control del balance redox intracelular, disipando el exceso de poder reductor que se genera en ciertas condiciones metabólicas, como el crecimiento fototrófico, o el metabolismo de fuentes de carbono muy reducidas (Siddiqui *et al.*, 1993; Sears *et al.*, 2000; Moreno-Vivian *et al.*, 1999). Además de esta función, se ha descrito que la enzima puede desempeñar una función similar a la de Nar, acoplando la

reducción del nitrato a la producción de ATP, lo que ocurre en *Pseudomonas* G-179 (posiblemente una especie de *Rhizobium*) (Bedzyk *et al.*, 1999) y en *Bradyrhizobium japonicum* (Delgado *et al.*, 2003). Revisiones sobre la fisiología, bioquímica y genética de las enzimas Nap se han publicado por Van Spanning *et al.*, (2005), Gonzalez *et al.*, (2006); Jepson *et al.*, (2006).

1.4.2. Nitrito reductasas

En bacterias desnitrificantes se han caracterizado dos tipos de nitrito reductasas, una enzima homodimérica con grupos hemo c y hemo d1 (NirS, tipo cd1) y una enzima homotromérica con átomos de cobre (NirK, tipo cobre). Ambas son proteína periplásmicas, reciben electrones desde un citocromo c y/o de una pseudoazurina (Koutny *et al.*, 1999; Moir and Ferguson, 1994), y catalizan la reducción monoeléctrica de nitrito a óxido nítrico. Ninguna de las dos enzimas son electrogénicas, ya que adquieren los electrones y protones necesarios para la reducción del nitrito del periplasma donde se localizan. Las enzimas parecen ser mutuamente excluyentes en la naturaleza, ya que se ha demostrado su coexistencia a nivel de género, pero no a nivel de especie. Los dos tipos de enzima no parecen tener ninguna relación estructural ni evolutiva.

Las nitrito reductasas de cobre han sido aisladas de especies de diversos géneros bacterianos como *Achromobacter cycloclastes* (Fenderson *et al.*, 1991; Inatomi, 1999), *A. faecalis* S-6 (Kukimoto *et al.*, 1994), *Alcaligenes xylosoxidans* (Abraham Zelda *et al.*, 1993), *Rhodobacter sphaeroides* f.sp. *denitrificans* (Olesen *et al.*, 1998; Sawada and Satoh, 1980), *Pseudomonas aureofaciens* (Zumft *et al.*, 1987), *Nitrosomonas europaea* (DiSpirito *et al.*, 1985) the Gram-positive bacterium *Bacillus halodenitrificans* (Denariáz *et al.*, 1991), the actinomycete *Streptomyces thioluteus* (Shoun *et al.*, 1998), and the Archaeon *Halobacterium denitrificans* (Coyne *et al.*, 1989).

Dichas nitrito reductasas están codificadas por un único gen, al que se denomina *nirK*. Este gen se ha clonado y secuenciado en *lcaligenes xylosoxidans* (Prudencio *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 1999), *Achromobacter cycloclastes* (Chen *et al.*, 1996), *Rhodobacter sphaeroides* (Tosques Vvan *et al.*, 1997), *Pseudomonas aureofaciens* (Glockner *et al.*, 1993), *Pseudomonas* G-179 (Ye *et al.*, 1992), *Rhizobium sullae* (Toffanin *et*

al.,1996), *Sinorhizobium meliloti* (Barnett *et al.*,2001), *Bradyrhizobium japonicum* (Velasco *et al.*,2001) y el gen correspondiente a *nirK* en el gonococo *Neisseria gonorrhoeae*, el gen *aniA* (Hoehn and Clark, 1992; Mellies *et al.*,1997). En algunas especies, junto al gen *nirK* se encuentra el gen *nirV*, de función desconocida (Bedzyk *et al.*, 1999; Jain y Shapleigh, 2001). El gen *nirK* suele localizarse aislado en el genoma, sin formar parte de ningún operon, y sin que en las proximidades se hallen genes relacionados con la desnitrificación (Zumft, 1997). Sin embargo el gen *nirK* se suele encontrar precedido por secuencias de DNA que son reconocidas por las proteínas FNR-like (Householder *et al.*, 1999; Mellies *et al.*,1997; Tosques Vvan *et al.*,1997).

Las nitrito reductasas de cobre son complejos homotriméricos de 108 kDa (3 x 36 kDa) que contienen tres centros de cobre azul-verde de tipo I, los cuales están implicados en la transferencia de electrones desde un donador al sitio activo de la enzima y tres centros de cobre tipo II, que forman el sitio activo. Es generalmente asumido que el centro de cobre de tipo I de la nitrito reductasa de cobre recibe electrones de una cupredoxina, pseudoazurina o de una azurina. El flujo de electrones hacia la nitrito reductasa de cobre ocurre vía complejo citocromo *bc₁*.

En contraste con la sencilla organización de *nirK*, los genes que codifican las nitrito reductasas tipo *cd₁* forman parte de operones complejos en los que se encuentran genes implicados tanto en la síntesis como en el procesamiento de los grupos hemo que formarán el centro activo de la enzima. El número y organización de los genes *nir* difiere según las distintas especies. Los mejores caracterizados son los de *P. aeruginosa* (*nirSMCFDLGHJEN*) (Arai *et al.*, 1994), *P. denitrificans* (*nirXISECFDLGHJN*) (De Boer *et al.*, 1994) y *P. stutzeri* (*nirSTBMCFDLGH* y *nirJEN*) (Palmedo *et al.*, 1995). Revisiones sobre las enzimas nitrito reductasa se deben a Stach *et al.*, (2000), Cutruzzola, (1999); Van Spanning *et al.*, (2005).

Las nitrito reductasas tipo *cd₁* han sido aisladas de muchas bacterias desnitrificantes como *Alcaligenes faecalis* (Iwasaki and Matsubara, 1971), *Azospirillum brasilense* (Danneberg *et al.*,1986), *Paracoccus halodenitrificans* (Mancinelli *et al.*,1986), *M. magnetotacticum* (Yamazaki *et al.*,1995), *P. denitrificans* (Timkovich *et al.*,1982), *P. pantotrophus* (Moir *et al.*,1993), *Ps. aeruginosa* (Walsh *et al.*,1979; Wood, 1978), *Ps. stutzeri* (Weeg-Aerssens *et al.*,1991), *Pseudomonas nautica* (Besson *et al.*,1995),

Ralstonia eutropha (Sann *et al.*, 1994), *Erythrobacter* sp. Och 114 (Doi *et al.*, 1989) and *Thiobacillus denitrificans* (LeGall *et al.*, 1979). Todas ellas son miembros de alfa, beta o gamma proteobacterias. A parte de la reducción de nitrito a óxido nítrico las nitrito reductasas de tipo cd1 son capaces de reducir oxígeno a y por ello son designadas como citocromo oxidadas (Walsh *et al.*, 1979).

Dichas enzimas son homodímeros (120 kDa en su forma dimérica), y cada monómero presenta un dominio de unión a un grupo hemo c y a un hemo d1 que actúa como centro activo de la enzima.

1.4.3. Óxido nítrico reductasas

El óxido nítrico (NO) es una molécula citotóxica, por lo que debe reducirse rápidamente para mantener su concentración en un nivel nanomolar, no perjudicial para la célula. No obstante, *P. denitrificans*, entre otros microorganismos, puede crecer en microaerobiosis con NO como única fuente de energía ya que la reducción de NO a N₂O por la enzima óxido nítrico reductasa está acoplada a la traslocación de protones y correspondiente síntesis de ATP. Se han identificado dos tipos de Nor en bacterias desnitrificantes: unas que reciben electrones de un citocromo c, enzimas cNor, y otras que reciben electrones de una quinona, enzimas de tipo qNor.

Las enzimas qNor se encuentran en diversos grupos taxonómicos, incluyendo proteobacterias, como es el caso de *Ralstonia*, bacterias gram positivas, como en varias especies de *Bacillus*, y en arqueobacterias tales como *Pyrobaculum aerophilum* y *Sulpholobus solfataricus*. La más estudiada ha sido la de *Ralstonia eutropha*. La enzima consiste en una subunidad, NorB, de 75 kDa, que comprende dos regiones transmembrana y un dominio periplásmico (Cramm *et al.*, 1997). *R. eutropha* posee dos copias del gen que codifica la enzima, una denominada *norB*₁, a la que también se designa como *norB*, y otra *norB*₂, conocida igualmente como *norZ*. Asociados a los genes *norB* se encuentran el gen *norA*, que presenta homología con el gen *fnrN* de *P. stutzeri* de función desconocida, y el gen *norR*, cuyo producto, la proteína NorR, pertenece a la familia NtrC de factores transcripcionales, y está implicada en la regulación de los genes *norB* (Pholmann *et al.*, 2000).

Las enzimas cNor se han purificado y caracterizado en *P. stutzeri* (Heis *et al.*, 1989), *P. denitrificans* (Carr y Ferguson, 1990) y *R. sphaeroides* (Mitchell *et al.*, 1998). En todos los casos es una enzima unida a membrana, compuesta por dos subunidades, una de 17 kDa con un citocromo *c*, y una de 53 kDa, que contiene dos citocromos *b* y un átomo de hierro no hémico, llamadas NorC y NorB, respectivamente. Los electrones pasan del citocromo *c* al citocromo *b* y, finalmente, al sitio activo, donde se reducen dos moléculas de óxido nítrico al mismo tiempo (Hendriks *et al.*, 1998). Debido a la toxicidad del NO, su concentración en el interior celular se mantiene en niveles muy bajos, entre 1 y 100 nM (Goretski *et al.*, 1990). La enzima Nor tiene una elevada afinidad por su sustrato, y se inhibe por concentraciones elevadas de NO, posiblemente por unión del NO a la enzima en estado oxidado (Girsch y De Vries, 1997).

Los genes responsables de la síntesis de las enzimas cNor están agrupados en operones, cuya organización presenta ciertas diferencias entre los organismos desnitrificantes. La organización característica la encontramos en *Nitrosomonas europaea* y *R. sphaeroides*, que presentan el operon *norCBQD* (Bartnikas *et al.*, 1997). Los genes *norC* y *norB* codifican las subunidades NorC y NorB respectivamente (Arai *et al.*, 1995; De Boer *et al.*, 1996). El gen *norQ* codifica una proteína citoplasmática que contiene un motivo de unión a ATP, y *norD* codifica una proteína de función desconocida. Ambas proteínas se requieren para la activación de la enzima Nor (Arai *et al.*, 1994; De Boer *et al.*, 1996). Algunos desnitrificantes, como *P. denitrificans*, presentan en su organización génica, además, los genes *norE* y *norF*, cuyos productos están implicados en la maduración o la estabilidad de la enzima Nor (De Boer *et al.*, 1996).

A pesar de que las óxido nítrico reductasa son proteínas de membrana que intervienen en el transporte de electrones, son incapaces de traslocar protones y crear un gradiente electroquímico necesario para la síntesis de ATP (Bell *et al.*, 1992; Carr and Ferguson, 1990; Hendriks *et al.*, 2000; Shapleigh and Payne, 1985). Además, el sitio catalítico de cNor se encuentra en la cara periplásmica, en vez de en la cara citoplásmica como en las hemo oxidasas de cobre, las cuales si son generadoras de un gradiente electroquímico. Los electrones y protones requeridos para la reducción de NO son tomados del periplasma, lo cual convierte a la enzima en no electrogénica. Además, los residuos aminoacídicos que forman los canales D- y K- que intervienen en la conducción de protones desde el citoplasma al centro dinuclear de la proteína, no están presente. Sin

embargo, en las proteínas Nor se ha demostrado la presencia de residuos de ácido glutámico en la región periplásmica y en hélices transmembrana de la proteína que no están presentes en las oxidasas. Se está investigando la posible implicación de estos residuos en el movimiento de protones mediante la formación de un canal E que conectaría el sitio activo de la enzima con el periplasma.

Para revisiones sobre las enzimas Nor se puede consultar a Hendriks *et al.*, (2000), Zumft (2005), y Van Spanning *et al.*, (2005).

1.4.4. Óxido nitroso reductasas

El último paso de la desnitrificación es la reducción de N_2O a N_2 , reacción que cataliza la enzima óxido nitroso reductasa (Nos). La enzima se ha caracterizado bioquímicamente en *P. stutzeri* (Coyle *et al.*, 1985), *P. pantotrophus* (Berks *et al.*, 1993) y *P. denitrificans* (Snyder y Hollocher, 1987). En todos los casos la enzima, de localización periplásmica, es un homodímero compuesto por dos subunidades de 65 kDa, que contiene cobre en su centro activo.

Los genes que codifican la enzima Nos están organizados en operones cuyo exponente típico es el operón *nosRZDFYLX* de *P. stutzeri* (Braun y Zumft, 1992), *P. denitrificans* (Holloway *et al.*, 1996) y *S. meliloti* (Chan *et al.*, 1997). NosZ es la subunidad catalítica y los productos de los genes *nosR* y *nosX* presentan cierta identidad con las proteínas NirI y NirX de *P. denitrificans*, respectivamente (Saunders *et al.*, 1999, 2000). NosX parece implicada en el procesamiento de iones cobre y NosR lo está en la activación de la transcripción del promotor de los genes *nos* de *P. stutzeri* (Cuypers *et al.*, 1992; Wunsch y Zumft, 2005). El cobre es poco soluble en condiciones de limitación de oxígeno, por lo que requiere proteínas que sean capaces de captarlo en el interior celular, procesarlo hasta su estado activo y ensamblarlo a la proteína. Estas funciones corresponden a los productos de los genes *nosDFYL* (Honisch y Zumft, 2003). Para una revisión ver Zumft (2005); Van Spanning *et al.*, (2005).

1.4.5. Otros componentes del transporte de electrones asociado a la desnitrificación.

Además de las proteínas que intervienen en reducción secuencial de nitrato hasta nitrógeno molecular se han descrito otros componentes de menor peso molecular indispensables para el funcionamiento de dicho sistema respiratorio. Estos son los citocromos de tipo *c*, estos citocromos son una extendida clase de proteínas esenciales para la vida de todos los organismos. En bacterias desnitrificantes estas proteínas están usualmente localizadas en el periplasma. La expresión de los citocromos en las células bacterianas aportan una mayor flexibilidad para adaptarse a los cambios medioambientales, esto se debe a que dichos citocromos son intermediarios en el transporte de electrones que permiten conectar procesos respiratorios como la oxidación de compuestos carbonados en condiciones aeróbicas y la reducción anaeróbica de nitrato, este mecanismo es posible mediante la extracción de electrones de las proteínas de membrana que intervienen en la respiración hasta el espacio periplásmico donde se encuentran las reductasas desnitrificantes, posibilitando de esta forma la obtención de energía ante la aparición de condiciones adversas.

Los citocromos *c* que intervienen en el proceso de desnitrificación son metaloproteínas transportadoras de electrones que contienen un grupo hemo *C* como grupo prostético, la biosíntesis de hemo *C* requiere la formación de enlaces covalentes tioéter entre sus 2 grupos vinilo laterales y 2 residuos de cisteína conservados en la apoproteína del citocromo, dichos enlaces covalentes posibilitan una fuerte unión del grupo hemo *C* a la proteína evitando la disociación del grupo hemo y su difusión a través de la pared celular (Wood *et al.*, 1983). Los diferentes tipos de citocromos se pueden distinguir espectroscópicamente, puesto que la forma reducida o ferrosa del grupo hemo origina 3 picos característicos de absorción en la región visible del espectro: α , β y γ , el último de los cuales sirve de referencia para distinguirlos. Así, los citocromos del tipo *c*, presentan un máximo de absorción entre 550 y 557 nm (ThönyMeyer 1997).

La nomenclatura de los citocromos se basa en el grupo hemo que portan, el cual se indica con la letra minúscula y en cursiva. En el caso de las oxidasas terminales, el grupo hemo que adopta la conformación de alto spin se suele distinguir con el subíndice

3 por analogía con la oxidasa mitocondrial *aa₃*. Algunos autores señalan la confusión generada por este sistema y recomiendan el empleo del símbolo prima (') para denotar el hemo pentacoordinado que reacciona con el oxígeno (Poole y Chance 1995).

En condiciones desnitrificantes *Bradyrhizobium japonicum* es una bacteria capaz de respirar el nitrato presente en el medio, en dicho proceso además de las reductasas encargadas de la reducción secuencial de nitrato se ha descrito la expresión de tres citocromos *c* solubles de localización periplásmica, *c₅₅₀*, *c₅₅₂* y *c₅₅₅*. La caracterización en profundidad del citocromo *c₅₅₀* ha demostrado su implicación como transportador electrónico intermediario entre el complejo de membrana *bc₁* y la nitrito reductasa periplásmica NirK (Bueno *et al.*, 2007). El uso de mutantes alteradas en el gen *cycA* cuyo producto es el citocromo *c₅₅₀* revelaron la vital importancia de dicho citocromo en la reducción de nitrito en la célula. En *Pseudomonas aeruginosa* los citocromos *c₅₅₁* (NirM) y NirC son donadores fisiológicos de electrones a la nitrito reductasa cd1NIR (Vijgenboom *et al.*, 1997; Hasegawa *et al.*, 2001), mutantes en dichos citocromos presentan un defecto en la actividad NIR in vitro e in vivo. En *R. capsulatus* se han identificado los citocromos *c₂* y *c_γ*, codificados por los genes *cycA* y *cycY* respectivamente. Estos citocromos fueron descritos inicialmente como transportadores de electrones intermediarios del proceso fotosintético y respiratorio (Jenney & Daldal 1993; Daldal *et al.*, 2001; Myllykallio *et al.*, 1999). Además, la ausencia de actividad nitrito reductasa (NiR) y la incapacidad para consumir el nitrito del medio observados en dobles mutantes defectuosas en los genes *cycA* y *cycY* sugirió que sus productos (*c₂* y *c_γ*) son efectivos donadores de electrones a la nitrito reductasa NirK del proceso de desnitrificación (Laratta *et al.*, 2006).

De forma similar en *Paracoccus denitrificans* se ha identificado el citocromo *c₅₅₀* como un eficiente donador de electrones a la nitrito reductasa cd₁-NIR, sin embargo la actividad NiR de células de *P. denitrificans* solo se vió atenuada tras la construcción de una doble mutante deficiente en las proteínas *c₅₅₀* y pseudoazurina, de esta forma se demostró la implicación de una proteína alternativa al citocromo *c₅₅₀* como intermediaria en el transporte de electrones entre el complejo de membrana *bc₁* a la nitrito reductasa cd₁-NIR (Pearson *et al.*, 2003). Las pseudoazurinas son proteínas periplásmicas de bajo peso molecular que contienen un solo átomo de cobre (Petratos *et*

al., 1987). Estudios bioquímicos han sugerido que las pseudoazurinas son un donadores directos a la nitrito reductasa (Kukimoto *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 1995; Koutny *et al.*, 1999). En algunas bacterias como *Chloroflexus auratiacus* (Driessche *et al.*, 1999), *Pseudomonas aeruginosa* (Norris *et al.*, 1983), *Alcaligenes faecalis* (Kukimoto *et al.*, 1996) y *Rhodobacter sphaeroides* (Jain *et al.*, 2001) también se ha demostrado la implicación de pseudoazurinas y de proteínas homologas a azurinas como transportadoras de electrones. Por lo tanto hay buenos ejemplos de organismos que son capaces de usar una proteína de cobre tipo I en vez de un citocromo de tipo *c* en la transferencia electrónica en los sistemas respiratorios, ampliándose de esta forma el número de componentes que intervienen en la conexión de las distintas redes respiratorias en las bacterias.

1.5. DESNITRIFICACIÓN EN EL ORDEN *Rhizobiales*.

Las bacterias del orden *Rhizobiales*, conocidas con el nombre genérico de rizobios, son bacterias del suelo, Gram-negativas, que se agrupan en los géneros *Rhizobium*, *Allorhizobium*, *Ensifer* (antes *Sinorhizobium*), *Mesorhizobium*, *Blastobacter*, *Azorhizobium*, *Devosia*, *Methylobacterium*, *Ochrobactrum* y *Bradyrhizobium* (Ramírez Baena, 2006). Todos ellos se caracterizan por su capacidad para infectar las células corticales de las raíces de las leguminosas y formar nódulos, estructuras típicas de la asociación simbiótica planta-bacteria, donde se lleva a cabo el proceso de fijación biológica del N₂, esto es, la reducción del N₂ a amonio. En el interior de los nódulos las bacterias se transforman en bacteroides, que son las células que sintetizan la enzima nitrogenasa, responsable de la catálisis del N₂. A partir del amonio formado se originan los productos orgánicos nitrogenados esenciales para la nutrición, funcionamiento y desarrollo de las plantas. La capacidad, por tanto, de estas bacterias para reducir N₂ en simbiosis es un proceso de enorme significación agrícola, ya que las plantas implicadas, las leguminosas, tienen una gran repercusión en la nutrición humana y animal como fuente de proteínas, obtención de aceite, fibras, etc.

Aunque en 1938 Rajagopalan observó la capacidad de los rizobios para desnitrificar, fue Evans, en 1954, el primero en demostrar la presencia de un sistema activo de reducción de nitrato en *B. japonicum*. Más tarde, Kennedy *et al.*, (1975) detectaron actividad

nitrato reductasa tanto en el citosol como en las membranas de *B. japonicum*. Sin embargo, la capacidad de desnitrificar no está muy extendida entre los rizobios, ya que sólo *B. japonicum* y *A. caulinodans* son los únicos capaces de crecer cuando se cultivan en condiciones limitantes de oxígeno y presencia de nitrato como aceptor final de electrones. Se ha sugerido que la capacidad de desnitrificar pudiera constituir una ventaja competitiva para la permanencia y distribución en el suelo y para la capacidad de colonización de aquellas bacterias que la posean.

Entre los rizobios, se han caracterizado genes que codifican enzimas de la desnitrificación en *R. sulae* (antes *R. hedysari*) (Toffanin *et al.*, 1996), *R. etli* (Bueno *et al.*, 2005), *S. meliloti* (Holloway *et al.*, 1996; Galibert *et al.*, 2001) y *B. japonicum* (Bedmar *et al.*, 2005). No se han identificado ninguno de los genes de la desnitrificación en *M. loti* strain MAFF 303090 (<http://www.kazusa.or.jp/rhizobase>).

R. sulae induce la formación de nódulos en simbiosis con *Hedysarum coronarium*. La cepa HCNT1 de *R. sulae* contiene una Cu-Nir codificada por el gen *nirK*. La expresión de este gen sólo requiere condiciones limitantes de oxígeno, y es independiente de la presencia de un óxido de nitrógeno (Casella *et al.*, 1986). La reducción de nitrito en esta bacteria produce una disminución en el crecimiento debido a la acumulación de NO, lo que sugiere que *R. sulae* HCNT1 no contiene ninguna enzima Nor (Casella *et al.*, 1986). No se detectaron señales de hibridación en el ADN total de la cepa HCNT1 cuando se utilizaron los genes *nor* como sonda de hibridación, lo que confirma que la cepa carece de dichos genes (Toffanin *et al.*, 1996). Mutantes en el gen *nirK* mantienen la capacidad de nodular y de fijar nitrógeno en simbiosis. Se ha sugerido que la enzima NirK estaría implicada en la transición de la bacteria a una forma viable, aunque no cultivable, en condiciones limitantes de oxígeno (Toffanin *et al.*, 2000), lo que le permitiría sobrevivir en condiciones de estrés (Casella *et al.*, 2006).

R. etli forma simbiosis fijadoras de nitrógeno con *Phaseolus vulgaris*. El análisis de la secuencia del genoma de *R. etli* CFN42 revela la existencia de los genes *norCBQD* y *nirK*, que codifican enzimas de tipo cNor y Cu-Nir, respectivamente (<http://www.kazusa.or.jp/rhizobase>). Esta cepa carece de los genes *nap* y *nos*, por lo que es incapaz de crecer en microaerobiosis con nitrato como único aceptor de electrones, y

carece de actividad nitrato reductasa (Bueno *et al.*, 2005). Sin embargo, *R. etli* CFN42 crece con nitrito como aceptor final de electrones, y una mutante en el gen *nirK* es incapaz de crecer en presencia de nitrito. Puesto que la mutante expresa una actividad Nir reducida y un consumo de nitrito disminuido, se ha propuesto que la enzima NirK pudiera estar implicada en la respiración y en la detoxificación del nitrito en *R. etli* (Bueno *et al.*, 2005).

En el genoma de *S. meliloti* 1021, concretamente en el plásmido simbiótico pSymA, se han localizado genes que presentan homología con los genes *nap*, *nir*, *nor* y *nos* de otras bacterias desnitrificantes (<http://www.kazusa.or.jp/rhizobase>). No obstante, *S. meliloti* 1021 no crece en microaerobiosis con nitrato o nitrito como aceptores finales de electrones. Mutantes en los genes *nos* forman simbiosis efectivas con *Medicago sativa*, lo que demostró, por primera vez, que la desnitrificación no es esencial para la fijación del nitrógeno en *S. meliloti* 1021 (Holloway *et al.*, 1996).

1.6. DESNITRIFICACIÓN EN *Bradyrhizobium japonicum*.

B. japonicum es el único rizobio donde, hasta la fecha, se han aislado y caracterizado los genes de la desnitrificación *napEDABC* (Delgado *et al.*, 2003), *nirK* (Velasco *et al.*, 2001), *norCBQD* (Mesa *et al.*, 2002) y *nosRZDFYLX* (Velasco *et al.*, 2004), implicados en la síntesis de las enzimas nitrato reductasa periplásmica (Nap), nitrito reductasa (Nir), óxido nítrico reductasa (Nor) y óxido nitroso reductasa (Nos), respectivamente (ver revisión de Bedmar *et al.*, 2005) (Fig. 1.13). También se ha identificado el gen *nnrR* cuyo producto, la proteína NnrR, regula la expresión de los genes *nir* y *nor* en respuesta al nitrato o a un óxido de nitrógeno derivado de él (Mesa *et al.*, 2003).

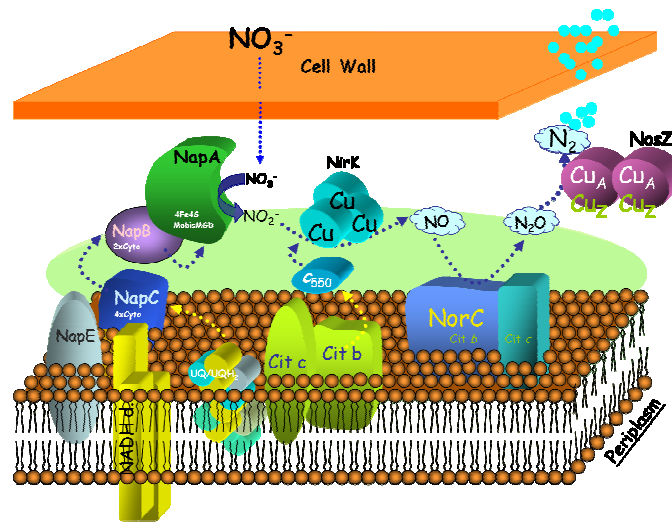


Figure 1.13. Localización de las proteínas implicadas en el proceso de la desnitrificación en *B. japonicum*.

1.6.1. Nitrato reductasa periplásmica.

En una serie de experimentos de secuenciación al azar de fragmentos de ADN capaces de codificar péptidos de localización periplásmica, se identificó una región del cromosoma de *B. japonicum* cuya secuencia presentaba homología con la de los genes *nap* de otros microorganismos. Así, se identificaron los genes *napE*, *napD*, *napA*, *napB* y *napC*, que codifican proteínas de 6.6, 11.8, 94.5, 16.9 y 23.9 kDa, respectivamente (Figura 1.14). De acuerdo con el análisis de las secuencias de aminoácidos deducidas de la secuencia de nucleótidos, NapA es la subunidad catalítica, que contiene un cofactor de molibdopterina y guanina y un centro [4Fe-4S], NapB es un citocromo con dos grupos hemo *c* que recibe electrones de NapC, un citocromo de membrana con cuatro grupos hemo *c*. NapE es una proteína transmembrana de función desconocida, y NapD es una proteína soluble que podría participar en la maduración del complejo NapAB (Delgado *et al.*, 2003).

La mutación en *napA* dio lugar a una cepa que carece de la proteína NapA; consecuentemente, la cepa no expresa actividad nitrato reductasa y es incapaz de crecer

microaeróbicamente con nitrato. Por tanto, la enzima nitrato reductasa periplásmica es la responsable del crecimiento de *B. japonicum* en condiciones desnitrificantes (Delgado *et al.*, 2003).

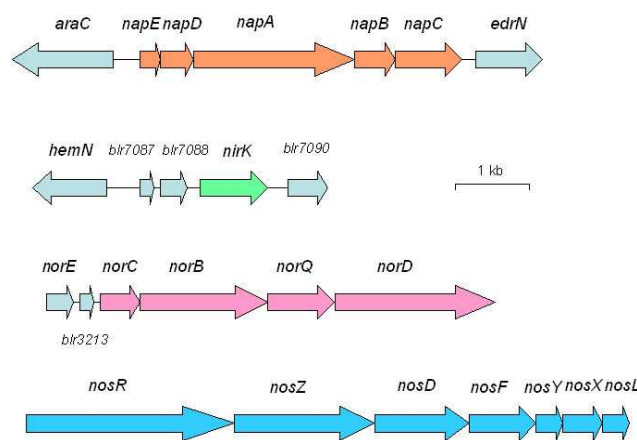


Figura 1.14. Organización de los genes *nap*, *nir*, *nor* y *nos* en *B. japonicum*. Junto a los nombres de los genes identificados, se incluyen los códigos de identificación de la Rhizobase.

1.6.2. Nitrito reductasa

En *B. japonicum* se ha identificado el gen *nirK* (Figura 1.14) que codifica una proteína de 34,4 kDa cuya identidad con otras nitrito reductasas de tipo Cu oscila entre el 78 % de *Alcaligenes faecalis* y el 68 % de *R. sphaeroides*. La secuencia en el extremo N-terminal posee el motivo (S/T) RRXFLK característico de metaloproteínas periplásmicas que se exportan mediante el sistema Tat. Una cepa deficiente en *nirK* es incapaz de crecer en microaerobiosis con nitrato, carece de actividad nitrito reductasa y acumula nitrito en el medio (Velasco *et al.*, 2001).

1.6.3. Óxido nítrico reductasa

Los genes *nor* de *B. japonicum* se identificaron mediante hibridación con los genes *norCB* de *P. denitrificans*. La posterior secuenciación del ADN correspondiente mostró que se organizan en los genes *norCBQD* (Figura 1.14), que codifican proteínas de 17, 40.5, 28.8 y 70 kDa, respectivamente. La secuencia primaria de NorC y NorB tienen entre el 49 y el 85 % de identidad con las secuencias de las enzimas Nor de *P. stutzeri*,

P. aeruginosa, *P. denitrificans*, *R. sphaeroides*, *Pseudomonas* sp. G-179 y *A. faecalis*. NorC es un citocromo *c* asociado a membrana, capaz de unirse a la proteína NorB que, a su vez, es homóloga a la subunidad I (FixN) de la oxidasa terminal *cbb₃* de distintas bacterias. Los productos de los genes *norQ* y *norD* tienen funciones desconocidas, aunque se han implicado en el ensamblaje y maduración de la enzima (Mesa *et al.*, 2002). La inactivación de uno de los genes *norC* o *norB* dio lugar a cepas mutantes incapaces de crecer en microaerobiosis con nitrato como fuente de energía. El análisis de grupos hemo *c* mediante detección de su actividad peroxidasa intrínseca reveló la ausencia de una proteína de 17 kDa en las membranas de la cepa mutante *norC* (Mesa *et al.*, 2002).

1.6.4. Óxido nítrico reductasa

Los genes *nos* de *B. japonicum* se identificaron mediante hibridación de su ADN genómico con el gen *nosZ* de *P. stutzeri*. El aislamiento y secuenciación de la región de ADN que mostraba hibridación con la sonda permitió establecer la existencia de siete marcos abiertos de lectura, que se identificaron como los genes *nosRZDFYLX* (Figura 1.14). Los genes *nosR*, *nosZ*, *nosD*, *nosF*, *nosY*, *nosL* y *nosX* codifican proteínas de 85, 72, 49, 33, 28, 19 y 38.5 kDa, respectivamente. La secuencia primaria de NosZ tiene entre un 50% y un 77 % de identidad con las secuencias NosZ de otros organismos desnitrificantes, entre ellos *P. stutzeri*, *R. eutropha*, *P. denitrificans*, *S. meliloti*, *A. cycloclastes* y *P. fluorescens*. NosZ contiene dos centros de cobre, Cu_A y Cu_Z, de los que el último actúa como centro catalítico. Las proteínas NosDFY constituyen un transportador de tipo ABC que cataliza el transporte de Cu al interior celular. NosL se ha identificado como una chaperona. NosX posee en su extremo N-terminal un motivo de argininas que sugiere que NosX puede plegarse en el citoplasma y adquirir sus cofactores antes de su transporte al periplasma. El gen *nosR* codifica una proteína reguladora con seis regiones transmembrana en cuyo extremo C-terminal se localizan dos agrupaciones de cisteínas, similares a las de algunas ferredoxinas bacterianas que se unen a centros de tipo [4Fe-4S] (Velasco *et al.*, 2004).

Las cepas de *B. japonicum* mutadas en los genes *nosR* y *nosZ* crecen de manera similar a la cepa parental cuando se cultivan en condiciones desnitrificantes. Es posible que el ATP necesario para el crecimiento de las células se obtenga durante el proceso de

reducción del nitrato. Sin embargo, la enzima óxido nitroso reductasa no fue activa en las cepas mutadas, ya que se acumuló óxido nitroso cuando las células se cultivaron microaeróbicamente con nitrato (Velasco *et al.*, 2004).

La secuenciación del genoma de *B. japonicum* (<http://www.kazusa.or.jp/rhizobase/>) ha permitido confirmar los datos previos obtenidos sobre los genes de la desnitrificación, y comprobar la ausencia de secuencias homólogas a las de los genes *nar*. En *B. japonicum*, por tanto, la Nap es la única enzima responsable de la respiración del nitrato y la que inicia la desnitrificación en esta bacteria (Delgado *et al.*, 2003).

1.6.5. Regulación de la desnitrificación en *B. japonicum*

Como en muchos otros desnitrificantes, la expresión de los genes de la desnitrificación ocurre en condiciones limitantes de oxígeno y presencia de nitrato, o un óxido de nitrógeno derivado de él (ver revisión de Bedmar *et al.*, 2005). Además, los genes *napEDABC* requieren, molibdeno para su expresión (Bonnard *et al.*, 2005).

16.5.1. Regulación por microaerobiosis

Las cepas de *B. japonicum* con mutaciones en los genes *fixL*, *fixJ* y *fixK₂* son incapaces de crecer aneróbicamente con nitrato, por lo que se sugirió que, de alguna manera, el sistema FixLJ/FixK₂ estaría implicado en la regulación de la expresión de algunos de los genes, o de todo el proceso, de la desnitrificación (Anthamatten y Hennecke, 1991; Nellen-Anthamatten *et al.*, 1998; Mesa *et al.*, 2002). Posteriormente, la utilización de fusiones transcripcionales entre las regiones promotoras de cada uno de los genes *nir*, *nor* y *nos* y el gen informador *lacZ* ha demostrado que la expresión microaeróbica de tales genes depende del sistema regulador FixLJ-FixK₂ (Velasco *et al.*, 2001, 2004; Mesa *et al.*, 2002; Delgado *et al.*, 2003; Bedmar *et al.*, 2005) (ver capítulo 1.3.1):

En la región promotora de todos los genes de la desnitrificación de *B. japonicum* regulados por FixK₂ se han localizado secuencias homólogas a la de la caja FixK (5'-

TTGAT-N₄-GTCAA- 3'), a las que podría unirse para activar la transcripción (Tabla 1.1).

1.6.5.2. Regulación por óxidos de nitrógeno

En *B. japonicum* se ha identificado el gen *nnrR*, de 710 pares de bases cuyo producto, la proteína NnrR de 236 aminoácidos, comparte del 47% al 78 % de identidad con otros reguladores transcripcionales de la familia Fnr/Crp (Mesa *et al.*,2003). NnrR carece de los motivo de cisteínas y presenta en su dominio C-terminal el motivo HXXSR de unión a ADN, por lo que se incluye en el grupo NnrR de la familia Fnr/Crp. Una cepa mutante en *nnrR* es incapaz de crecer en microaerobiosis con nitrato como aceptor final de electrones, y carece de actividad nitrato y nitrito reductasa (Mesa *et al.*,2003).

La expresión de *nnrR* está controlada por FixK₂, y en su región promotora se encuentra una secuencia de tipo FixK (Tabla 1.1). Mientras que la activación microaeróbica de una fusión traduccional entre *nnrR* y *lacZ* requiere las proteínas FixLJ y FixK₂, la inducción de los genes *nir* y *nor* mediada por óxidos de nitrógeno requiere NnrR (Mesa *et al.*,2003). Se ha propuesto, por tanto, que NnrR constituye un sistema adicional de control de la desnitrificación, de manera que, en *B. japonicum*, el proceso estaría controlado por una cascada de regulación formada por el sistema FixLJ-FixK₂ (Fig. 1.15) (Mesa *et al.*,2003).

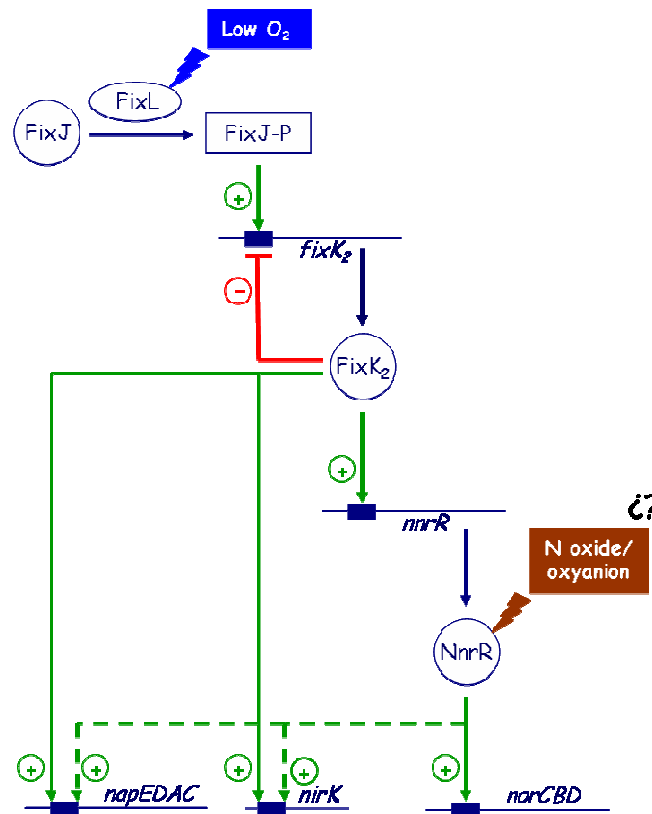


Figura 1.15. Sistema FixLJ/FixK₂/NnrR de *B. japonicum* (Adaptado de Mesa *et al.*, 2003). NO_x: óxidos de nitrógeno.

1.7. OBJETIVOS

Durante el trabajo de investigación realizado en el Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín, CSIC, sobre metabolismo anaerobio del nitrato en *Bradyrhizobium japonicum* se han aislado y caracterizado los genes *napEDABC*, *nirK*, *norCBQD* y *nosRZDFYLX*, cuyos productos se han identificado como las enzimas nitrato reductasa periplásmica, nitrito reductasa, óxido nítrico reductasa y óxido nitroso reductasa, respectivamente. Estas enzimas llevan a cabo, de modo secuencial, la reducción del nitrato a dinitrógeno molecular, proceso conocido como desnitrificación. Sin embargo, se desconocía la implicación de otras proteínas que pudieran intervenir como intermediarios en el transporte electrónico asociado al proceso de desnitrificación. Desde 1991, se conocía la existencia en *B. japonicum* de tres citocromos solubles de bajo peso molecular, *c₅₅₀*, *c₅₅₂*, y *c₅₅₅*, los cuales son codificados por los genes *cycA*, *cycB* and *cycC*, respectivamente, sin

embargo su función era desconocida. En el caso concreto del citocromo *c*₅₅₀, se había sugerido que pudiera estar implicado en la respiración de nitrato, pero se desconocía su papel en dicho proceso.

Los estudios de regulación de la desnitrificación llevados a cabo en *B. japonicum* han demostrado que la expresión en microaerobiosis de los genes *napEDABC*, *nirK*, *norCBQD* y *nosRZDEFLXY* está controlada por el sistema regulador de dos componentes FixLJ y el activador transcripcional FixK₂. El papel de la proteína reguladora FixK₂ en el control de los genes de la desnitrificación se había demostrado en estudios de expresión génica *in vivo*, mediante el uso de fusiones transcripcionales. Sin embargo, el control directo de esta proteína sobre la activación de estos genes no se había demostrado. En *B. japonicum*, además de la cascada regulatoria FixLJ/K₂, se ha descrito otra cascada de respuesta a oxígeno, el sistema RegRS/NifA. Sin embargo, al inicio de este trabajo de investigación se desconocía la posible implicación de esta cascada en la expresión de los genes de la desnitrificación en respuesta a condiciones limitantes de oxígeno.

De acuerdo con lo expuesto, se han planteado los siguientes objetivos:

- 1.- Implicación del citocromo *c*₅₅₀ de *B. japonicum* en el proceso de desnitrificación.
- 2.- Implicación de la proteína reguladora NifA de *B. japonicum* en la expresión de los genes de la desnitrificación.
- 3.- Activación de la transcripción *in vitro* de los genes de la desnitrificación mediada por la proteína FixK₂.

1.8. BIBLIOGRAFÍA.

Abraham Zelda, H.L., Lowe David, J., and Smith Barry, E. 1993. Purification and characterization of the dissimilatory nitrite reductase from *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* (N.C.I.M.B. 11015): Evidence for the presence of both type 1 and type 2 copper centres. *Biochem J* 295: 587-593.

Alvarez-Morales, A., M. Betancourt-Alvarez, K. Kaluza, and H. Hennecke. 1986. Activation of the *Bradyrhizobium japonicum nifH* and *nifDK* operons is dependent on promoter-upstream DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 14:4207-4227.

Anthamatten, D., Sherb, B. y Hennecke, H. 1992. Characterization of a *fixLJ*-regulated *Bradyrhizobium japonicum* gene sharing similarity with the *Escherichia coli fnr* and *Rhizobium meliloti fixK* genes. *J. Bacteriol.* 174:2111-2120.

Batut, J., Daveran-Mingot, M.L, David, M., Jacobs, J.; Garnerone, A.M. Y Kahn, D. 1989. *fixk*, a gene homologous with *fnr* and *crp* from *Escherichia coli*, regulates nitrogen fixation genes both positively and negatively in *Rhizobium meliloti*. *The EMBO J.* 8:1279-1289.

Bauer, E., T. Kaspar, H. M. Fischer, and H. Hennecke. 1998. Expression of the *fixR-nifA* operon in *Bradyrhizobium japonicum* depends on a new response regulator, RegR. *J. Bacteriol.* 180:3853–3863.

Bennett, L. T., F. C. Cannon, and D. Dean. 1988. Nucleotide sequence and mutagenesis of the *nifA* gene from *Azotobacter vinelandii*. *Mol. Microbiol.* 2:315-321.

Besson, S., Carneiro, C., Moura, J.J.G., Moura, I., and Fauque, G. (1995) A cytochrome *cd(1)*-type nitrite reductase isolated from the marine denitrifier *Pseudomonas nautica* 617: Purification and characterization. *Anaerobe* 1: 219-226.

Bott, M., Ritz, D. y Hennecke, H. 1991. The *Bradyrhizobium japonicum* *cycM* gene encodes a membrane-anchored homolog of mitochondrial cytochrome *c*. J. Bacteriol. 173:6766-6772.

Bott, M., Bolliger, M. y Hennecke, H. 1990. genetic analysis of the cytochrome *c-aa₃* branch of the *Bradyrhizobium japonicum* respiratory chain. Mol. Microbiol. 4:2147-2157.

Bott, M., Preisig, O. y Hennecke, H. 1992. Genes for a second terminal oxidase in *Bradyrhizobium japonicum*. Arch. Microbiol. 158:335-343.

Bott, M., Thöny-Meyer, L., Loferer, H., Rossbach, S., Tully, R.E., Keister, D., Appleby, C.A. y Hennecke, H. 1995. *Bradyrhizobium japonicum* cytochromes *c₅₅₀* is required for nitrate respiration but not for symbiotic nitrogen fixation. J. Bacteriol. 177:2214-2217.

Buchanan-Wollaston, V., M. C. Cannon, J. L. Beynon, and F. C. Cannon. 1981. Role of the *nifA* gene product in the regulation of *nif* expression in *Klebsiella pneumoniae*. Nature (London) 294: 776-778.

Buck, M., S. Miller, M. Drummond, and R. Dixon. 1986. Upstream activator sequences are present in the promoters of nitrogen fixation genes. Nature (London) 320:374-378.

Buck, M., W. Cannon, and J. Woodcock. 1987. Mutational analysis of upstream sequences required for transcriptional activation of the *Klebsiella pneumoniae* *nifH* promoter. Nucleic Acids Res. 15:9945-9956.

Buck, M., W. Cannon, and J. Woodcock. 1987. Transcriptional activation of the *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase promoter may involve DNA loop formation. Mol. Microbiol. 1:243-249.

Buikema, W. J., J. A. Klingensmith, S. L. Gibbons, and F. M. Ausubel. 1987. Conservation of structure and location of *Rhizobium meliloti* and *Klebsiella pneumoniae* *nifB* genes. J. Bacteriol. 169:1120-1126.

Buikema, W. J., W. W. Szeto, P. V. Lemley, W. H. Orme-Johnson, and F. M. Ausubel. 1985. Nitrogen fixation specific regulatory genes of *Klebsiella pneumoniae* and

Rhizobium meliloti share homology with the general nitrogen regulatory gene *ntrC* of *K. pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* 13:4539-4555.

Chauhan, S., and M. R. O'Brian. 1997. Transcriptional regulation of aminolevulinic acid dehydratase synthesis by oxygen in *Bradyrhizobium japonicum* and evidence for developmental control of the *hemB* gene. *J. Bacteriol.* 179:3706–3710.

Chen, J.-Y., Chang, W.-C., Chang, T., Chang, W.-C., Liu, M.-Y., Payne, W., J., and Legall, J. (1996) Cloning, characterization, and expression of the nitric oxide-generating nitrite reductase and of the blue copper protein genes of *Achromobacter cycloclastes*. *Biochem Biophys Res Commun* 219: 423-428.

Comolli, J. C., and Donohue, T. J. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* RoxR, a response regulator related to *Rhodobacter sphaeroides* PrrA, activates expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase. *Mol. Microbiol.* 45: 755–768.

Cosseau C., Batut J. 2004. Genomics of the *ccoNOQP*-encoded *cbb₃* oxidase complex in bacteria *Arch Microbiol.* 181: 89–96.

Coyne, M.S., Arunakumari, A., Averill, B.A., and Tiedje, J.A. (1989) Immunological identification and distribution of dissimilatory haem *cd₁* and nonhaem copper nitrite reductases in denitrifying bacteria. *App Env Microbiol* 55: 2924-2931.

Daldal, F., Mandaci, S., Winerstein, C., Myllykallio, H., Duyck, K. & Zannoni, D. 2001. Mobile cytochrome *c₂* and membrane-anchored cytochrome *c_v* are both efficient electron donors to the *cbb₃* and *aa₃* type cytochrome c oxidases during respiratory growth of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* 183, 2013–2024.

Danneberg, G., Zimmer, W., and Bothe, H. (1986) Aspects of nitrogen fixation and denitrification by *Azospirillum*. *Plant Soil* 90: 193-202.

Delgado, M.J., Bedmar, E.J. y Downie, J.A. 1998. Genes involved in the formation and assembly of rhizobial cytochromes and their role in symbiotic nitrogen fixation. *Advances in Microbial Physiology* 40:193-223.

Denariáz, G., Payne, W.J., and LeGall, J. (1991) The denitrifying nitrite reductase of *Bacillus halodenitrificans*. *Biochim Biophys Acta* 1056: 225-232.

Doi, M.Y., Shioi, Y., Morita, K., and Takamiya, K. (1989) Two types of cytochrome *cd₁* in the aerobic photosynthetic bacterium *Erythrobacter* sp. Och 114. *European Journal of Biochemistry* 184: 521-527.

Drummond, M., P. Whitty, and J. Wootton. 1986. Sequence and domain relationships of *ntrC* and *nifA* from *Klebsiella pneumoniae*: homologies to other regulatory proteins. *EMBO J.* 5:441-447.

Durmowicz, M. C., and R. J. Maier. 1998. The *fixK₂* gene is involved in regulation of symbiotic hydrogenase expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 180:3253–3256.

Enderson, F.F., Kumar, S., Adman, E.T., Liu, M.Y., Payne, W.J., and Legall, J. (1991) Amino acid sequence of nitrite reductase - A copper protein from *Achromobacter cycloclastes*. *Biochemistry* 30: 7180-7185.

Evans, D. 1987. The molecular genetics of nitrogen fixation in *Azotobacter chroococcum*, Ph.D. thesis. University of Sussex, Brighton, England.

Evans, D., R. Jones, P. Woodley, and R. Robson. 1988. Further analysis of nitrogen fixation (*nif*) genes in *Azotobacter chroococcum*: identification and expression in *Klebsiella pneumoniae* of *nifS*, *nifV*, *nifM* and *nifB* genes and localization of *nifEiN*-, *nifU*-, *nifA*- and *fixABC*-like genes. *J. Gen. Microbiol.* 134:931-942.

Evelin Bauer, Thomas Kaspar, Hans-Martin Fischer, and Hauke Hennecke *Journal of Bacteriology*. 1998, p. 3853–3863, Expression of the *fixR-nifA* operon in *Bradyrhizobium japonicum* depends on a new response regulator, RegR.

Fischer, H. M., and H. Hennecke. 1987. Direct response of *Bradyrhizobium japonicum* *nifA*-mediated *nif* gene regulation to cellular oxygen status. *Mol. Gen. Genet.* 209:621–626.

Fischer, H. M., L. Velasco, M. J. Delgado, E. J. Bedmar, S. Schaaren, D. Zingg, M. Göttfert, and H. Hennecke. 2001. One of two *hemN* genes in *Bradyrhizobium japonicum* is functional during anaerobic growth and in symbiosis. *J. Bacteriol.* 183:1300–1311.

Fischer, H. M., S. Fritsche, B. Herzog, and H. Hennecke. 1989. Critical spacing between two essential cysteine residues in the interdomain linker of the *Bradyrhizobium japonicum* NifA protein. *FEBS Lett.* 255:167–171.

Fischer, H.M. 1994. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol. Rev.* 58:352–386.

García-Horsman, J.A., Barquera, B., Rumbley, J., Ma, J. y Gennis, R. B. 1994. The superfamily of heme-copper respiratory oxidases. *J. Bacteriology.* 176:5587-5600.

Glockner, A.B., Jüngst, A., and Zumft, W.G. (1993) Copper-containing nitrite reductase from *Pseudomonas aureofaciens* is functional in a cytochrome *cd₁*-free background (*nirS*) of *Pseudomonas stutzeri*. *Arch Microbiol* 160: 18-26.

Gronger, P., S. S. Manian, H. Reilander, M. O'Connell, U. B. Priefer, and A. Piehler. 1987. Organisation and partial sequence of a DNA region of the *Rhizobium leguminosarum* symbiotic plasmid pRL6JI containing the genes *fixABC*, *nifA*, *nifB* and a novel open reading frame. *Nucleic Acids Res.* 15:31-49.

Hennecke, H. 1998. Rhizobial respiration to support symbiotic nitrogen fixation for the 21st Century. C. Elmerich *et al.*,(eds.), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 429-434.

Hoehn, G.T.and Clark, V.L. (1992) Isolation and nucleotide sequence of the gene (*aniA*) encoding the major anaerobically induced outer membrane protein of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* 60: 4695-703.

Householder, T.C., Belli, W.A., Lissenden, S., Cole, J.A., and Clark, V.L. (1999) cis- and trans-acting elements involved in regulation of *aniA*, the gene encoding the major anaerobically induced outer membrane protein in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* 181: 541-51.

Hunt, S. y layell, D. B. 1993. Gas exchange of legume nodules and the regulation of nitrogenase activity. *Annu. Rev. plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44:483-511.

Iwasaki, H. and Matsubara, T. (1971) Cytochrome *c*₅₅₇ (551) and cytochrome *cd* of *Alcaligenes faecalis*. *J Biochem* 69: 847-857.

Iwata S., Ostermeier, C., Ludwig, B. y Michel, H. 1995. Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature* 376: 660-669.

Jain R.. y Shapleigh P. 2001. Characterization of *nirV* and a gene encoding a novel pseudoazurin in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3. *Microbiology* 147: 2505–2515.

Jenney, F. E. & Daldal, F. (1993). A novel membrane-associated c-type cytochrome, cyt cY can mediate the photosynthetic growth of *Rhodobacter capsulatus* and *Rhodobacter sphaeroides*. *EMBO J* 12, 1283–1292.

Keefe, R. G. y Maier, R. J. 1993. purification and characterization of an O₂-utilizing cytochrome-*c* oxidase complex from *Bradyrhizobium japonicum* bacteroid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1183:91-104.

Kim, Y. M., K. J. Ahn, T. Beppu, and T. Uozomi. 1986. Nucleotide sequence of the *nifLA* operon of *Klebsiella oxytoca* NG13 and characterisation of the gene products. *Mol. Gen. Genet.* 205:253-259.

Koutny, M. and Kucera, I. 1999. Kinetic analysis of substrate inhibition in nitric oxide reductase of *Paracoccus denitrificans*. *Biochem Biophys Res Commun* 262: 562-4.

Kukimoto, M., Nishiyama, M., Murphy, M.E.P., Turley, S., Adman, E.T., Horinouchi, S., and Beppu, T. 1994. X-Ray structure and site-directed mutagenesis of a nitrite reductase from *Alcaligenes faecalis* S-6. Roles of two copper atoms in nitrite reduction. *Biochemistry* 33: 5246-5252.

Kukimoto, M., Nishiyama, M., Tanokura, M., Adman, E. T. & Horinouchi, S. 1996. Studies on protein-protein interaction between copper-containing nitrite reductase and pseudoazurin from *Alcaligenes faecalis* S-6. *J Biol Chem* 271, 13680-13683.

Kullik, I., H. Hennecke, and H. M. Fischer. 1989. Inhibition of *Bradyrhizobium japonicum* *nifA*-dependent *nif* gene activation by oxygen occurs at the NifA protein level and is irreversible. *Arch. Microbiol.* 151:191–197.

Kullik, I., S. Fritsche, H. Knobel, J. Sanjuan, H. Hennecke, and H. M. Fischer. 1991. *Bradyrhizobium japonicum* has two differentially regulated, functional homologs of the σ 54 gene (*rpoN*). *J. Bacteriol.* 173:1125–1138.

LeGall, J., Payne, W.J., Morgan, V., and DerVartanian, D. 1979. On the Purification of Nitrite Reductase from *Thiobacillus denitrificans* and its Reaction with Nitrite Under Reducing Conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 87: 355-362.

Liang, Y. Y., P. A. Kaminski, and C. Elmerich. 1991. Identification of a *nifA*-like regulatory gene of *Azospirillum brasilense* Sp7 expressed under conditions of nitrogen fixation and in the presence of air and ammonia. *Mol. Microbiol.* 5:2735-2744.

Mancinelli, R.L., Cronin, S., and Hochstein, L.I. 1986. The purification and properties of a *cd*-type nitrite reductase from *Paracoccus halodenitrificans*. *Arch Microbiol* 145: 202-208.

Mandon, K., Kaminski, P.A. y Elmerich, C. 1994. functional analysis of the *fixNOQP* region of *Azorhizobium caulinodans*. *J. Bacteriol.* 174:2560-2568.

Mellies, J., Jose, J., and Meyer, T.F. (1997) The *Neisseria gonorrhoeae* gene *aniA* encodes an inducible nitrite reductase. *Mol Gen Genet* 256: 525-532.

Mesa, S., E. J. Bedmar, A. Chanfon, H. Hennecke, and H. M. Fischer. 2003. *Bradyrhizobium japonicum* NnrR, a denitrification regulator, expands the FixLJ-FixK₂ regulatory cascade. *J. Bacteriol.* 185:3978–3982.

Moir, J.W.B., Baratta, D., Richardson, D.J., and Ferguson, S.J. 1993. The purification of a *cd-1*-type nitrite reductase from, and the absence of a copper-type nitrite reductase from, the aerobic denitrifier *Thiosphaera pantotropha*: The role of pseudoazurin as an electron donor. *Eur J of Biochem* 212: 377-385.

Moir, J.W.B. and Ferguson, S.J. 1994. Properties of a *Paracoccus denitrificans* mutant deleted in cytochrome *c*₅₅₀ indicate that a copper protein can substitute for this cytochrome in electron transport to nitrite, nitric oxide and nitrous oxide. *Microbiology-UK* 140: 389-397.

Morett, E., and L. Segovia. 1993. The sigma 54 bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains. *J. Bacteriol.* 175:6067–6074.

Morett, E., and M. Buck. 1988. NifA-dependent in vivo protection demonstrates that the upstream activator sequence of *nif* promoters is a protein binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:9401-9405.

Morett, E., H. M. Fischer, and H. Hennecke. 1991. Influence of oxygen on DNA binding, positive control, and stability of the *Bradyrhizobium japonicum* NifA regulatory protein. *J. Bacteriol.* 173:3478-3487.

Mouncey, N.J. y Kaplan, S. 1998. Oxygen regulation of the *ccoN* gene encoding a component of the *cbb*₃ oxidase in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1.: Involvement of the FnrL protein. *J. Bacteriol.* 180:2228-2231.

Myllykallio, H., Zannoni, D. & Daldal, F. 1999. The membrane-attached electron carrier cytochrome *cy* from *Rhodobacter sphaeroides* is functional in respiratory but not in photosynthetic electron transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4348–4353.

Nees, D. W., P. A. Stein, and R. A. Ludwig. 1988. The *Azorhizobium caulinodans nifA* gene: identification of upstream-activating sequences including a new element, the “anaerobox.” *Nucleic Acids Res.* 16:9839-9853.

Nellen-Anthamatten, D., P. Rossi, O. Preisig, I. Kullik, M. Babst, H. M. Fischer, and H. Hennecke. 1998. *Bradyrhizobium japonicum* FixK₂, a crucial distributor in the FixLJ-dependent regulatory cascade for control of genes inducible by low oxygen levels. *J. Bacteriol.* 180:5251–5.

Norris G.E., Anderson B.F., Baker E.N. 1983. Structure of azurin from *Alcaligenes denitrificans* at 2.5 Å resolution. *J Mol Biol.*; 165:501-21.

O’Brian, M.R. y Maier, R.J. 1987. Isolation of a cytochrome *aa₃* gene from *Bradyrhizobium japonicum*. *Proc. Natl. Acad. USA* 84:3219-3223. Gabel, C. y Maier, R.J. 1990. Nucleotide sequence of the *coxA* gene encoding subunit I of cytochrome *aa₃* of *Bradyrhizobium japonicum*. *Nucleic Acids Res.* 18:6143.

Oh, J. I., and S. Kaplan. 2000. Redox signaling: globalization of gene expression. *EMBO J.* 19:4237–4247.

Olesen, K., Veselov, A., Zhao, Y., Wang, Y., Danner, B., Scholes, C., P., and Shapleigh, J., P. (1998) Spectroscopic, kinetic, and electrochemical characterization of heterologously expressed wild-type and mutant forms of copper-containing nitrite reductase from *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3. *Biochemistry* 37: 6086-6094.

Page, K. M., and M. L. Guerinot. 1995. Oxygen control of the *Bradyrhizobium japonicum hemA* gene. *J. Bacteriol.* 177:3979–3984.

Petratos, K., Banner, D. W., Beppu, T., Wilson, K. S. & Tsernoglou, D. (1987). The crystal structure of pseudoazurin from *Alcaligenes faecalis* S-6 determined at 2.9 Å resolution. *FEBS Lett* 218:209-214.

Poole, R. K. y Chance, B. 1995. oxidases names: to '3' or not to '3'? *Microbiology* 141:752-753.

Preisig, O., Anthamatten, D. y Hennecke, H. 1993. Genes for a microaerobically induced oxidase complex in *Bradyrhizobium japonicum* are essential for a nitrogen-fixing endosymbiosis. *Proc. Natl. acad. Sci. USA* 90:3309-3313.

Preisig, O., Zufferey, R., Thöny-Meyer, L., Appleby, C.A. y Hennecke, H. 1996a. A high-affinity *cbb₃*-type cytochrome oxidase terminates the symbiosis-specific respiratory chain of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 178:1532-1538.

Preisig, O., Zufferey, R., Thöny-Meyer, y Hennecke, H. 1996b. The *Bradyrhizobium japonicum fixGHIS* genes are required for the formation of the high-affinity *cbb₃*-type oxidase. *Arch. Microbiol.* 165:297-305.

Prudencio, M., Eady, R., R., and Sawers, G. (1999) The blue copper-containing nitrite reductase from *Alcaligenes xylosoxidans*: Cloning of the *nirK* gene and characterization of the recombinant enzyme. *J Bacteriol* 181: 2323-2329.

Rey, F. E., Oda, Y. and Harwood, C. S. 2006. Regulation of uptake hydrogenase and effects of hydrogen utilization on gene expression in *Rhodopseudomonas palustris*. *J. Bacteriol.* 188: 6143–6152.

Roelvink, P. W., J. G. J. Hontelez, A. van Kammen, and R. C. van den Bos. 1989. Nucleotide sequence of the regulatory *nifA* gene of *Rhizobium leguminosarum* PRE: transcriptional control sites and expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 3:1441-1447.

- Sann, R., Kostka, S., and Friedrich, B. 1994. A cytochrome cd(1)-type nitrite reductase mediates the first step of denitrification in *Alcaligenes eutrophus*. *Arch Microbiol* 161: 453-459.
- Sawada, E. and Satoh, T. (1980) Periplasmic location of dissimilatory nitrate and nitrite reductases in a denitrifying phototrophic bacterium, *Rhodospseudomonas sphaeroides* forma sp. *denitrificans*. *Plant Cell Physiol* 21: 205-210.
- Shoun, H., Kano, M., Baba, I., Takaya, N., and Matsuo, M. (1998) Denitrification of actinomycetes and purification of dissimilatory nitrite reductase and azurin from *Streptomyces thioluteus*. *J Bacteriol* 180: 4413-4415.
- Studholme, D. J., and R. Dixon. 2003. Domain architectures of σ^{54} -dependent transcriptional activators. *J. Bacteriol.* 185:1757–1767.
- Surpin M.A., Lubben, M. y Maier, R.J. 1996. the *Bradyrhizobium japonicum* *coxWXYZ* gene cluster encodes a *bb*₃-type ubiquinol oxidase. *Gene* 183:201-206.
- Surpin M.A., Moshiri, F., Murphy, A.M. y Maier, R.J. 1994. Genetic evidence for a fourth terminal oxidase in *Bradyrhizobium japonicum*. *Gene* 143:73-77.
- Suzuki, E., Horikoshi, N., and Kohzuma, T. (1999) Cloning, sequencing, and transcriptional studies of the gene encoding copper-containing nitrite reductase from *Alcaligenes xylosoxidans* NCIMB 11015. *Biochem Biophys Res Commun* 255: 427-31.
- Swem, L. R., S. Elsen, T. H. Bird, D. L. Swem, H. G. Koch, H. Myllykallio, F. Daldal, and C. E. Bauer. 2001. The RegB/RegA two-component regulatory system controls synthesis of photosynthesis and respiratory electron transfer components in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Mol. Biol.* 309:121–138.
- Thony, B., H. M. Fischer, D. Anthamatten, T. Bruderer, and H. Hennecke. 1987. The symbiotic nitrogen fixation regulatory operon (*fixRnifA*) of *Bradyrhizobium japonicum* is expressed aerobically and is subject to a novel, *nifA*-independent type of activation. *Nucleic Acids Res.* 15:8479-8499.

Thöny-Meyer, L., 1997. Biogenesis of respiratory cytochromes in bacteria. *Microbial. Mol. Biol. Rev.* 61:337-376.

Thöny-Meyer, L., Beck, C., Preisig, O. y Hennecke, H. 1994a. The *ccoNOQP* gene cluster codes for a *cb*-type cytochrome oxidase that functions in aerobic respiration of *Rhodobacter capsulatus*. *Mol. Microbiol.* 14:705-716.

Thöny-Meyer, L., James, P. y Hennecke, H. 1991. From one gene to two proteins: the biosynthesis of cytochromes *b* and *c*₁ in *Bradyrhizobium japonicum*. *Proc. Natl. acad. Sci. USA* 88:5001-5005.

Thöny-Meyer, L., Ritz, D. y Hennecke, H. 1994b. Cytochrome *c* biogenesis in bacteria: a possible pathway begins to emerge. *Mol. Microbiol.* 12:1-9.

Thöny-Meyer, L., Stax, D. y Hennecke, H. 1989. an unusual gene cluster for the cytochrome *bc*₁ complex in *Bradyrhizobium japonicum* and its requirement for effective root nodule symbiosis. *Cell* 57:683-697.

Thöny-Meyer, L., y Künzler, P. 1997. Translocation to the periplasm and signal sequence cleavage of preapocytochrome *c* depend on *sec* and *lep*, but not on the *ccm* gene products. *Eur. J. biochem.* 246:794-799.

Thöny-Meyer, L., Fixher, F., Kunzler, P., Ritz, D. y Hennecke, H. 1995. *Escherichia coli* genes required for cytochrome *c* maturation. *J. Bacteriol.* 177:4321-4326.

Timkovich, R., Dhesi, R., Martinkus, K.J., Robinson, M.K., and Rea, T.M. (1982) Isolation of *Paracoccus denitrificans* Cytochrome *cd*₁ : Comparative Kinetics with Other Nitrite Reductases. *Arch Biochem Biophys* 215: 47-58.

Tosques Vvan, E., Kwiatkowski, A.V., Shi, J., and Shapleigh, J., P. (1997) Characterization and regulation of the gene encoding nitrite reductase in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3. *J Bacteriol* 179: 1090-1095.

Van der Ost, J., de Boer, A.P.N., de Gier, J. W. L., Zumft, W. G., Stouthamer, A.H. y Van spanning, R.J.M. 1994. The heme-copper oxidase family consists of three distinct types of terminal oxidases and is related to nitric oxide reductase. *FEMS Microbiol. Letters* 121:1-10.

Van Driessche G., Hu W., Van de Werken G., Selvaraj F., McManus J. D., Blankenship R. E., and Van Beeumen J. J. 1999. Auracyanin A from the thermophilic green gliding photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus* represents an unusual class of small blue copper proteins. *Protein Sci.* 8:947–957.

Van Spanning, R.J.M., de Boer, A.P.N., Reijnders, W.N.M., Westerhoff, H.V., Stouthamer, H. y Van der Oost, J.V. 1997. FnrP and NNR of *Paracoccus denitrificans* are both members of the FNR family of transcriptional activators but have distinct roles in respiratory adaptation in response to oxygen limitation. *Mol. Microbiol.* 23:893-907.

Walsh, T.A., Johnson, M.K., Greenwood, C., Barber, D., Springall, J.P., and Thomson, A.J. (1979) Some magnetic properties of *Pseudomonas* cytochrome oxidase. *Biochem J* 177: 29-39.

Weber, G., H. Reilander, and A. Puhier. 1985. Mapping and expression of a regulatory nitrogen fixation gene (*fixD*) of *Rhizobium meliloti*. *EMBO J.* 4:2751-2756.

Weeg-Aerssens, E., Wu, W.S., Ye, R.W., Tiedje, J.M., and Chang, C.K. (1991) Purification of cytochrome cd1 nitrite reductase from *Pseudomonas stutzeri* JM300 and reconstitution with native and synthetic haem d1. *J Biol Chem* 266: 7496-502.

William P. Laratta, Michael J. Nanaszko and James P. Shapleigh. Electron transfer to nitrite reductase of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3: examination of cytochromes c₂ and c_γ. 2006. *Microbiology* 152:1479–1488.

Wood, P. M. 1983. Why do c-type cytochromes exist?. *FEBS Lett.* 164:223-226

Wood, P.M. 1978. Periplasmic Location of the Terminal Reductase in Nitrite Respiration. *FEBS Lett* 92: 214-218.

Yamazaki, T., Oyanagi, H., Fujiwara, T., and Fukumori, Y. (1995) Nitrite reductase from the magnetotactic bacterium *Magnetospirillum magnetotacticum*. A novel cytochrome cd1 with Fe(II):nitrite oxidoreductase activity. *Eur J Biochem* 233: 665-71.

Zufferey, R., Arslan, E., Thöny-Meyer, L. y Hennecke, H. 1998. How replacement of the 12 conserved histidines of subunit I affect assembly, cofactor binding, and enzymatic activity of the *Bradyrhizobium japonicum* *cbb*₃-type oxidase. *J. Biol. Chem.* 273:6452-6459.

Zufferey, R., Hennecke, H. y Thöny-Meyer, L. 1997. Heme C incorporation into the *c*-type cytochromes FixO and FixP is essential for assembly of the *Bradyrhizobium japonicum* *cbb*₃-type oxidase. *FEBS Letters* 412:75-78.

Zufferey, R., Preisig, O., Hennecke, H. y Thöny-Meyer, L. 1996a. Assembly and function of the cytochrome *cbb*₃ oxidase subunits in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Biol. Chem.* 271:9114-9119.

Zufferey, R., Thöny-Meyer L. y Hennecke, H. 1996b. Histidine 131, not histidine 43, of the *Bradyrhizobium japonicum* FixN protein is exposed towards the periplasm and essential for the function of the *cbb*₃-type oxidase. *FEBS Letters* 394:349-352.

Capítulo 2

Role of *Bradyrhizobium japonicum*

cytochrome *c*₅₅₀ in nitrite and

nitrate respiration

2.1. ABSTRACT.

Bradyrhizobium japonicum cytochrome c_{550} , encoded by *cycA*, has been previously suggested to play a role in denitrification, the respiratory reduction of nitrate to dinitrogen. However, the exact role of this cytochrome in the denitrification process is unknown. This study shows that cytochrome c_{550} is involved in electrontransfer to the copper-containing nitrite reductase of *B. japonicum*, as revealed by the inability of a *cycA* mutant strain to consume nitrite and, consequently, to grow under denitrifying conditions with nitrite as the electron acceptor. Mutation of *cycA* had no apparent effect on methylviologen-dependent nitrite reductase activity. However, succinate-dependent nitrite reduction was largely inhibited, suggesting that c_{550} is the in vivo electron donor to copper-containing nitritereductase. In addition, this study demonstrates that a cytochrome c_{550} mutationhas a negative effect on expression of the periplasmic nitrate reductase. This phenotype can be rescued by extending the growth period of the cells. A model is proposed whereby a mutation in *cycA* reduces expression of the *cbb₃*-type oxidase, affecting oxygen consumption rate by the cells and consequently preventing maximal expression of the periplasmic nitrate reductase during the first days of the growth period.

2.2. INTRODUCTION.

Many bacteria that live in soil have branched electron transfer networks that enable them to use various electron donors or electron acceptors for maintenance and growth under different environments. Under anaerobic denitrifying growth, electrons can flow from NADH dehydrogenase and succinate dehydrogenase to ubiquinone, generating ubiquinol. Electrons then flow from the ubiquinol pool to the respiratory nitrate reductase or to the reductases for nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide via cytochrome *bc*₁ (Richardson, 2000). A key component in such a respiratory pathway is often considered to be cytochrome *c*₅₅₀. This protein has a similar tertiary structure and reduction potential to mitochondrial cytochrome *c*. Thus, when such a cytochrome has been identified in denitrifying bacteria it is reasonable to propose that it is an electron acceptor from the *bc*₁ complex and therefore the electron donor to periplasmic components that receive electrons via this complex. One such component is the cytochrome *cd*₁-type nitrite reductase (*cd*₁NIR), which has been shown to accept electrons from a range of structurally unrelated donors including cytochromes *c*₅₅₀ and *c*₅₅₁, as well as the copper proteins azurin and pseudoazurin (Williams *et al.*, 1995). Gene deletion experiments in *Paracoccus denitrificans* have demonstrated that both pseudoazurin and cytochrome *c*₅₅₀ function in vivo as electron donors to cytochrome *cd*₁NIR (Pearson *et al.*, 2003). In *Pseudomonas aeruginosa* only the cytochrome *c*₅₅₁ (NirM) and NirC, but not azurins, can act as donors to the *cd*₁NIR (Vijgenboom *et al.*, 1997; Hasegawa *et al.*, 2001). In the denitrifying bacterium *Alcaligenes xylosoxidans*, two azurins function as effective electron donors to the blue CuNiR (Murphy *et al.*, 2002; Harris *et al.*, 2006). *Bradyrhizobium japonicum* is a gram-negative facultative anaerobic bacterium found in soil and associated symbiotically with soybean plants. Like many other rhizobia species, *B. japonicum* adapt to different oxygen environments by inducing different respiratory chains in which the corresponding terminal oxidases have different affinities for O₂ (Delgado *et al.*, 1998). An electron-transport chain terminated in a high-affinity cytochrome *cbb*₃ oxidase, encoded by the *fixNOQP* genes, is expressed in *B. japonicum* during free-living microaerobic growth and in nitrogen-fixing bacteroids (Preisig *et al.*, 1993, 1996).

Bradyrhizobium japonicum is also able to grow under oxygen-limiting conditions, with nitrate as the terminal electron acceptor that is reduced to N₂ through the denitrification

pathway (Vairinhos *et al.*, 1989). In *B. japonicum*, denitrification reactions are catalyzed by the products of *napEDABC* (Delgado *et al.*, 2003), *nirK* (Velasco *et al.*, 2001), *norCBQD* (Mesa *et al.*, 2002), and *nosRZDYFLX* (Velasco *et al.*, 2004), which encode reductases for nitrate, nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide, respectively. Similar to many other denitrifiers, expression of denitrification genes in *B. japonicum* requires both oxygen limitation and the presence of nitrate or a derived N oxide (Bedmar *et al.*, 2005). *Bradyrhizobium japonicum* possesses three soluble c-type cytochromes, *c₅₅₀*, *c₅₅₂*, and *c₅₅₅* encoded by *cycA*, *cycB*, and *cycC* genes, respectively (Appleby *et al.*, 1991; Tully *et al.*, 1991; Bott *et al.*, 1995). A *B. japonicum* mutant with an insertion in *cycA*, encoding cytochrome *c₅₅₀*, failed to synthesize a 12 kDa soluble c-type cytochrome and to grow anaerobically using nitrate as the terminal electron acceptor (Bott *et al.*, 1995). However, the exact role of cytochrome *c₅₅₀* in the *B. japonicum* denitrification process is still unknown. In this study, a mutant strain lacking the *B. japonicum cycA* gene has been used to assess the involvement of the soluble cytochrome *c₅₅₀* in shuttling electrons to *NirK* during denitrification. Also, shows that cytochrome *c₅₅₀* has a negative effect on *nap* expression caused by a decrease in *cbb₃*-type cytochrome *c* oxidase production.

2.3. MATERIALS AND METHODS.

Bacterial strains, plasmids, and growth conditions in batch and continuous cultures. *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 (US Department of Agriculture, Beltsville, MD), 110spc4 (Regensburger & Hennecke, 1983) wild-type strains and *cycA* 3447 (Bott *et al.*, 1995), *cycA* 3447 complemented with plasmid pRJ3250 (Bott *et al.*, 1995), *nirK* GRK308 (Velasco *et al.*, 2001), and *fixN* 3613 (Preisig *et al.*, 1993) mutant derivative strains were used in this study. *Bradyrhizobium japonicum* strains 0602 (Robles *et al.*, 2006), 1404, and 2101 (this work) are USDA110, 3447, and 3613 derivatives containing a chromosomally integrated transcriptional *lacZ* fusion to the promoter region of the *napEDABC* genes (plasmid pBG0614, Robles *et al.*, 2006), which have been used to monitor *nap* expression. *Bradyrhizobium japonicum* strains were grown aerobically in liquid batch cultures containing peptone salts-yeast extract medium (Regensburger & Hennecke, 1983) at 28 °C. Anaerobic batch cultures were kept at 28 °C in yeast extract mannitol medium (Vincent, 1974) supplemented with

10mM KNO₃ or 1.5mM NaNO₂ in completely filled, rubber-stoppered serum bottles or tubes. Continuous cultivation of *B. japonicum* strains 0602, 1404, and 2101 was performed using an NBS Bioflow III fermentor (New Brunswick, Edison, NJ) with a 2–L working volume. The strains were grown in Bergersen's minimum medium (Bergersen, 1977), where glutamate was substituted by 10mM KNO₃, at 30 °C, with an aeration of 3 L min⁻¹ and a constant pH of 7, automatically controlled by the addition of 2N NaOH. The maximum agitation speed was set at 500 r.p.m. After a steady state was reached at a dilution rate of 0.3 h⁻¹, the oxygen consumption capacity of the cells was analyzed by monitoring dissolved-oxygen tension of the cultures with an O₂ Sensor (Mettler-Toledo) during a period of 4 h. Aliquots were taken from the chemostat and β-galactosidase activity was measured as indicated below. Antibiotics were added to *B. japonicum* cultures at the following concentrations (μg mL⁻¹): gentamycin, 100; spectinomycin, 200; streptomycin, 200; kanamycin, 200; tetracycline, 100. *Escherichia coli* strains were cultured in Luria-Bertani medium (Miller, 1972) at 37 °C. *Escherichia coli* DH5a (Stratagene, Heidelberg) was used as host in standard cloning procedures and *E. coli* S17-1 (Simon *et al.*, 1983) served as the donor in conjugative plasmid transfer. The antibiotics used were (μg mL⁻¹) as follows ampicillin, 200; gentamycin, 10; streptomycin, 20; spectinomycin, 20; kanamycin, 25; tetracycline, 10.

Determination of nitrate reductase and nitrite reductase activity.

Methylviologen-dependent Periplasmic nitrate reductase (Nap) and nitrite reductase (Nir) activities were analyzed essentially as described by Delgado *et al.*, (2003) and Bueno *et al.*, (2005), respectively. Succinate-dependent Nir activity was analyzed similarly to the MV⁺-dependent Nir activity using succinate instead of methylviologen as the electron donor. The reaction was started by the addition of 60 mM sodium succinate to the reaction mixture. After incubation for 30 min at 30 °C, the reaction was stopped by adding 50 μL of 1M zinc acetate followed by vigorous shaking.

Analytical methods β-Galactosidase activity was analyzed with permeabilized cells from at least three independently grown cultures as described by Miller (1972). Nitrite concentration was estimated after diazotization by adding the sulfanilamide/naphthylethylene diamine dihydrochloride reagent (Nicholas & Nason, 1957). Protein concentration was estimated using the Bio-Rad assay (Bio-Rad

Laboratories, Richmond, CA) with a standard curve of varying bovine serum albumin concentrations.

Heme-c protein analysis. Cell fractionation, membrane preparation, and protein sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis were performed as indicated earlier (Delgado et al., 2003). Proteins were stained for heme-dependent peroxidase activity using the chemiluminescence detection kit ‘SuperSignal’ (Pierce).

2.4. RESULTS AND DISCUSSION.

Nitrite-dependent anaerobic growth and nitrite reductase activity. To investigate the function of soluble cytochrome c_{550} in nitrite respiration, cells were incubated under anaerobic conditions with 1.5mM nitrite (Fig. 2.1a) and growth was determined by monitoring OD600nm (Fig. 2.1a). In contrast to *B. japonicum* 110spc4, cells of the *cycA* 3447 mutant strain were unable to grow anaerobically with nitrite as the final electron acceptor. This growth defect was similarly observed in the *nirK* GRK308 mutant strain (Fig. 2.1a). Under these conditions, nitrite in the medium was consumed by the wild-type cells, but not by the *cycA* or *nirK* mutants (Fig. 2.1b). Complementation of *cycA* strain 3447 with plasmid pRJ3250 containing the wild-type *cycA* gene restored the ability of the cells to grow with nitrite as an alternative electron acceptor and to consume the nitrite present in the growth medium (Fig. 2.1a and b). Whereas low levels of MV⁺-dependent nitrite reductase (Nir) activity were detected in the *nirK* mutant after incubation under anaerobic conditions with nitrate, levels of MV⁺-dependent Nir activity in cells of *cycA* strain 3447 were similar to those detected in the parental strain (Fig. 2.1c). However, in contrast to the wild-type 110spc4 strain, cells of the *cycA* 3447 mutant strain showed very low levels of nitrite reductase when succinate was used as the physiological electron donor in the assay (Fig. 2.1c).

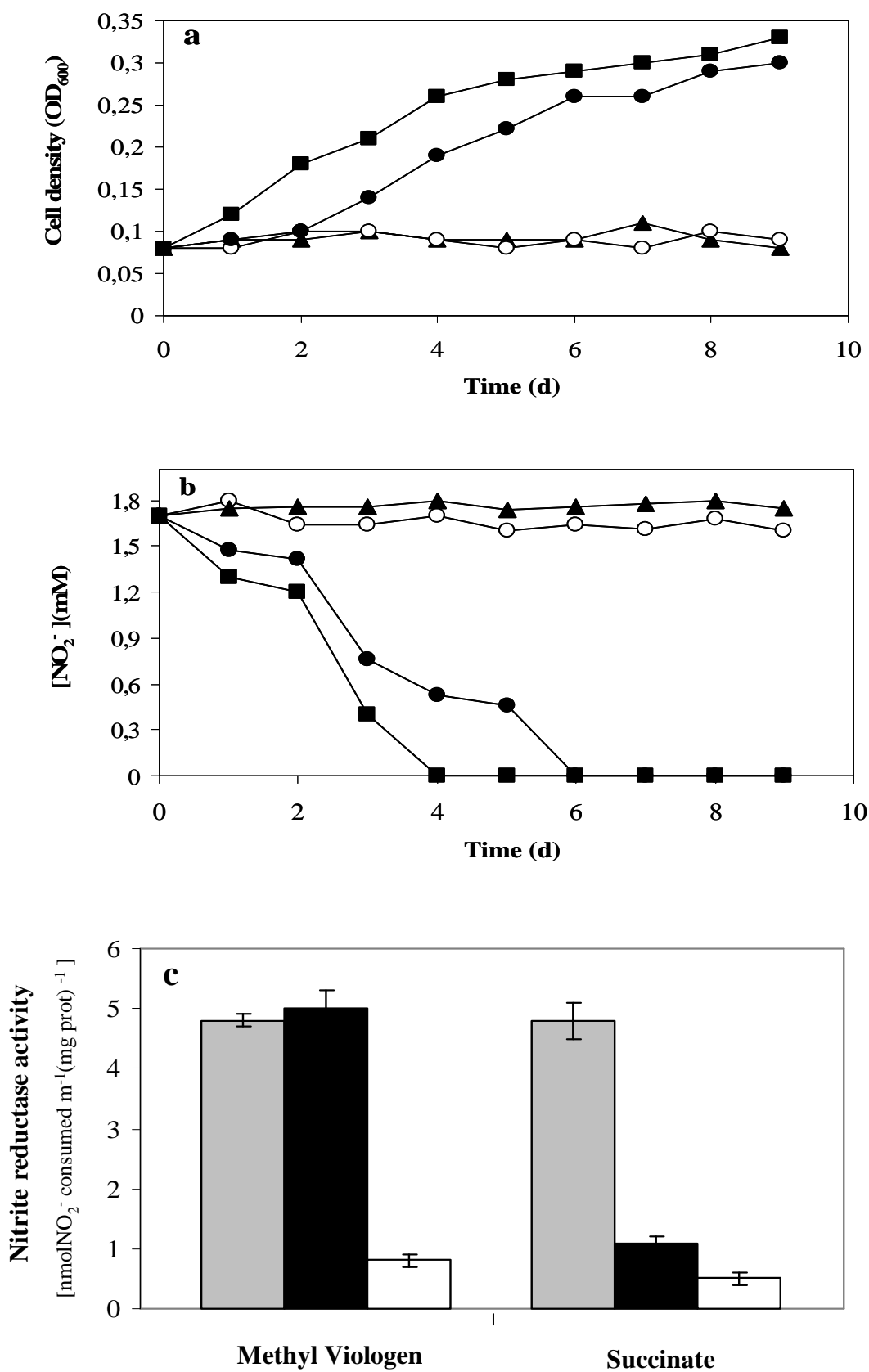


Figure 2.1. Nitrite-dependent anaerobic growth (a) and nitrite uptake (b) of wild type *B. japonicum* 110*spc*4 (■), and *cycA* 3447 (▲), *nirK* GRK308 (○) and *cycA* 3447 complemented with plasmid pRJ3250 (●) mutant strains. Cells were grown anaerobically in YEM medium supplemented with 1.5 mM NaNO₂. (c) MV⁺-dependent and Succinate-dependent nitrite reductase activity of *B. japonicum* 110*spc*4 (grey bar), *cycA* 3447 (black bar), and *nirK* GRK308 (white bar). Cells were incubated in YEM medium supplemented with 10 mM KNO₃ for 4 days. Data are means ± standard error from at least two different cultures, assayed in triplicate.

Taken together, these results suggest that cytochrome *c*₅₅₀ could act as an electron mediator protein between the cytochrome *bc*₁ complex and the copper-containing respiratory nitrite reductase in *B. japonicum*. In fact, the addition of 45 μM of myxothiazol, a specific inhibitor of cytochrome *bc*₁, to the growth medium of the wild-type cells significantly decreased succinate-dependent Nir activity (data not shown), suggesting a role of cytochrome *bc*₁ in electron delivery to *NirK* via *cycA*. In contrast to this study's findings, it has recently been suggested in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3 that, in addition to cytochrome *c*₂, encoded by *cycA*, there is another unidentified electron donor that transfers electrons to the copper-containing nitrite reductase (Laratta *et al.*, 2006). In *P. denitrificans* both pseudoazurin and cytochrome *c*₅₅₀ function in vivo as electron donors to cytochrome *cd*₁NIR (Pearson *et al.*, 2003). The present study's results suggest that this respiratory flexibility found in other denitrifiers is rather poor in *B. japonicum* where *c*₅₅₀ is the only electron donor to *NirK*. Although other soluble cytochromes *c* have been identified in *B. japonicum*, they are not involved in nitrite respiration (Bott *et al.*, 1995). Neither azurin- nor pseudoazurin-like copper proteins have been annotated in the genome sequence of *B. japonicum* (<http://www.kazusa.jp/rhizobase/>).

Nitrate-dependent anaerobic growth, nitrate reductase activity and nap expression. Growth of the *cycA* 3447 mutant strain under anaerobic conditions with nitrate, following transfer from aerobic cultures, showed a longer lag than wild-type cells, reaching a turbidity OD_{600nm} of only 0.145 compared with an OD_{600nm} of 0.35 for the wild-type cells after 4 days of growth (Fig. 2.2a). This lag was also observed in cells of strain 3613 with a mutation in the *fixN* gene encoding the catalytic subunit of the

cbb₃ oxidase (Fig. 2.2a). In contrast to *B. japonicum* 3447 and 3613 strains, cells of GRK308 strain affected in the *nirK* gene were unable to grow anaerobically with nitrate as the final electron acceptor (Fig. 2.2a) probably due to the toxicity of nitrite that accumulated in the medium from the beginning of the incubation period (Fig. 2.2b). However, a lag was observed in nitrite formation during growth of the *cycA* and *fixN* strains compared with wild-type cells (Fig. 2.2b). Nitrite was consumed by *B. japonicum* 110spc4 and 3613, decreasing its concentration in the growth medium to zero (Fig. 2.2b). However, nitrite accumulated and remained in the growth medium of 3447 and GRK308 strains (Fig. 2.2b), confirming the inability of those strains to consume nitrite observed in nitrite uptake experiments (Fig. 2.1b) and suggesting that in those mutants Nir was not active *in vivo*. The data presented here demonstrate that the absence of cytochrome *c*₅₅₀ has an influence on nitrate respiration. However, under the growth conditions used in this work, *c*₅₅₀ is not essential for nitrate-dependent anaerobic growth as has been suggested previously (Bott *et al.*, 1995).

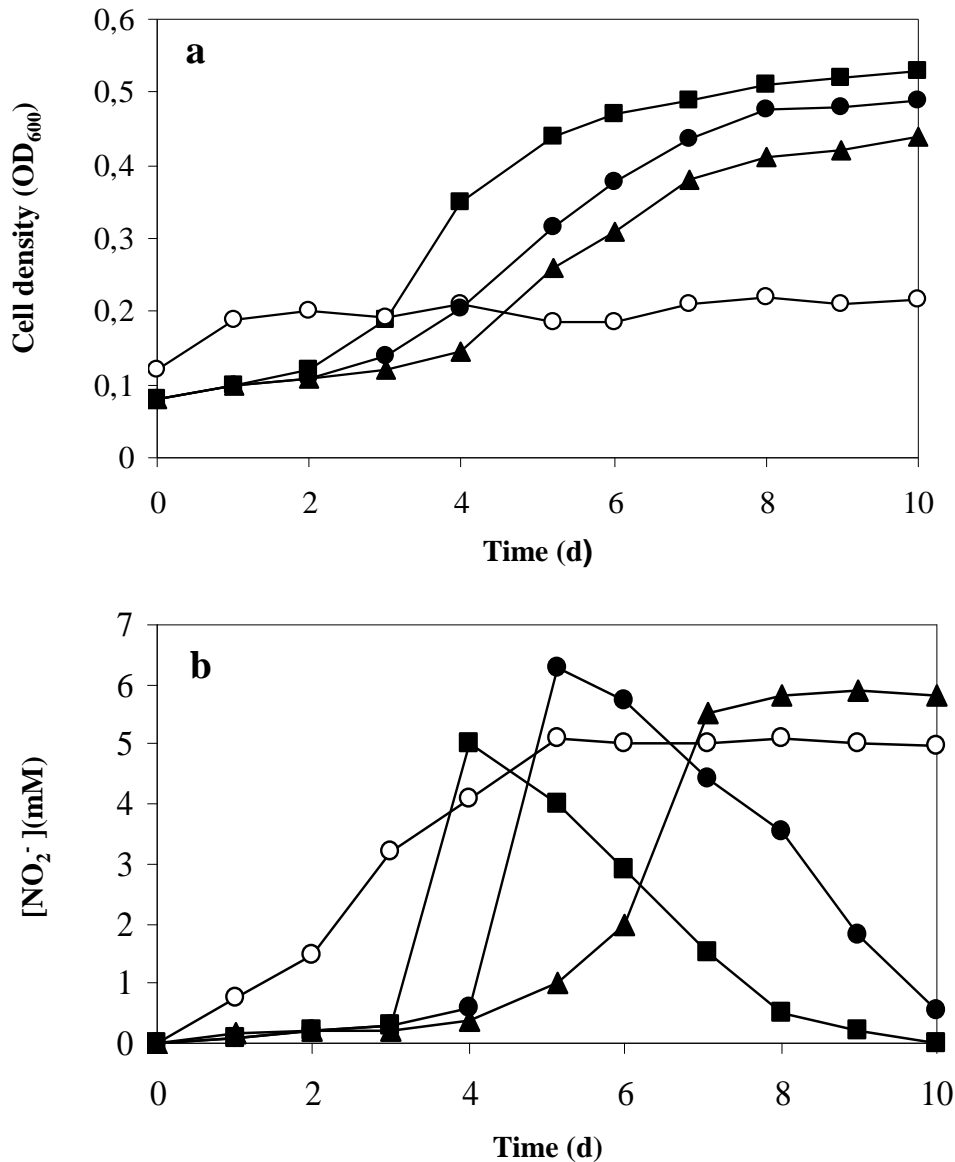


Figure 2.2. Nitrate-dependent anaerobic growth (a), and nitrite accumulation (b) of wild type *B. japonicum* 110spc4 (■), and *cycA* 3447 (▲), *nirK* GRK308 (○) and *fixN* 3613 (●) mutant strains. Cells were incubated anaerobically in YEM medium supplemented with 10 mM KNO₃.

After 2 days' growth under anaerobic conditions with nitrate, levels of MV1-dependent nitrate reductase activity in cells of strains 3447 and 3613 were very low compared with those detected in the parental strain (Fig. 2.3a). After 6 days' growth, nitrate reductase activity of *cycA* strain 3447 and *nirK* strain GRK308 increased about fourfold compared

with those observed after 2 days growth, reaching similar levels as those observed in strain 110spc4 (Fig. 2.3a). Similarly as observed in Fig. 2.3a, after 2 days' incubation under anaerobic conditions with nitrate, cells of strains 1404 and 2101 with a *napE-lacZ* fusion showed very low levels of b-galactosidase activity compared with those detected in cells of strain 0602 containing the *napE-lacZ* fusion (Fig. 2.3b). Expression of *nap* genes in the *cycA* and *fixN* mutant backgrounds was restored to wild-type levels after extension of the incubation period (Fig. 2.3b). The data presented in Figs 2.2 and 2.3 reveal that a *cycA* mutant has a phenotype similar to that of a cytochrome *cbb₃* oxidase mutant, with both exhibiting a delay in *nap* expression. In both mutants, this phenotype may be attributed to a highly reduced ubiquinone/ubiquinol pool, which is a consequence of the lack of electrons flowing through either denitrification pathway or cytochrome *cbb₃* oxidase. Alternatively, disruption of electron flow through *c₅₅₀* may affect the expression of *cbb₃* oxidase and consequently have a negative effect on *nap* expression.

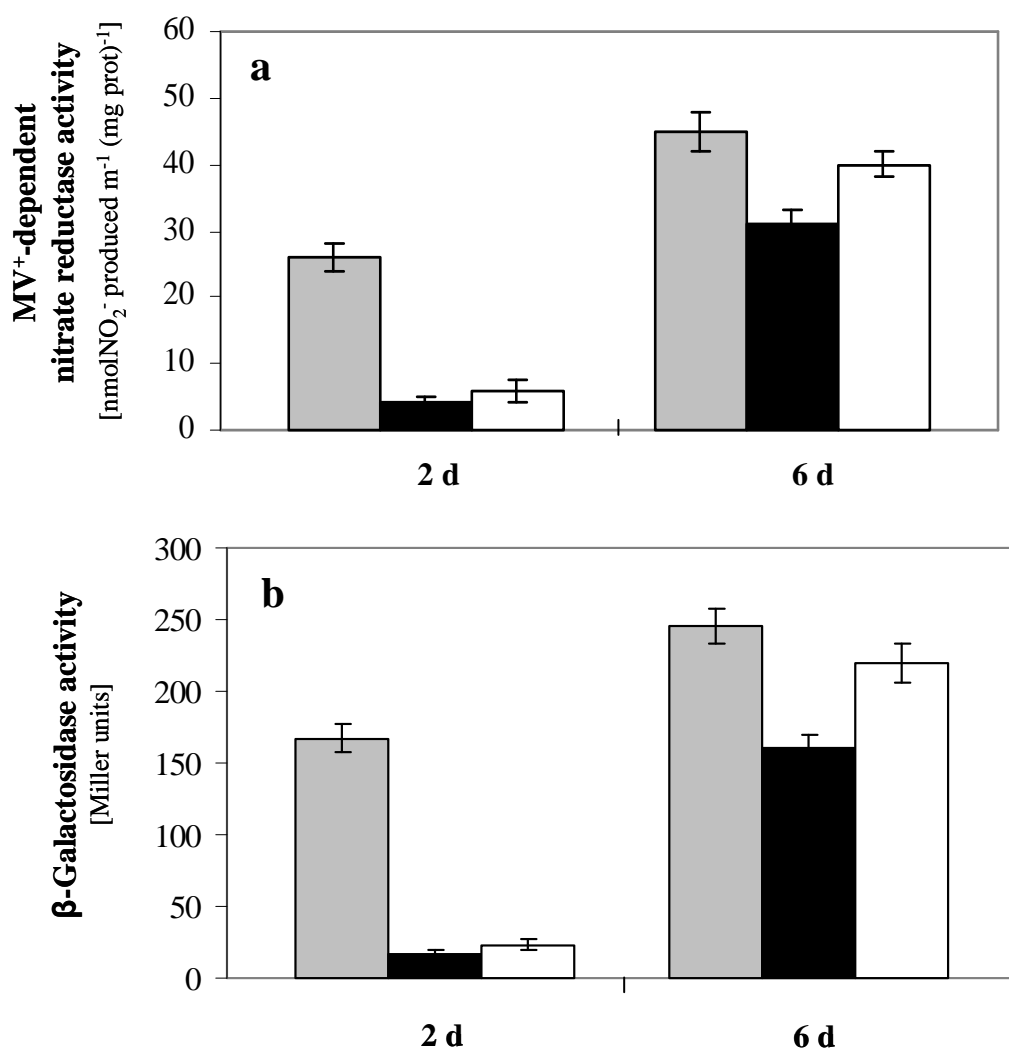


Figure 2.3. (a) MV⁺-dependent nitrate reductase activity in wild type *B. japonicum* 110*spc4* (grey bar), and *cycA* 3447 (black bar) and *fixN* 3613 (white bar) mutant strains. (b) β-galactosidase activity from a *napE-lacZ* fusion in wild type *B. japonicum* 0602 (grey bar), and *cycA* 1404 (black bar) and *fixN* 2101 mutant strains. Cells were incubated in YEM medium supplemented with 10 mM KNO₃ for 2 and 6 days. Data are means ± standard error from at least two different cultures, assayed in triplicate.

Heme- c analyses. In order to investigate the expression levels of *cbb*₃ oxidase in the *cycA* 3447 mutant, heme-*c* staining experiments were performed in membranes of cells incubated under anaerobic conditions with nitrate. Six stained bands of 32, 28, 25, 24, 20, and 16 kDa were detected in wild-type membranes (Fig. 2.4b and c, lane 1). The proteins of 28, 20, and 16 kDa have

been identified previously as the *B. japonicum* cytochrome c_1 (Thöny-Meyer *et al.*, 1989), CycM (Bott *et al.*, 1991), and NorC subunit of the nitric oxide reductase enzyme (Mesa *et al.*, 2002), respectively. As described by Preisig *et al.*, (1993), there is even a seventh protein of 28 kDa comigrating with cytochrome c_1 . This 28 kDa protein and the 32 kDa c -type cytochrome have been identified as the *B. japonicum* FixP and FixO proteins, respectively, of the *cbb*₃-type, highaffinity cytochrome oxidase encoded by the *fixNOQP* operon (Preisig *et al.*, 1993, 1996). The heme-stainable band of 25 kDa corresponds to NapC (Delgado *et al.*, 2003). In this work, the expression of *B. japonicum* FixP and FixO proteins was found to be very low in cells of the *cycA* mutant after 2 and 4 days, respectively, compared with expression levels detected in wild-type cells (Fig. 2.4a and b, lanes 1 and 2). This result suggests that *B. japonicum* cythochrome c_{550} may be an electron donor to the *cbb*₃ oxidase. However, when the *cycA* mutant was incubated under low-oxygen conditions in the absence of nitrate, where only the *cbb*₃ pathway is induced, oxygen consumption and *cbb*₃ expression were not inhibited (data not shown). By contrast, in *Rhodobacter sphaeroides*, it has been found that homologous cytochromes to *B. japonicum* c_{550} , cytochrome c_2 and c_y , are involved in electron transport to the *cbb*₃ terminal oxidase (Daldal *et al.*, 2001). In addition to FixP and FixO proteins, low expression of NapC and NorC was observed in *cycA* cells after 4 days compared with wild-type expression levels (Fig. 2.4b, lanes 1 and 2). Expression of those proteins in the *cycA* mutant was restored to wild-type levels after 6 days incubation (Fig. 2.4c, lanes 1 and 2). As observed in *cycA* membranes, and confirming the β -galactosidase activity results from the *napE-lacZ* fusion, expression of NapC in the *fixN* mutant was lower than that detected in wild-type cells after 4 days nitrate-dependent anaerobic growth (Fig. 2.4b, lanes 1 and 3). Extension of the growth period also restored NapC expression in the *fixN* mutant to wild-type levels (Fig. 2.4c, lanes 1 and 3). By contrast to the low expression of NorC observed in *cycA* membranes, levels of NorC protein in the *fixN* mutant were very similar to wild-type levels after 4 days' incubation under anaerobic conditions with nitrate (Fig. 2.4b, lanes 1–3). In denitrifiers, such as *P. denitrificans* (van Spanning *et al.*, 1999) and *R. sphaeroides* (Kwiatkowski & Shapleigh, 1996), nitric oxide (NO) acts as the signal molecule for transcriptional activation of *nor* genes. This may also be true for *B. japonicum* because in the *cycA* mutant there is no reduction of nitrite to NO and consequently NorC expression is highly reduced after 4 days incubation. However, in the *fixN* mutant where nitrite reduction is not impaired (data not shown), NorC expression is similar to wild type.

Surprisingly, after 6 days' incubation, levels of NorC in *cycA* membranes were similar to those detected in wild-type membranes. Because nitrite accumulated in the *cycA* growth medium after 6 days' incubation, NO may be produced by nitrite non enzymatic reduction.

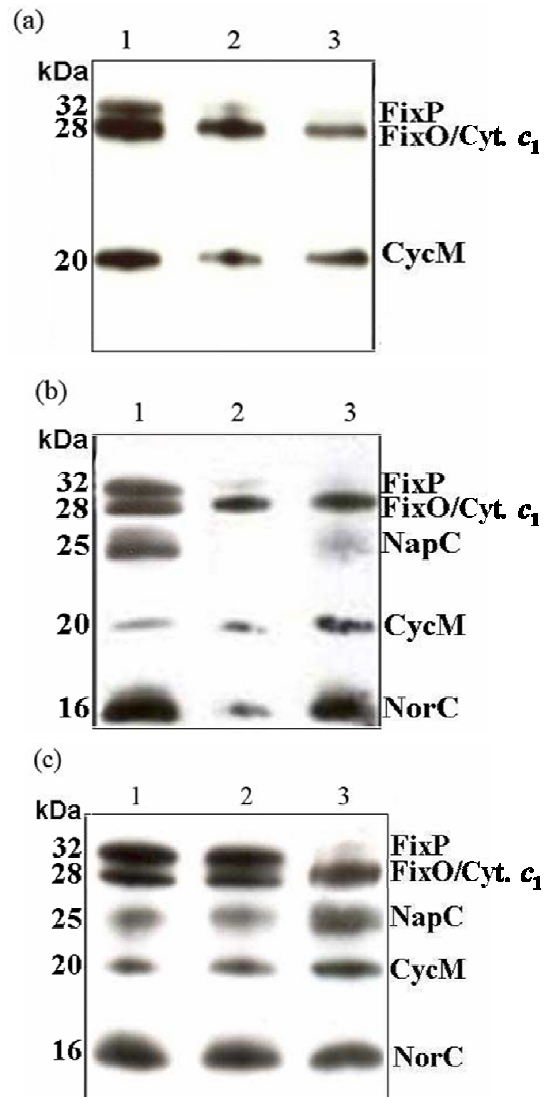


Figure 2.4. Haem-stained proteins in membranes prepared from wild type *B. japonicum* 110*spc4* (lane 1), and *cycA* 3447 (lane 2), and *fixN* 3613 (lane 3) mutant strains. Cells were incubated anaerobically in YEM medium supplemented with 10 mM KNO₃ for 2 days (a), 4 days (b) and 6 days (c). The proteins of 32 and 28 kDa have been identified previously as the *B. japonicum* FixP and FixO components of the *cbb*₃-type, high-affinity cytochrome oxidase. The 20 kDa cytochrome corresponds to CycM, a membrane-bound *c*-type cytochrome which transfers electrons from *bc*₁ to cytochrome

*aa*₃. Cytochrome *c*₁, NapC and NorC haem-stained *c*-type cytochromes identified previously are also specified at the right margin. Each lane contains about 25 µg membrane proteins. Apparent masses of the proteins (kDa) are shown at the left margin.

The heme-staining results clearly demonstrate that inactivation of the *cycA* gene affects expression of *cbb*₃ oxidase during the first days of nitrate-dependent anaerobic growth, and consequently maximal expression of *nap* genes is also prevented. Supporting the present study's results, it has been shown in *R. sphaeroides* 2.4.1 that a decrease in the activity of *cbb*₃ oxidase leads to a significant decrease in *nirK* expression (Laratta *et al.*, 2002). When *cbb*₃ expression is inhibited, oxygen consumption rate is reduced, and maximal expression of *nap* is not observed until conditions become more anaerobic and this occurs when O₂ still present in the growth medium is consumed by other oxidases.

Time-course analysis of O₂ consumption and *nap* expression. Time-course experiments revealed that *napE-lacZ* expression in *B. japonicum* wild-type cells seemed to increase as oxygen was removed from the medium (Fig. 2.5). However, in *fixN* or *cycA* continuous cultures, O₂ consumption rates were slower than those observed in wild-type culture. In those mutants, induction of *nap* expression showed a delay and after 3 h β-galactosidase levels were about threefold lower than those observed in the wild-type strain 0602 continuous cultures (Fig. 2.5). These observations suggest that the delay in *nap* expression observed in a *cycA* as well as in a *fixN* mutant strain may be a consequence of the delay observed in oxygen consumption rate. As has been proposed previously by Bedmar *et al.*, (2005), expression of denitrification genes in *B. japonicum* require both oxygen limitation and the presence of nitrate. This results suggest that maximal expression of these genes occurs at a very low oxygen concentration and this situation occurs after the *cbb*₃ oxidase has consumed the oxygen still present in the anaerobic growth medium. This hypothesis is supported by the observation that after 2 days under anaerobic conditions with nitrate, *cbb*₃ oxidase is fully expressed in the wild-type cells (Fig 2.4a, lane 1). However, expression of NapC and NorC proteins is still very weak, being fully expressed after 4 days' growth (Fig. 2.4a and b, lane 1). These results suggest that oxygen consumption by the cells is required for full expression of denitrification proteins. Microaerobic induction of *B. japonicum* denitrification.

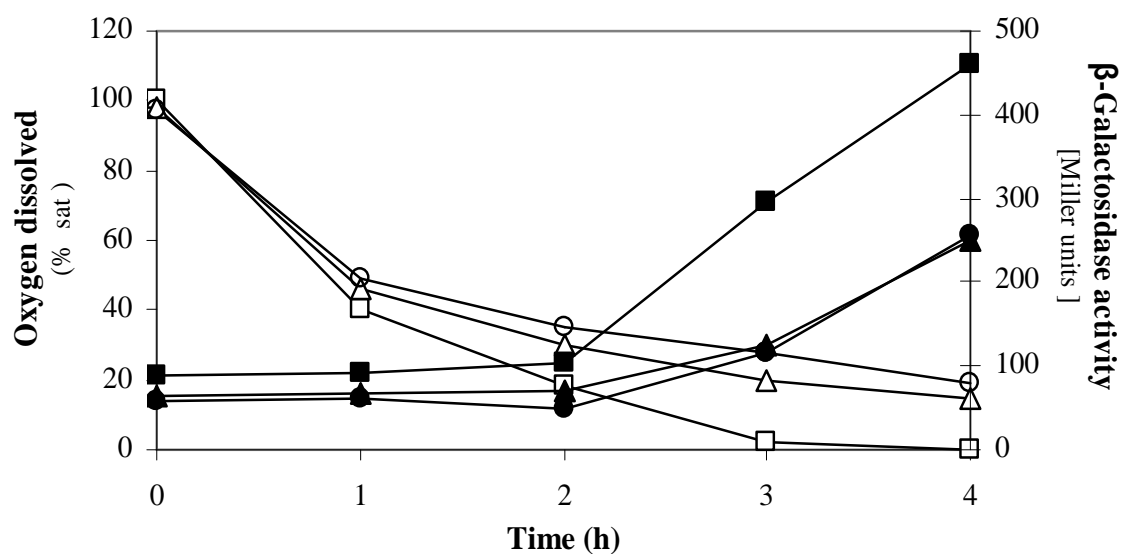


Figure 2.5. Oxygen consumption (white symbols) and β -galactosidase activity (black symbols) of wild type *B. japonicum* 0602 (\square, \blacksquare), and *cycA* 1404 ($\triangle, \blacktriangle$) and *fixN* 2101 mutant strains (\circ, \bullet) containing a *napE-lacZ* fusion. Cells were grown in continuous cultivation in Bergersen minimum medium with 10mM KNO_3 .

2.5. REFERENCES.

Appleby CA, James P & Hennecke H (1991) Characterization of three soluble c-type cytochromes isolated from soybean root nodule bacteroids of *Bradyrhizobium japonicum* strain CC705 *FEMS Microbiol Lett* 83: 137-144.

Bedmar EJ, Robles EF & Delgado MJ (2005) The complete denitrification pathway of the symbiotic, nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochem Soc Trans* 33:141–144.

Bergersen FJ (1977) A Treatise on Dinitrogen Fixation, section III: Biology. Ed. Hardy, R.W. & Silver, W., Wiley. Nueva York, N.Y. 519-556.

Bott M, Ritz D, & Hennecke H (1991) The *Bradyrhizobium japonicum* *cycM* gene encodes a membrane-anchored homolog of mitochondrial cytochrome *c*. *J Bacteriol* 173. 6766-6772.

Bott M, Thöny-Meyer L, Loferer H, Rossbach S, Tully RE, Keister D, Appleby CA & Hennecke H (1995) *Bradyrhizobium japonicum* cytochrome *c*₅₅₀ is required for nitrate respiration but not for symbiotic nitrogen fixation. *J Bacteriol* 177: 2214–2217.

Bueno E, Gómez-Hernández N, Girard L, Bedmar EJ & Delgado MJ (2005) Function of the *Rhizobium etli* CFN42 *nirK* gene in nitrite metabolism. *Biochem Soc Transac* 35: 166-167.

Daldal F, Mandaci S, Winterstein C, Myllykallio H, Duyck K & Zannoni D (2001) Mobile Cytochrome *c*₂ and membrane-anchored cytochrome *c*_y are both efficient electron donors to the *cbb*₃- and *aa*₃-type cytochrome *c* oxidases during respiratory growth of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* 183: 3013-2024.

Delgado MJ, Bedmar EJ & Downie JA (1998) Genes involved in the formation and assembly of rhizobial cytochromes and their role in symbiotic nitrogen fixation. *Adv Microb Physiol* 40:191-231.

Delgado MJ, Bonnard N, Tresierra-Ayala A, Bedmar EJ & Müller P (2003) The *Bradyrhizobium japonicum* napEDABC genes encoding the periplasmic nitrate reductase are essential for nitrate respiration. *Microbiology* 149:3395-3403.

Harris RL, Eady RR, Hasnain SS & Sawers RG (2006) Coordinate synthesis of azurin I and copper nitrite reductase in *Alcaligenes xylooxidans* during denitrification. *Arch Microbiol* 186: 241-249.

Hasegawa N, Arai H & Igarashi Y (2001) Two c-type cytochromes, NirM and NirC, encoded in the *nir* gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* act as electron donors for nitrite reductase. *Biochem Biophys Res Commun* 288:1223–1230.

Kwiatkowski AV & Shapleigh JP (1996) Requirement of nitric oxide for induction of genes whose products are involved in nitric oxide metabolism in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3. *J Biol Chem* 271:24382-24388.

Laratta WP, Choi PS, Tosques IE & Shapleigh JP (2002) Involvement of the PrrB/PrrA two-component system in nitrite respiration in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3: evidence for transcriptional regulation. *J Bacteriol* 184: 3521-3529.

Laratta WP, Nanaszko MJ & Shapleigh JP (2006) Electron transfer to nitrite reductase of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3: examination of cytochromes c_2 and c_y . *Microbiology* 152: 1479-1488.

Mesa S, Velasco L, Manzanera ME, Delgado MJ & Bedmar EJ (2002) Characterization and regulation of the nitric oxide reductase-encoding region of *Bradyrhizobium japonicum*. *Microbiology* 148: 3553-3560.

Murphy LM, Dodd FE, Yousafzai FK, Eady RR & Hasnain SS (2002) Electron donation between copper-containing nitrite reductases and cupredoxins: the nature of protein-protein interaction in complex formation. *J Mol Biol* 315: 859-871.

Nellen-Anthamatten D, Rossi P, Preisig O, Kullik I, Babst M, Fischer H-M & Hennecke H (1998) *Bradyrhizobium japonicum* FixK₂, a crucial distributor in the FixLJ-dependent regulatory cascade for control of genes inducible by low oxygen levels. *J Bacteriol* 180, 5251–5255.

Miller JH (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Nicholas DJD & Nason A (1957) Determination of nitrate and nitrite. In S.P Colowick and N.O. Kaplan (ed.), *Methods in Enzymology*, vol. 3. Academic Press, New York, 981-984.

Pearson IV, Page MD, van Spanning RJM & Ferguson SJ (2003) A mutant of *Paracoccus denitrificans* with disrupted genes coding for cytochrome *c*₅₅₀ and pseudoazurin establishes these two proteins as the in vivo electron donors to cytochrome *cd*₁ nitrite reductase. *J Bacteriol* 185: 6308-6315.

Preisig O, Nellen-Anthamatten D & Hennecke H (1993) Genes for a microaerobically induced oxidase complex in *Bradyrhizobium japonicum* are essential for a nitrogen-fixing endosymbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 3309–3313.

Preisig O, Zufferey R, Thöny-Meyer L, Appleby CA & Hennecke H (1996) A high-affinity *cbb*₃-type cytochrome oxidase terminates the symbiosis-specific respiratory chain of *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* 178: 1532–1538.

Regensburger B & Hennecke H (1983) RNA polymerase from *Rhizobium japonicum*. *Arch Microbiol* 135: 103–109.

Richardson DJ (2000) Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. *Microbiology* 146: 551–571.

Robles EF, Sanchez C, Delgado MJ & Bedmar EJ (2006) The *Bradyrhizobium japonicum* *napEDABC* genes are controlled by the FixLJ–FixK2–NnrR regulatory cascade. *Biochem Soc Trans* 34: 108–110.

Sciotti M-A, Chanfon A, Hennecke H & Fischer H-M (2003) Disparate oxygen responsiveness of two regulatory cascades that control expression of symbiotic genes in *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* 185: 5639–5642.

Simon R, Priefer U & Pühler A (1983) A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Biotechnology* 1: 784–791.

Thöny-Meyer L, Stax D & Hennecke H (1989) An unusual gene cluster for the cytochrome *bc1* complex in *Bradyrhizobium japonicum* and its requirement for effective root nodule symbiosis. *Cell* 57: 683–697.

Tully RE, Sadowsky MJ & Keister DL (1991) Characterization of cytochromes *c*₅₅₀ and *c*₅₅₅ from *Bradyrhizobium japonicum*: cloning, mutagenesis, and sequencing of the *c*₅₅₅ gene (*cycC*). *J Bacteriol* 173: 7887–7895.

Vairinhos F, Wallace W & Nicholas DJD (1989) Simultaneous assimilation and denitrification of nitrate by *Bradyrhizobium japonicum*. *J Gen Microbiol* 135: 189–193.

van Spanning RJ, Houben E, Willem NM, Reijnders WN, Spiro S, Westerhoff HV & Saunders N (1999) Nitric oxide is a signal for NNR-mediated transcription activation in *Paracoccus denitrificans*. *J Bacteriol* 181: 4129–4132.

Velasco L, Mesa S, Delgado MJ & Bedmar EJ (2001) Characterization of the *nirK* gene encoding the respiratory, Cu-containing nitrite reductase of *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochim Biophys Acta* 1521: 130–134.

Velasco L, Mesa S, Xu CA, Delgado MJ & Bedmar EJ (2004) Molecular characterization of *nosRZDFYLX* genes coding for denitrifying nitrous oxide reductase of *Bradyrhizobium japonicum*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 85: 229–235.

Vincent JM (1974) Root-nodule symbioses with Rhizobium. The Biology of Nitrogen Fixation (Quispel A, ed), pp. 265–341. American Elsevier Publishing Co, New York, NY.

Vijgenboom E, Busch JE & Canters GW (1997) In vivo studies disprove an obligatory role of azurin in denitrification in *Pseudomonas aeruginosa* and show that azu expression is under control of *rpoS* and ANR. *Microbiology* 143: 2853–2863.

Williams PA, Fulop V, Leung YC, Chan C, Moir JW, Howlett G, Ferguson SJ, Radford SE & Hajdu J (1995) Pseudospecific docking surfaces on electron transfer proteins as illustrated by pseudoazurin, cytochrome *c₅₅₀* and cytochrome *cd₁* nitrite reductase. *Nat Struct Biol* 2: 975–982.

Capítulo 3

Expression of *B. japonicum cbb*₃ terminal

oxidase under denitrifying conditions is

subjected to redox control

3.1. ABSTRACT

Bradyrhizobium japonicum utilizes cytochrome *cbb*₃ oxidase encoded by the *fixNOQP* operon to support microaerobic respiration under free-living and symbiotic conditions. This bacterium is also able to grow anaerobically with nitrate as electron acceptor. Under denitrifying conditions, where the *cbb*₃ oxidase is also fully expressed, inactivation of the *cycA* gene, encoding the cytochrome *c*₅₅₀, reduced O₂ consumption rates and expression of the heme-stained FixP and FixO components of the *cbb*₃ oxidase. In order to establish the role of cytochrome *c*₅₅₀ in electron transport to the *cbb*₃ oxidase, in this work, we have analyzed cytochrome *c* oxidase activity, and *cbb*₃ expression in the *cycA* mutant incubated under low oxygen conditions without nitrate, where only the *cbb*₃ pathway is induced, and with nitrate, where *cbb*₃ and denitrification pathways are induced. Only when cells were incubated under denitrifying conditions, levels of cytochrome *c* oxidase activity, as well as, expression of a *fixP'*-*lacZ* translational fusion, were highly reduced in the *cycA* mutant. Similarly, *cbb*₃ oxidase was expressed very weakly in a *napC* mutant lacking the membrane-bound *c*-type cytochrome which transfers electrons to the NapAB structural subunit of the periplasmic nitrate reductase. The presence of a highly reduced carbon substrate or myxothiazol, a specific inhibitor of the cytochrome *bc*₁ complex, inhibited α -galactosidase activity in the wild type cells incubated anaerobically with nitrate. These results suggest that a change in the flow of electrons through the denitrification network may affect the cellular redox state, leading to alterations in *cbb*₃ expression. We propose a redox-dependent regulation of the *cbb*₃ cytochrome oxidase under denitrifying conditions.

3.2. INTRODUCTION

The adaptable energy-producing systems of bacteria often contribute to their remarkable metabolic diversity. For instance, facultative bacteria can alter their mode of energy generation by taking advantage of different respiratory pathways (Richardson, 2000). One obvious distinction between these pathways is their final electron acceptor; aerobic electron transport chains use oxygen, whereas anaerobic pathways use compounds such as nitrate or dimethyl sulphoxide (DMSO). Aerobic bacteria generally have multiple respiratory oxidases that allow the cells to adapt to different environmental O₂ conditions (Delgado *et al.*, 1998). Despite differences in substrate (quinol versus cytochrome), O₂ affinity, heme types and metal composition, most bacterial oxidases belong to a single superfamily, the heme-copper oxidase family. The *cbb*₃-type oxidase has been identified as a heme-copper oxidase that catalyzes the reduction of O₂ to water and has a very high affinity for O₂ (Pitcher *et al.*, 2002). As a consequence, it allows respiration under low oxygen conditions, such as those encountered by rhizobia in the legume nodule (Delgado *et al.*, 1998). Genes encoding the *cbb*₃ oxidase complex were isolated initially from rhizobial species and named *fixNOQP* for their role in symbiotic nitrogen fixation (Mandon *et al.*, 1994; Priesig *et al.*, 1993). Since then, orthologous genes have been identified in other gram-negative bacteria and called *ccoNOQP* in non-N₂-fixing organisms (Myllykallio and Liebl, 2000). The *cbb*₃-type oxidase is made up of three to four subunits: Subunit I is encoded by *ccoN* and is a membrane-integral *b*-type cytochrome with a high-spin heme-Cu_B binuclear center and a low-spin heme. Subunits II and III are encoded by *ccoO* and *ccoP*, respectively, and are membrane-encored *c*-type cytochromes. As shown in *Rhodobacter sphaeroides* and *Bradyrhizobium japonicum*, the *ccoN*, *ccoO* and *ccoP* gene products are essential for both the activity and the assembly of the *cbb*₃ oxidase. In contrast, *ccoQ*, which encodes subunit IV, is sometimes missing. *ccoQ* is not required either for assembly or activity of the oxidase under low-O₂ concentration (Oh and Kaplan 1999, Zufferey *et al.*, 1996) but may play a protective, stabilizing role under oxic conditions (Oh and Kaplan 2002). *CcoNOQP* has been extensively studied in *Rhodobacter sphaeroides*, where it has multiple roles. It functions not only as a terminal oxidase (Garcia-Horsman *et al.*, 1994) but also as a redox sensor in a signal transduction pathway controlling photosynthesis gene expression (Oh and

Kaplan 2002, Kim *et al.*, 2007). *Bradyrhizobium japonicum* is a gram-negative bacterium found in soil and associated symbiotically with soybean plants. Like many others anaerobic facultative bacteria, *B. japonicum* adapt to different environmental O₂ concentrations by inducing multiple terminal oxidases with different affinities for O₂ (Delgado *et al.*, 1998). Free-living microaerobic growth and nitrogen-fixing bacteroids use a cytochrome *cbb*₃-type oxidase encoded by the *fixNOQP* operon (Priesig *et al.*, 1993; Priesig *et al.*, 1996). Electron transfer to this high-affinity oxidase is via the cytochrome *bc*₁ complex (Thöny-Meyer, 1989). During aerobic free-living growth, electron transport from the cytochrome *bc*₁ complex to the low oxygen affinity oxidase cytochrome *aa*₃ occurs via a transmembrane cytochrome *c* (CycM, Bott *et al.*, 1991). In *B. japonicum* there is a second cytochrome oxidase encoded by the *coxMNOP* operon (Bott *et al.*, 1992) that also requires electron transport via the cytochrome *bc*₁ complex. In addition to cytochrome *c* oxidases there are quinol oxidases such as the microaerobically-expressed *bb*₃-type ubiquinol oxidase encoded by *coxWXYZ* (Surpin *et al.*, 1996).

Oxygen concentration is the primary effector of *fixNOQP* expression in *B. japonicum*. Under O₂ limitation, FixJ protein of the FixLJ two-component regulatory system is phosphorylated by the oxygen-inhibitable, haem-based sensor kinase FixL. The only known target of FixJ in *B. japonicum* is *fixK*₂, whose product, FixK₂, belongs to the Crp (cAMP receptor protein) and Fnr (fumarate and nitrate reductase) activator protein superfamily of transcription factors (Nellen-Antametten *et al.*, 1998). FixK₂ has been shown to activate genes involved in anaerobic or microaerobic energy metabolism, including the *fixNOQP* operon (Nellen-Anthametten *et al.*, 1998), and the denitrification genes (Bedmar *et al.*, 2005).

In addition to oxygen respiration, *B. japonicum* is able to obtain energy and grow from nitrate reduction to N₂ through denitrification when cultured under oxygen-limiting conditions with nitrate as the terminal electron acceptor (Vairinhos *et al.*, 1988). The complete denitrification pathway consists thus in the sequential reduction of nitrate (NO₃⁻) or nitrite (NO₂⁻) to dinitrogen (N₂), through the intermediates nitric oxide (NO) and nitrous oxide (N₂O) in a four-reaction process catalysed by nitrate-, nitrite-, nitric oxide- and

nitrous oxide-reductase, respectively. Reviews covering the physiology, biochemistry and molecular genetics of denitrification have been published elsewhere (Zumft 1997; van Spanning *et al.*, 2005 and 2007). In *B. japonicum*, denitrification reactions depend on *napEDABC* (Delgado *et al.*, 2003), *nirK* (Velasco *et al.*, 2001), *norCBQD* (Mesa *et al.*, 2002) and *nosRZDYFLX* (Velasco *et al.*, 2004) genes. Similar to many other denitrifiers, expression of denitrification genes in *B. japonicum* requires both oxygen limitation and the presence of nitrate or a derived N oxide (Bedmar *et al.*, 2005). Maximal induction of transcription from the *nap*, *nir*, and *nor* promoter regions depends on the FixLJ-FixK₂-NnrR regulatory cascade (Mesa *et al.*, 2003; Robles *et al.*, 2006).

Very recently, it has been demonstrated that *Bradyrhizobium japonicum* cytochrome *c*₅₅₀, encoded by *cycA*, is involved in the electron transfer to the Cu-containing nitrite reductase of *B. japonicum* (Bueno *et al.*, 2008). These authors also demonstrated that inactivation of *B. japonicum cycA* gene, decreases expression of *B. japonicum* FixP and FixO haem *c*-stained components of the *cbb*₃ oxidase, as well as oxygen consumption rates, after 2 days nitrate-dependent anaerobic growth (Bueno *et al.*, 2008). To better understand the physiological role of the cytochrome *c*₅₅₀ on the expression of the terminal oxidase *cbb*₃ in *B. japonicum*, in this work we have analyzed expression and activity of this oxidase in cells incubated under low oxygen conditions without nitrate and under denitrifying conditions. Effect of inactivation of others electron carriers from the denitrification pathway such as NapC or *bc*₁ complex and the influence of different carbon substrates on expression of a *fixP*'-*lacZ* reporter fusion has also been studied. Our results indicate that, in addition to oxygen concentration, intracellular redox state might be involved in *B. japonicum fixNOQP* regulation.

3.3. MATERIALS AND METHODS.

Bacterial strains and growth conditions. *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 (US Department of Agriculture, Beltsville, MD, USA), 110*spc4* (Regensburger & Hennecke, 1983) wild type strains and *cycA* 3447 (Bott *et al.*, 1995), *fixN* 3613 (Preisig *et al.*, 1993), *napC* 0609 (Robles *et al.*, 2006) mutant derivative strains were used in this study. *B. japonicum* strain 3604 (Zufferey *et al.*, 1996) is a wild type strain containing a *fixP*'-*lacZ* fusion. In this work, plasmid pRJ3603 (Zufferey *et al.*, 1996) containing a *fixP*'-*lacZ* translational fusion was integrated by homologous recombination into the chromosome of the *cycA* and *napC* mutants resulting in strains 1406, and 2300, respectively. *B. japonicum* strains were grown aerobically in liquid batch cultures containing peptone-salts-yeast extract (PSY) medium (Regensburger & Hennecke, 1983) at 28 °C. Anaerobic batch cultures were kept at 28 °C in YEM medium (Vincent, 1974) with and without 10 mM KNO₃ in completely filled, rubber-stoppered serum bottles or tubes. Antibiotics were added to *B. japonicum* cultures at the following concentrations (µg ml⁻¹): gentamycin, 100; spectinomycin 200, streptomycin, 200 and kanamycin, 200, tetracycline, 100. *E. coli* strains were cultured in Luria Bertani (LB) medium (Miller, 1972) at 37 °C. *E. coli* DH5α (Stratagene, Heidelberg) was used as host in standard cloning procedures and *E. coli* S17-1 (Simon *et al.*, 1983) served as the donor in conjugative plasmid transfer. The antibiotics used were (µg ml⁻¹): spectinomycin, 20; and kanamycin, 25 and tetracycline, 10.

UV-Visible spectroscopy. *B. japonicum* strains grown aerobically in PSY medium were centrifuged at 8,000 *g* for 10 min. Then, cells were washed twice with YEM medium and incubated anaerobically with and without 10 mM KNO₃. After 2 days incubation, membrane fractions were isolated as described elsewhere (Delgado *et al.*, 2003). After isolation, membranes were solubilized in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 1% dodecyl maltoside (Sigma), and they were subjected to ultracentrifugation at 140,000 *g* for 1h at 4 °C. The solubilised oxidase complex remained in the supernatant. Solubilized membrane proteins were reduced with addition of excess sodium dithionite and oxidized with ferric cyanide (10µM). Then dithionite-reduced-

minus-ferricianide-oxidized spectra was recorded by using a Hitachi U-3310 spectrophotometer linked to a circulating BC-10 water bath (Fisher Scientific).

Cytochrome *c* oxidase activity. Cytochrome *c* oxidase activity was measured by monitoring the reduction of cytochrome *c* by cytochrome *c* oxidase as a function of the decrease in absorbance at 550 nm. Specifically, 10 μ l of membrane fraction (3.5 mg/ml) isolated as described elsewhere (Delgado *et al.*, 2003) were combined with 940 μ l of assay buffer (10 mM Tris-HCl at pH 7.0, 120 mM KCl). The reaction was initiated by the addition of 50 μ l of reduced horse heart cytochrome *c* (Sigma), and the decrease in absorbance at 550 nm was measured continuously for 1 min by using a spectrophotometer. Reduced cytochrome *c* was prepared by making a solution at 218 μ M in water and adding dithionite to saturation. Traces of dithionite in suspension after reduction were eliminated by filtering the solution with a PD-10 column. To assure the level of reduction is adequate, the absorbance of a 20-fold-diluted stock was measured at both 550 and 565 nm. A ratio of absorbance at 550 to 565 nm should be between 10 and 20 and indicates that the substrate is sufficiently reduced. Activity was quantified by the following calculation: $U/ml = (Abs/min) \times \text{dilution factor} \times \text{reaction volume (ml)} / \text{volume of sample (ml)} \times 21.84$, where $21.84 = \epsilon^{mM}$ between ferrocytochrome *c* and ferricytochrome *c* at 550 nm (Sigma protocol in reference to product code CYTOC-OX1).

Oxygen consumption. Cytochrome *c* oxidase activity was also measured in whole cells by monitoring *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenyldiamine (TMPD)-dependent oxygen-consumption with a Apollo-4000 oxygen electrode (WPI, USA). Cells were incubated in 2 ml phosphate buffer 25 mM pH 7.5 at 28 °C and ascorbate (1.5 mM) and TMPD (30 μ M) were added as electron donor. The time taken to consume all of the oxygen present in the system was used to calculate the rate of oxygen consumption.

Haem-*c* proteins analysis. Cells of *B. japonicum* grown aerobically in 500 ml PSY medium were harvested by centrifugation as above, washed twice with YEM, resuspended in 1 l of the same medium supplemented or not with 10 mM KNO₃, and finally incubated under anaerobic conditions for 2 days. Membrane preparations were performed as

described earlier (Delgado *et al.*, 2003). Membrane protein aliquots (30 µg) were diluted in sample buffer (124 mM Tris-HCl, pH 7.0, 20% glycerol, 4.6% SDS, and 50 mM 2-mercaptoethanol), and incubated at room temperature for 10 min. Membrane proteins were separated at 4°C in SDS-12% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), transferred to a nitrocellulose membrane and stained for haem-dependent peroxidase activity as described previously (Vargas *et al.*, 1993) by using the chemiluminiscence detection kit “Super Signal” (Pierce).

β-Galactosidase assays. Cells were grown aerobically in PSY medium, collected by centrifugation at 8,000 g for 10 min at 4 °C, washed twice with YEM, and finally incubated anaerobically in the same medium supplemented or not with KNO₃. Cultures with an initial OD₆₀₀ of about 0.2 were incubated for 2 days. Activity was determined with permeabilized cells from at least three independently grown cultures as previously described (Miller, 1972). Cells removed from stoppered flasks were not kept microaerobic but were used immediately for assays.

Analytical methods. Protein concentration was estimated by using the Bio-Rad assay (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca) with a standard curve of varying bovine serum albumin concentrations.

3.4. RESULTS AND DISCUSSION .

Cytochrome analysis in a *cycA* mutant strain 3447. Previous work from our group demonstrated that inactivation of *B. japonicum cycA* gene, encoding cytochrome *c*₅₅₀, decreases expression of *B. japonicum* FixP and FixO haem *c*-stained components of the *cbb*₃ oxidase, as well as oxygen consumption rates, after 2 days nitrate-dependent anaerobic growth (Bueno *et al.*, 2008). These results allowed us to suggest that *B. japonicum* cythochrome *c*₅₅₀ may be involved in electron transport to the *cbb*₃ oxidase. Since *cbb*₃ oxidase is involved in oxygen respiration under microaerobic conditions and the experiments mentioned above were performed under denitrifying conditions, in this work we have analyzed FixP and FixO levels in the *cycA* mutant incubated under low oxygen

conditions in the absence of nitrate, where only the *cbb₃* pathway is induced. As shown in Figure 3.1 (lane 1), after 2 days incubation under low oxygen conditions without nitrate, 32 and 28 kDa proteins corresponding to FixP and FixO (Preisig et al. 1993), respectively, were fully expressed in wild type cells. Cytochrome *c*₁ (Thöny-Meyer *et al.*, 1989) of 28 kDa co-migrating with FixO and cytochrome CycM (Bott *et al.*, 1991) were also present in membranes from 110*spc4* cells (Fig. 3.1, lane 1). As expected (Preisig et al. 1993), expression of FixP and FixO was very weak in the *B. japonicum* strain 3613 mutated in the *fixNOQP* operon responsible for the synthesis of the *cbb₃* oxidase (Fig. 1, lane 3). However, in cells of the *cycA* mutant, expression levels of these haem *c* components of the *cbb₃* oxidase were very similar to those detected in wild type cells (Fig. 3.1, lanes 1 and 2). These results are different to those observed by Bueno *et al.*, (2008) in cells grown under low oxygen conditions with nitrate, and suggest that cytochrome *c*₅₅₀ is not involved in FixP and FixO expression when cells are grown without nitrate where only the O₂ respiration pathway is working.

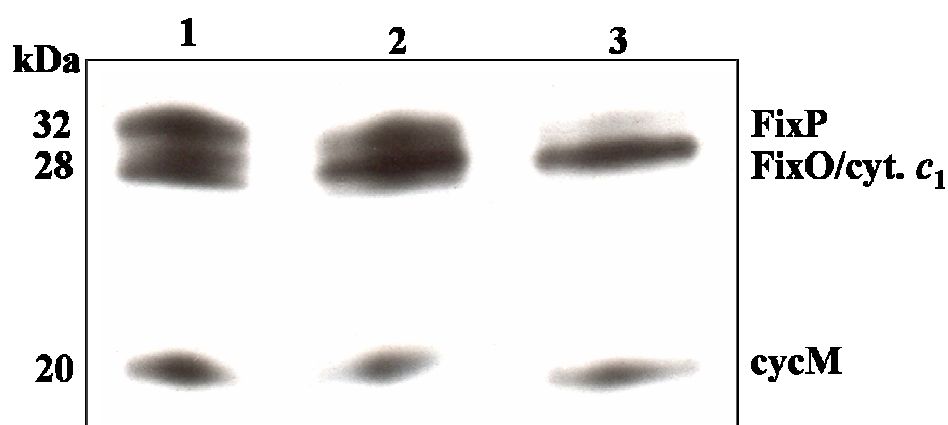


Figure 3.1. Haem-stained proteins in membranes prepared from wild type *B. japonicum* 110*spc4* (lane 1), and *cycA* 3447 (lane 2), and *fixN* 3613 (lane 3) mutant strains incubated anaerobically in YEM medium for 2 days. The proteins of 32 and 28 kDa have been identified previously as the *B. japonicum* FixP and FixO components of the *cbb₃*-type, high-affinity cytochrome oxidase. The 20 kDa cytochrome corresponds to CycM, a membrane-bound *c*-type cytochrome which transfers electrons from *bc*₁ to cytochrome *aa*₃. Cytochrome *c*₁ identified previously is also specified at the right margin. Each lane contains

about 25 μg membrane proteins. Apparent masses of the proteins (kDa) are shown at the left margin.

In addition to the FixP and FixO membrane-anchored *c*-type cytochromes, *B. japonicum* cytochrome *cbb*₃ oxidase contains a membrane-integral *b*-type cytochrome corresponding to FixN (Preisig *et al.*, 1993; Zufferey *et al.*, 1996). In this work, the presence of heme C and heme B in the *cycA* mutant strain 3447 was also investigated spectroscopically. Solubilized proteins from membrane fractions isolated from cells incubated anaerobically in the presence or in the absence of nitrate were used in these experiments. As shown in previous work (Preisig *et al.*, 1996, Zufferey *et al.*, 1996), peaks characteristics for cytochrome *b* at 558 nm and for cytochrome *c* at 552 nm were detected in membranes from wild type cells incubated under low oxygen conditions either in the absence or in the presence of nitrate (Fig. 3.2a and b). Dithionite-reduced *minus* ferricnide-oxidized difference spectra of membranes from *cycA* cells incubated anaerobically with nitrate showed a significant decrease in cytochrome *b* and *c* contents compared with the parental strain (Fig. 3.2a). In cells incubated anaerobically without nitrate, no differences in cytochromes *c* and *b* composition were observed between the wild type and *cycA* mutant strains (Fig. 3.2b). These results support the haem-staining results and demonstrate a defect in cytochromes *c* and *b* contents in the *cycA* mutant but only when cells were incubated anaerobically in the presence of nitrate.

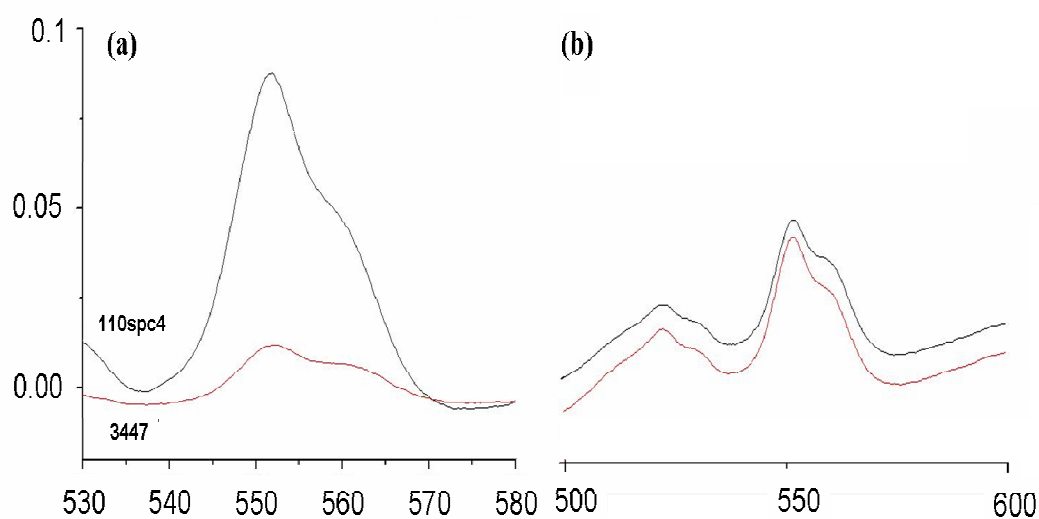


Figure 3.2. Visible absorption difference spectra (dithionite-reduced *minus* air oxidized). Membrane proteins ($3 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) solubilized with dodecyl maltoside were isolated from wild type *B. japonicum* 110spc4 and *cycA* mutant strain 3447. Cells were incubated in YEM medium with (a) or without (b) 10 mM KNO_3^- for 2 days.

Cytochrome *c* oxidase activity and *cbb*₃ expression in a *cycA* mutant strain 3447. In order to further investigate the involvement of cytochrome *c*₅₅₀ in *cbb*₃ expression, cytochrome *c*-dependent oxidase activity was analyzed in cells of the *cycA* mutant strain 3447 incubated anaerobically with or without nitrate for 2 days. Cytochrome *c*-dependent oxygen consumption was tested with an oxygen electrode by using ascorbate-reduced TMPD as an artificial electron donor (Fig. 3.3a). The *cycA* deficient strain 3447, showed similar levels of TMPD oxidase activity than those showed by the wild type strain 110spc4 when cells were incubated under low oxygen conditions without nitrate (Fig. 3.3a). However, when cells were incubated under anaerobic conditions with nitrate, oxygen consumption rates of *cycA* cells were 1.8-fold lower than those of wild-type cells (Fig. 3.3a). As described previously (Preisig *et al.*, 1993), TMPD-oxidase activity in cells of the *fixN* mutant strain 3613 was significantly lower than that of the wild type cells either in the presence (88 %) or in the absence (67%) of nitrate in the incubation medium (Fig. 3.3a).

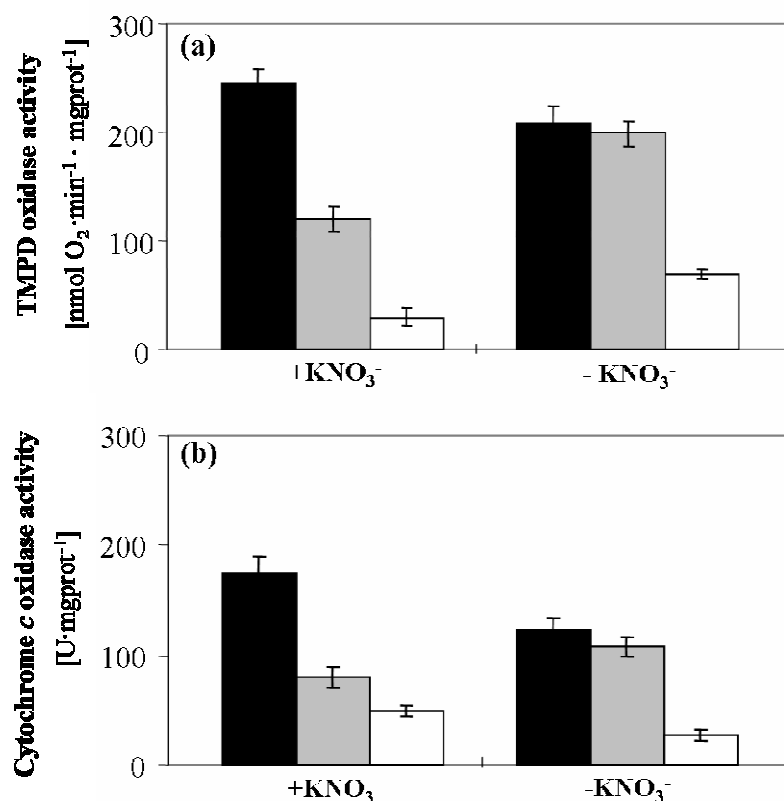


Figure 3.3. (a) Oxygen consumption rates and (b) cytochrome c oxidase activity of whole cells (a) and membranes (b) from *B. japonicum* 110spc4 (black bar), *cycA* 3447 (grey bar) and *fixN* 3613 (white bar) strains. Cells were incubated anaerobically in YEM medium with or without 10 mM KNO₃⁻ for 2 days. Data are means \pm standard error from at least two different cultures, assayed in triplicate. Cytochrome c oxidase activity (b) is expressed in U · mgprot⁻¹ of protein where 1 U is defined as the amount required to oxidize 1.0 μ mol of ferrocyanochrome c per minute at pH 7.0 at 25°C.

In addition to TMPD-dependent oxygen consumption activity, we have also measured cytochrome c oxidase activity with reduced horse heart cytochrome c as electron donor (Fig. 3.3b). Similarly as with TMPD, no significant differences in oxidase activity were observed between wild type and *cycA* cells incubated anaerobically without nitrate, whereas a 55% decrease in oxidase activity relative to wild type activity was observed when cells of strain 3447 were grown anaerobically with nitrate as terminal electron acceptor (Fig. 3.3b).

As expected, a significant reduction of cytochrome *c* oxidase activity was observed in membranes from *fixN* cells independently of the presence or not of nitrate in the incubation medium (Fig. 3.3b). As suggested from cytochromes content results presented in Figures 3.1 and 3.2, these results indicate that a *cycA* mutation does not affect cytochrome *c* oxidase activity in cells incubated under low oxygen conditions without nitrate. However, oxidase activity was significantly inhibited in a *cycA* mutant strain when cells were cultured under denitrifying conditions.

Similarly as observed in Figures 3.3a and b, after 2 days incubation under anaerobic conditions with nitrate, cells of a *cycA* mutant strain 1406, containing a *fixP*'-'*lacZ* chromosomally integrated translational fusion, showed about 6.6-fold decreased levels of β -galactosidase activity compared to those detected in wild type cells containing the *fixP*'-'*lacZ* fusion (Fig. 3.4). However, similar expression levels were observed for the *fixP*'-'*lacZ* reporter fusion in the *cycA* and wild type cells after incubation under low oxygen conditions without nitrate (Fig. 3.4).

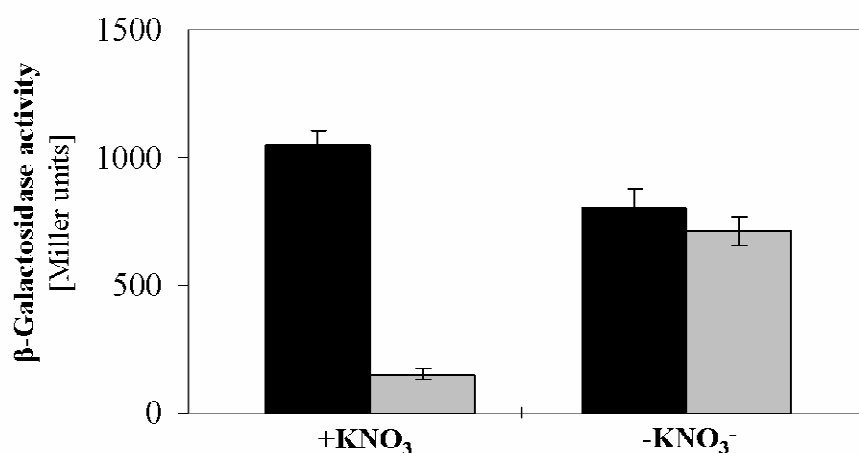


Figure 3.4. β -galactosidase activity from a *fixP*'-'*lacZ* fusion in wild type *B. japonicum* 3604 (black bar) and *cycA* 1406 (grey bar) strains. Cells were incubated anaerobically in YEM medium with and without 10 mM KNO₃⁻ for 2 days. Data are means \pm standard error from at least two different cultures, assayed in triplicate.

In summary, the results from heme stains (Fig. 3.1), visible light spectroscopy (Fig. 3.2), cytochrome c oxidase activity (Fig. 3.3) and *fixP'*-*lacZ* expression (Fig. 3.4) of a *cycA* mutant incubated under low oxygen conditions without nitrate suggest that, *c*₅₅₀ is not involved in *B. japonicum cbb*₃ oxidase expression during microaerobic respiration. Similarly as observed by using TMPD as electron donor, no differences in O₂ consumption rates were observed between the wild type and *cycA* cells when succinate was used as *in vivo* electron donor (data not shown). These results suggest that cytochrome *c*₅₅₀ is not an electron donor to the *B. japonicum cbb*₃ oxidase. By contrary, in *Rhodobacter sphaeroides* (Daldal *et al.*, 2001) and *Rhodobacter capsulatus* (Swem *et al.*, 2001), it has been found that homologous cytochromes to *B. japonicum c*₅₅₀, cytochrome *c*₂ and *c*_y, are involved in the electrons transport to the *cbb*₃ terminal oxidase under microaerobic respiration. In *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c*₅₅₀ is the electron donor to both cytochrome c oxidases *aa*₃ and *cbb*₃ and to at least the nitrite reductase during denitrification (Otten *et al.*, 2001a).

Results from figures 3.1, 3.2, 3.3 and 3.4 also show that, under denitrifying conditions, a mutation in *cycA* has a negative effect in expression and activity of the *B. japonicum cbb*₃ oxidase. It has been shown previously (Bueno *et al.*, 2008) that cytochrome *c*₅₅₀ is the electron mediator protein between cytochrome *bc*₁ complex and the Cu-containing respiratory nitrite reductase in *B. japonicum*. It may be possible that changes in the electron transfer pathway associated to the denitrification process might ultimately control *cbb*₃ expression.

Effect of *napC* mutation, myxothiazol and carbon sources on *cbb*₃ expression. If we assume that inactivation of the *c*₅₅₀ electron carrier of the denitrification pathway generates a change in the redox state of the cell, we can then ask if inactivation of others electron carriers of this pathway may have the same effect on *cbb*₃ expression. This is the case of NapC, which transfers electrons to the NapAB complex of the periplasmic nitrate reductase (Delgado *et al.*, 2003) or the *bc*₁ complex which transfers electrons to the electron mediator cytochrome *c*₅₅₀ of some reductases from the denitrification pathway such as the

Cu-containing nitrite reductase (Bueno *et al.*, 2008). To check this hypothesis, we examined *cbb₃* expression in a *B. japonicum* strain mutated in the *napC* gene. As shown in Figure 3.5, very low levels of haem-*c* stained FixP and FixO proteins as well as of β -galactosidase activity from a *fixP*'-'*lacZ* translational fusion were observed in the *napC* mutant strains 0609 and 2300, respectively, after 2 days incubation under anaerobic conditions with nitrate compared with those found in the wild type strain 110*spc4* (Fig 3.5a and b, lanes 1 and 3). As observed previously (Bueno *et al.*, 2008), *cbb₃* expression was also highly reduced in the *cycA* mutant (Fig. 3.5a and b, lane 2).

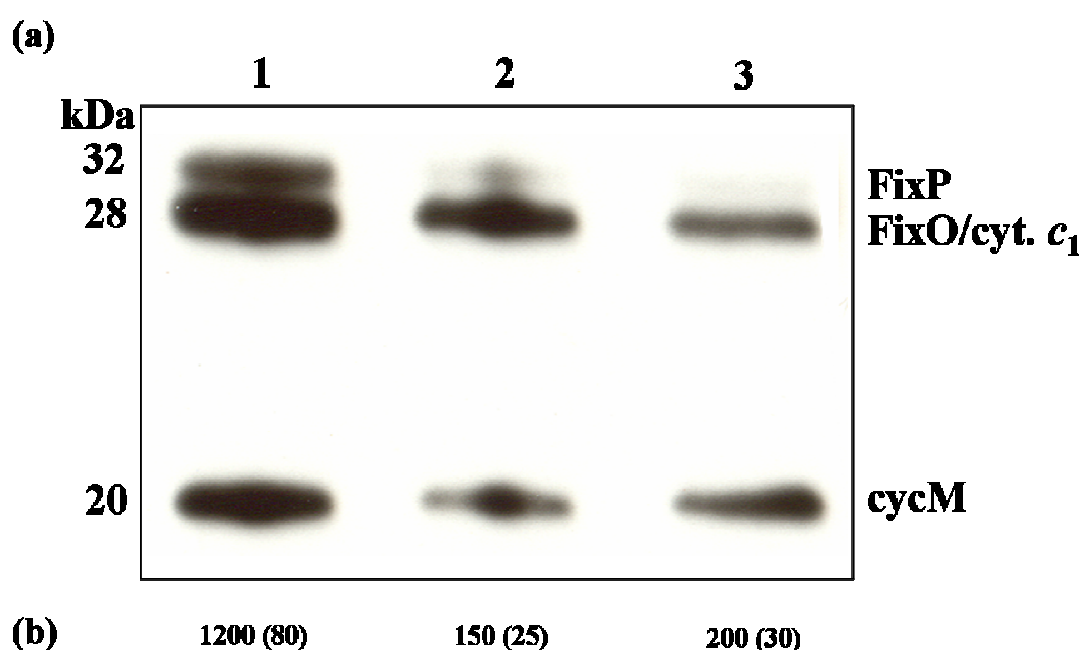


Figure 3.5. (a) Haem-stained proteins in membranes prepared from wild type *B. japonicum* 110*spc4* (lane 1), *cycA* 3447 (lane 2), and *napC* 0609 (lane 3) mutant strains. Cells were incubated anaerobically in YEM medium supplemented with 10 mM KNO_3^- for 2 days. Each lane contains about 25 μg membrane proteins. Apparent masses of the proteins (kDa) are shown at the left margin. (b) β -galactosidase activity from a *fixP*'-'*lacZ* fusion in wild type *B. japonicum* 3604 (lane 1), *cycA* 1406 (lane 2) and *napC* 2300 (lane 3) strains. Data, in Miller units, are shown as means, with the standard error of the mean in parentheses, for at least two cultures which were assayed in triplicate.

The effect of carbon sources on *fixP'*-*lacZ* expression was also studied in *B. japonicum* 110*spc4*. Cells were grown anaerobically with nitrate as electron acceptor in a minimum medium containing reduced carbon sources such as butyrate, or oxidized carbon sources such as malate or succinate. After 2 days growth, β -galactosidase activity observed in wild type cells grown on butyrate, was about three times lower than that observed when cells were cultured on malate or succinate (Fig. 3.6). It is known that assimilation of reduced carbon substrates, which generates more reducing equivalents than assimilation of oxidized carbon sources, increases the reduction state of the UQ-pool (Richardson and Ferguson, 1992). Results shown in Figure 3.6 suggest that a change in the redox status of the UQ/UQH₂ pool might be involved in the regulation of *cbb*₃ expression.

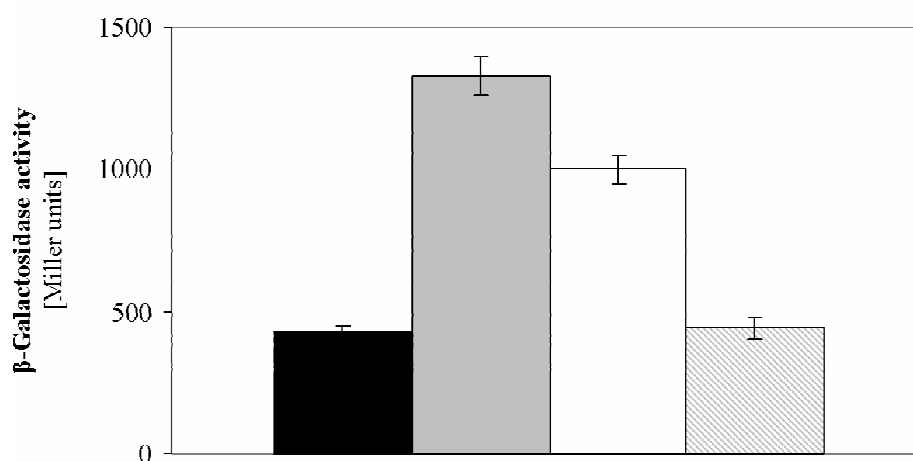


Figure 3.6. β -galactosidase activity from a *fixP'*-*lacZ* fusion in *B. japonicum* 110*spc4* grown on butyrate (black bar), malate (grey bar), or succinate (white bar) and on malate as carbon substrate supplemented with 50 μ M of myxothiazol (grey hatched bar). Cells were incubated anaerobically in minimum Bergersen medium with nitrate for 2 days. Data are means \pm standard error from at least two different cultures, assayed in triplicate.

Gene expression mediated by oxidation state of carbon substrate has been reported in *Paracoccus pantotrophus* (Richardson & Ferguson, 1992, Sears *et al.*, 2000; Ellington *et al.*, 2002; Ellington *et al.*, 2006), and *Paracoccus denitrificans* (Sears *et al.*, 1997). In both

species, expression of the *nap* operon, encoding the periplasmic nitrate reductase, is maximal when cells are grown aerobically with a reduced carbon source such as butyrate. The different response to carbon substrates between *Paracoccus nap* and *B. japonicum* *fixNOQP* operons is due to the different role of those genes. While Nap is involved in the dissipation of excess redox energy during oxidative metabolism of reduced carbon substrates, cytochrome *c* oxidase *cbb₃* supports microaerobic respiration.

In this work, we also examined the effect of the cytochrome *bc₁* complex-specific inhibitor myxothiazol upon *cbb₃* expression in the wild-type strain grown anaerobically in minimum medium with malate as carbon source and nitrate as electron acceptor. As shown in Figure 3.6, *fixP*'-*lacZ* expression was about 3-fold lower in the presence of 45 μ M myxothiazol than that observed in the absence of myxothiazol.

As suggested above, interruption of the electron flow through the denitrification pathway by inactivation of the electron carriers located downstream of the quinone pool such as NapC, *c₅₅₀*, or *bc₁* complex, might change the intracellular redox state preventing the generation of the activating signal for *cbb₃* expression. Alternatively, increased levels of reduced ubiquinone pool due to the lack of electrons flowing through denitrification pathway or to the assimilation of highly reduced carbon substrates may inhibit *cbb₃* expression. We propose that the intracellular changes occurred at UQ-pool level due to the alterations in the electron transport chain associated to the denitrification process might serve as activating or repressing signals for the regulation of *fixP* expression in *B. japonicum*. Supporting our hypothesis, it has been previously demonstrated in *Paracoccus denitrificans* (Otten *et al.*, 1999; Otten *et al.*, 2001b) that a change of electron distribution through the respiratory network, resulting from elimination of one or more oxidase genes, changes intracellular signals that affect the activity of the *cco* promoter, which controls expression of the *cbb₃*-type cytochrome *c* oxidase.

In *B. japonicum* it might be possible that perception and transduction of redox variations may be recognized by a regulatory protein which consequently control *cbb₃* expression, in order to decrease cell metabolism as a response to the high electron charge. The primary environmental factor that governs the expression of the *fixNOQP* genes in *B. japonicum* is

oxygen. Under microaerobic conditions, oxygen concentration is sensed by the FixLJ-FixK₂ oxygen responsive system which activates transcription of the *fixNOQP* operon (Nellen-Anthamatten *et al.*, 1998). In this work we propose that oxygen is not the only signal involved in the regulation of *fixNOQP* genes. Also intracellular signals derive from changes in the electron distribution that affects the redox state of the respiratory chain associated with the denitrification process may affect the expression of cytochrome *cbb₃* oxidase. These signals may enable *B. japonicum* to adapt its respiratory network in such a way that the network functions optimally at each given growth condition. However, the components of this regulatory system cannot be speculated upon at this stage.

Regulatory proteins that respond to intracellular changes have been described, e.g. CcoQ of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.2 involved in activation of photosynthesis gene expression (Eraso *et al.*, 2000), Aer and Tsr of *E. coli* both involved in aerotaxis (Rebbapragada *et al.*, 1997), ArcB of the two-component system ArcB/ArcA controlling aerobic respiration in *E. coli* (Luchi *et al.*, 1993). Aer and ArcB contain so-called PAS domains, which are cytoplasmically located sensors that monitor intracellular changes in oxygen, redox potential, light, small ligands, and the overall energetic level of a cell. Many PAS domain-containing proteins are involved in the control of respiratory networks, but how they interact with the electron-transport systems is unknown (Taylor *et al.*, 1999).

Other redox-responsive proteins, members of the family of two-component regulatory systems, are present in a large number of proteobacteria. These proteins are named RegSR in *Bradyrhizobium japonicum*, RegBA in *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodovulum sulfidophilum* and *Roseobacter denitrificans*, PrrBA in *Rhodobacter sphaeroides*, and ActSR in *Sinorhizobium meliloti* (Emmerich *et al.*, 2000a) and *Agrobacterium tumefaciens* (Baek *et al.*, 2008). In *Rhodobacter* species, the RegBA/PrrBA systems activate expression of genes for carbon dioxide fixation and nitrogen fixation, processes that utilize reducing equivalents, and repress expression of genes for hydrogen oxidation, a process that generates reducing equivalents (Elsen *et al.*, 2004). In *Rhodopseudomonas palustris*, RegSR represses uptake hydrogenase expression in a manner that is inversely correlated with the cellular demand for reducing equivalents (Rey *et al.*, 2006). Similarly, RegA of *R.*

capsulatus has been demonstrated to affect the expression of the *cbb₃* and cytochrome *bd*-type terminal respiratory oxidases (Swem et al., 2001). In *Pseudomonas aeruginosa* RoxR, a response regulator related to *Rhodobacter sphaeroides* PrrA, activates expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase (Comolli and Donohue, 2002). It has recently been discovered that RegB from *R. capsulatus* (Swem et al., 2005; Swem et al., 2006) or the ArcBA system in *E. coli* (Malpica et al., 2006) monitors the oxidation-reduction state of the Ubiquinone pool as an input signal to control kinase activity. By analogy with the well-elaborated sensing mechanisms of the orthologous two-component RegBA or the ArcBA systems, it seems attractive to speculate that the redox state of the membrane-localized quinone pool is an important cue also for *B. japonicum* RegSR.

In *B. japonicum*, RegSR activate the transcription of the nitrogen fixation regulatory gene *nifA*, thus forming a RegSR-NifA cascade which is part of a complex regulatory network for gene regulation in response to changing oxygen concentrations. Whole-genome transcription profiling analysis have demonstrated that expression of almost 250 genes is dependent on RegR, a result that underscores the important contribution of RegR to oxygen- or redox-regulated gene expression in *B. japonicum* (Lindemann et al., 2007). A consensus RegR binding motif (GCGGC-N₅-GTCGC, RegR-box) was proposed on an alignment of the RegR and RegA binding sites (Emmerich et al., 2000b). By using *in vitro* binding-site selection assay (SELEX), it has been demonstrated in *B. japonicum* that the sequence GCGGC-N₅-GTCGC, located around position -68 is essential for RegR-dependent expression of the *fixR-nifA* operon. Inspection of the DNA sequence upstream of the *fixNOQ* transcriptional start site (Mesa et al., 2005) revealed the presence of the sequence 5'-GCGGC-N₄-GCCGC-3' at position -108, which is very similar to the proposed RegR-box. These observations suggest that *B. japonicum fixNOQP* operon might be a target of RegR. Previous haem-staining analysis of a *B. japonicum regR* mutant incubated under denitrifying conditions, demonstrated that this strain was able to express similar levels of FixP and FixO proteins as the wild type strain (Bueno et al. 2008). Furthermore, *fixNOQP* genes were not identified as RegR targets in microarrays experiments (Lindemann et al., 2007). Whether or not other growth conditions producing redox potential variations in the cells are required to demonstrate the involvement of RegR in *fixNOQP*

redox control is under investigation.

3.5. REFERENCES

Bedmar E.J., Robles E.F. and Delgado M.J. 2005. The complete denitrification pathway of the symbiotic, nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. Biochem. Soc. Trans. 33: 141-4.

Bott M., Ritz D., and Hennecke H. 1991. The *Bradyrhizobium japonicum cycM* gene encodes a membrane-anchored homolog of mitochondrial cytochrome *c*. J. Bacteriol. 173: 6766-72.

Bott M., Preisig O., and Hennecke H. 1992. Genes for a second terminal oxidase in *Bradyrhizobium japonicum*. Arch. Microbiol. 158: 335-343.

Bott M., Thöny-Meyer L., Loferer H., Rossbach S., Tully R.E., Keister D., Appleby C.A. and Hennecke H. 1995. *Bradyrhizobium japonicum* cytochrome *c*₅₅₀ is required for nitrate respiration but not for symbiotic nitrogen fixation. J. Bacteriol. 177: 2214–2217.

Bueno E., Bedmar E.J., Richardson D.J., Delgado M.J. 2008. Role of *Bradyrhizobium japonicum* cytochrome *c*₅₅₀ in nitrite and nitrate respiration. FEMS Microbiol Lett. 279: 188-194.

Daldal F., Mandaci S., Winterstein C., Myllykallio H., Duyck K., Zannoni D. 2001. Mobile cytochrome *c*₂ and membrane-anchored cytochrome *c*_y are both efficient electron donors to the *cbb*₃- and *aa*₃-type cytochrome *c* oxidases during respiratory growth of *Rhodobacter sphaeroides*. J. Bacteriol. 183:2013-24.

Delgado M.J., Bedmar E.J., Downie J.A. 1998. Genes involved in the formation and assembly of rhizobial cytochromes and their role in symbiotic nitrogen fixation. Adv. Microb. Physiol. 40: 191-231.

Delgado M.J., Bonnard N., Tresierra-Ayala A., Bedmar E.J., Müller P. 2003. The *Bradyrhizobium japonicum napEDABC* genes encoding the periplasmic nitrate reductase are essential for nitrate respiration. *Microbiology*, 149: 3395-403.

Ellington M.J., Fosdike W.L., Sawers R.G., Richardson D.J., and Ferguson S.J. 2006. Regulation of the *nap* operon encoding the periplasmic nitrate reductase of *Paracoccus pantotrophus*: delineation of DNA sequences required for redox control. *Arch. Microbiol.* 184: 298-304.

Ellington M. J. K., Bhakoo K. K., Sawers G., Richardson D. J. and Ferguson, S. J. 2002. Hierarchy of carbon source selection in *Paracoccus pantotrophus*: strict correlation between reduction state of the carbon substrate and aerobic expression of the *nap* operon. *J. Bacteriol.* 184: 4767–4774.

Elsen S., Swem L. R., Swem D.L., and Bauer C. E. 2004. RegB/RegA, a highly conserved redox-responding global two-component regulatory system. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 263-79.

Emmerich R., Hennecke H., Fischer H.M. 2000a. Evidence for a functional similarity between the two-component regulatory systems RegSR, ActSR, and RegBA (PrrBA) in alpha-Proteobacteria. *Arch. Microbiol.* 174:307-13.

Emmerich R., Strehler P., Hennecke H., Fischer H.M. 2000b. An imperfect inverted repeat is critical for DNA binding of the response regulator RegR of *Bradyrhizobium japonicum*. *Nucleic Acids Res.* 28: 4166-71.

Eraso J.M. and Kaplan S. 2000. From redox flow to gene regulation: role of the PrrC protein of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Biochemistry* 39: 2052-2062.

Comolli J.C., and Donohue, T.J. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* RoxR, a response regulator related to *Rhodobacter sphaeroides* PrrA, activates expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase. *Mol. Microbiol.* 45: 755–768.

Kim Y.J., Ko I.J., Lee J.M., Kang H.Y., Kim Y.M., Kaplan S., and Oh J.I. 2007. Dominant role of the *cbb₃* oxidase in regulation of photosynthesis gene expression through the PrrBA system in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *J. Bacteriol.* 189:5617-25.

Lindemann A., Moser A., Pessi G., Hauser F., Friberg M., Hennecke H., Fischer H.M. 2007. New target genes controlled by the *Bradyrhizobium japonicum* two-component regulatory system RegSR. *J. Bacteriol.* 189 :8928-43.

Luchi, S. & Lin, E.C.C. 1993. Adaptation of *Escherichia coli* to redox environments by gene expression. *Mol. Microbiol.* 9: 9–15.

Malpica, R., Sandoval, G.R., Rodriguez, C., Franco B., and Georgellis, D. 2006. Signalling by the Arc two-component system provides a link between the redox state of the quinone pool and gene expression. *Antiox. Redox Signal.* 8: 781-795.

Mandon, K., Kaminski P. A., and Elmerich C. 1994. Functional analysis of the *fixNOQP* region of *Azorhizobium caulinodans*. *J. Bacteriol.* 176: 2560–2568.

Mesa S., Bedmar E. J., Chanfon A., Hennecke H. and Fisher H. M.. 2003. *Bradyrhizobium japonicum* NnrR, a denitrification regulator, expands the FixLJ-FixK₂ regulatory cascade. *Journal of Bacteriology.* 185:3978-3982.

Mesa S., Ucurum Z., Hennecke H., Fischer H.M. 2005. Transcription activation in vitro by the *Bradyrhizobium japonicum* regulatory protein FixK₂. *J. Bacteriol.* 187: 3329-38.

Miller, J. H. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Myllykallio H., and Liebl U. 2000. Dual role for cytochrome *cbb*₃ oxidase in clinically relevant proteobacteria? Trends Microbiol. 8: 542-3.

Nellen-Anthamatten D., Rossi P., Preisig O., Kullik I., Babst M., Fischer H. M. and Hennecke H. 1998. *Bradyrhizobium japonicum* FixK₂, a crucial distributor in the FixLJ-dependent regulatory cascade for control of genes inducible by low oxygen levels. J. Bacteriol. 180: 5251–5255.

Oh J.I., Kaplan S. 1999. The *cbb*₃ terminal oxidase of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: structural and functional implications for the regulation of spectral complex formation. Biochemistry, 38: 2688 -2696.

Oh J.I., Kaplan S. 2002. Oxygen adaptation. The role of the CcoQ subunit of the *cbb*₃ cytochrome *c* oxidase of *rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 J. Biol. Chem. 277:16220-16228.

Otten, M.F., Reijnders, W.N.M., Bedaux, J.J.M., Westerhoff, H.V., Krab, K. & Van Spanning, R.J.M. 1999. The reduction state of the Q-pool regulates the electron flux through the branched respiratory network of *Paracoccus denitrificans*. Eur. J. Biochem. 261, 767-774.

Otten M.F., van der Oost J., Reijnders W.N., Westerhoff H.V., Ludwig B., Van Spanning R.J. 2001a. Cytochromes *c*₅₅₀, *c*₅₅₂, and *c*₁ in the electron transport network of *Paracoccus denitrificans*: redundant or subtly different in function?. J. Bacteriol. 183: 7017-26.

Otten M.F., Stork D.M., Reijnders W.N., Westerhoff H.V., Van Spanning R.J. 2001b. Regulation of expression of terminal oxidases in *Paracoccus denitrificans*. Eur. J. Biochem. 268:2486-97.

Pitcher R.S., Brittain T., and Watmough N.J. 2002. Cytochrome *cbb*₃ oxidase and bacterial microaerobic metabolism. *Biochem. Soc. Trans.* 30:653-8.

Preisig O., Nellen-Anthamatten D. and Hennecke H. 1993. Genes for a microaerobically induced oxidase complex in *Bradyrhizobium japonicum* are essential for a nitrogen-fixing endosymbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3309–3313.

Preisig O., Zufferey R., Thöny-Meyer L., Appleby C.A., and Hennecke H. 1996. A high-affinity *cbb*₃-type cytochrome oxidase terminates the symbiosis-specific respiratory chain of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 178:1532-8.

Rebbapragada, A., Johnson, M.S., Harding, G.P., Zuccarelli, A.J., Fletcher, H.M., Zhulin, I.B. & Taylor, B.L. 1997. The Aer protein and the serine chemoreceptor Tsr independently sense intracellular energy levels and transduce oxygen, redox, and energy signals for *Escherichia coli* behavior. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 94: 10541-10546.

Rey F.R., Oda Y., and Harwood C. S. 2006. Regulation of uptake hydrogenase and effects of hydrogen utilization on gene expression in *Rhodospseudomonas palustris*. *J. Bacteriol.* 188: 6143–6152.

Richardson D. J. and Ferguson S. J. 1992. The influence of carbon substrate on the activity of the periplasmic nitrate reductase in aerobically grown *Thiosphaera pantotropha*. *Arch. Microbiol.* 157: 535-537

Richardson D.J. 2000. Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. *Microbiology* 146: 551-571.

Robles E.F., Sanchez C., Delgado M.J. & Bedmar E.J. 2006. The *Bradyrhizobium japonicum napEDABC* genes are controlled by the FixLJ–FixK₂–NnrR regulatory cascade. *Biochem. Soc. Trans.* 34: 108–110.

Sears H.J., Little P.J., Richardson D.J., Berks B.C., Spiro S., Ferguson S.J. 1997. Identification of an assimilatory nitrate reductase in mutants of *Paracoccus denitrificans* GB17 deficient in nitrate respiration. Arch. Microbiol. 167:61-6.

Sears, H. J., Sawers, G., Berks, B. C., Ferguson, S. J. & Richardson, D. J. 2000. Control of periplasmic nitrate reductase gene expression *napEDABC* from *Paracoccus pantotrophus* in response to oxygen and carbon substrates. Microbiology. 146:2977–2985.

Simon R., Priefer U. and Pühler, A. 1983. Vector plasmids for *in vivo* and *in vitro* manipulation of Gram-negative bacteria. Molecular Genetics of the Bacteria–Plant Interaction. 98–106. Edited by A. Pühler. Heidelberg: Springer.

Surpin M.A., Lübben M., Maier R.J. 1996. The *Bradyrhizobium japonicum* *coxWXYZ* gene cluster encodes a *bb*₃-type ubiquinol oxidase. Gene, 183: 201-206.

Swem LR, Elsen S, Bird TH, Swem DL, Koch HG, Myllykallio H, Daldal F, Bauer CE. 2001. The RegB/RegA two-component regulatory system controls synthesis of photosynthesis and respiratory electron transfer components in *Rhodobacter capsulatus*. J Mol. Biol. 309: 121-38.

Swem D.L., Swem L.R., Setterdahl A., Bauer C.E. 2005. Involvement of SenC in assembly of cytochrome *c* oxidase in *Rhodobacter capsulatus*. J. Bacteriol. 187: 8081-7.

Swem L.R., Gong X., Yu C.A., Bauer C.E. 2006. Identification of a ubiquinone-binding site that affects autophosphorylation of the sensor kinase RegB. J. Biol. Chem. 281: 6768-75.

van Spanning R.J., M.J. Delgado and D.J. Richardson. 2005. The nitrogen cycle: denitrification and its relationship to N₂ fixation. In: Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology and the environment, (eds. D. Werner and W. E. Newton). The Netherlands, pp. 277-342.

Van Spanning, R.J., Richardson D. J. and Ferguson S.J. 2007. Introduction to the biochemistry and molecular biology of denitrification. In: *Biology of the nitrogen cycle*, (eds. Bothe H. Ferguson S.J. and Newton W. E). Elsevier, pp. 3-20.

Taylor B.L. and Zhulin, I.B. 1999. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 479-506.

Thöny-Meyer L., Stax D., and Hennecke H. 1989. An unusual gene cluster for the cytochrome *bc*₁ complex in *Bradyrhizobium japonicum* and its requirement for effective root nodule symbiosis. *Cell.* 57: 683-697.

Vairinhos F., Wallace W. and Nicholas D.J.D. 1988. Simultaneous assimilation and denitrification of nitrate by *B. japonicum*. *J. Gen. Microbiol.* 135: 189–193.

Velasco L., Mesa S., Delgado M.J. & Bedmar E.J. 2001. Characterization of the *nirK* gene encoding the respiratory, Cu-containing nitrite reductase of *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1521 :130–134.

Velasco L., Mesa S., Xu C.A., Delgado M.J. & Bedmar E.J. 2004. Molecular characterization of *nosRZDFYLX* genes coding for denitrifying nitrous oxide reductase of *Bradyrhizobium japonicum*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 85: 229–235.

Vincent, J. M. 1974. Root-nodule symbioses with *Rhizobium*. *Biology of Nitrogen Fixation.* 265–341. Edited by A. Quispel. New York, NY: American Elsevier Publishing Co.

Zufferey R., O. Preisig H. Hennecke and L. Thöny-Meyer. 1996. Assembly and function of the cytochrome *cbb*₃ oxidase subunits in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Biol. Chem.* 271: 9114-9.

Zumft. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 533-616.

Capítulo 4

**The NifA regulatory protein is involved in
the regulation of denitrification genes in**

Bradyrhizobium japonicum

4.1. ABSTRACT.

Denitrification in *Bradyrhizobium japonicum* is catalyzed by the products of *napEDABC*, *nirK*, *norCBQD* and *nos nosRZDYFLX* genes which encode reductases for nitrate, nitrite, nitric oxide and nitrous oxide, respectively. Microaerobic induction of the denitrification genes depends on the *fixLJ* and *fixK₂* genes, whose products form the FixLJ-FixK₂ regulatory cascade. In *B. japonicum*, a second oxygen-responsive regulatory cascade mediated by the nitrogen fixation regulatory protein, NifA, has been described. In this study, we have shown that cells of a *B. japonicum nifA* mutant are impaired in growth under anaerobic conditions with nitrate. Mutation of *nifA* also led to a decreased expression of *napEDABC* and *nirK* genes as well as to an impairment of MV⁺-dependent nitrate and nitrite reductase activities, after incubation under anaerobic conditions with nitrate. Furthermore, expression of the membrane-bound *c*-type cytochrome NapC is highly reduced in the *nifA* mutant strain. The promoter region of the *B. japonicum nirK* gene has been characterized by primer extension. A major transcript initiates 40.5 bp downstream of the axis of symmetry of a putative FixK₂ binding site, which overlaps with a putative NifA-like binding site. Levels of the *nirK* transcripts are highly reduced in the *nifA* mutant strain. Taken together, these results demonstrate that NifA is required for maximal expression of the *napEDABC* and *nirK* denitrification genes in cells incubated under low oxygen conditions and in the presence of nitrate. We propose a novel involvement of the nitrogen fixation NifA regulatory protein on the expression of the *B. japonicum* denitrification genes.

4.2. INTRODUCTION.

Genera *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium*, and *Sinorhizobium* collectively referred to as rhizobia, are members of the *Rhizobiales* order of the α -proteobacteria (Sawada *et al.*, 2003). They are Gram-negative soil bacteria with the unique ability to establish a nitrogen-fixing symbiosis on legume roots, and on the stems of some aquatic legumes. As free-living cells, rhizobia are aerobic microorganisms with branched electron transport chains terminating with oxidases that have different affinities for oxygen which allow the cells to customize their respiratory systems to meet the demands of the oxygen concentration in the environment (Delgado *et al.*, 1998). Whereas the oxygen concentration in air-saturated water is about 250 μ M, in nodules it is extremely low, ranging from 3 to 22 nM (Hunt and Layzell, 1993). Because of that, expression of nitrogen fixation genes and symbiosis-related genes requires low oxygen conditions (Fischer, 1994). Perception and transduction of the low-oxygen signal are mediated by conserved regulatory proteins that are integrated into species-specific networks in different rhizobia (Fischer, 1994; Dixon and Kahn, 2004). Two interlinked oxygen-responsive regulatory cascades are present in the soybean symbiont *Bradyrhizobium japonicum*, the FixLJ-FixK₂ cascade and the RegSR-NifA cascade (Sciotti *et al.* 2003). In the FixLJ-FixK₂ cascade, the “low-oxygen” signal is sensed by the oxygen-inhibitible, haem-based sensor kinase FixL, which phosphorylates itself and transfer the phosphoryl group to the FixJ response regulator. The only known target of FixJ in *B. japonicum* is *fixK₂*, whose product, FixK₂, belongs to the CRP (cAMP receptor protein) and FNR (fumarate and nitrate reductase) activator protein superfamily of transcription factors that trigger physiological changes in response to a variety of metabolic and environmental signals (Zumft, 2002; Körner *et al.*, 2003). FixK₂ has been shown to activate genes involved in anaerobic or microaerobic energy metabolism, including the denitrification genes (Bedmar *et al.*, 2005), *fixNOQP* and *fixGHIS* operons for the synthesis of a high-affinity *cbb₃*-type terminal oxidase (Nellen-Anthametten *et al.*, 1998), the heme biosynthetic genes *hema* (Page *et al.*, 1995), *hemN₁₊₂* (Fischer *et al.*, 2001), and possibly *hemB* (Chauhan and O’Brian, 1997), the *hup* genes coding for a symbiotic uptake hydrogenase (Durmowicz and Maier, 1998), and the *rpoN₁*

gene encoding σ^{54} , the specialized σ factor (Nellen-Anthamatten *et al.*, 1998). Although the environmental signal for the RegSR two-component system is not yet known (Bauer *et al.*, 1998), the activity of the transcriptional activator NifA is directly affected by oxygen status (Fischer, 1996; Sciotti *et al.* 2003). Induction of this second pathway is mediated by the RegSR two-components regulatory system which after activation by a phosphorylation process induces the *fixRnifA* operon expression, which encodes the NifA regulatory protein. Transcription of this operon is controlled by two overlapping promoters, *fixRp₁* and *fixRp₂*, induced in anaerobiosis and aerobiosis conditions mediated by NifA and σ^{54} and by RegSR, respectively (Barrios *et al.*, 1995; Barrios *et al.*, 1998). NifA activates gene expression in concert with the RNA polymerase containing σ^{54} , which, in *B. japonicum*, is encoded by two highly similar, functionally equivalent genes (*rpoN₁* and *rpoN₂*, Kullik *et al.*, 1991). Thus, RpoN₁ represents a link between the two regulatory cascades (Sciotti *et al.* 2003). Among the targets of NifA are *nif* genes directly involved in nitrogen fixation and also the *fixRnifA* operon, which is subjected to NifA-dependent auto-regulation under low oxygen conditions (Fischer, 1996, Bauer *et al.*, 1998). Furthermore, NifA controls expression of the *fixA* and *fixBCX* genes, also essential for nitrogen fixation. Recent studies by using microarrays led to a substantial expansion of the NifA regulon size, culminating in a total of 65 genes for nitrogen fixation and diverse other processes (Hauser *et al.*, 2007).

In addition to fix nitrogen in symbiosis with soybeans, *B. japonicum* is able to grow and reduce nitrate to N₂ through denitrification when cultured under oxygen-limiting conditions with nitrate as the terminal electron acceptor (Vairinhos *et al.*, 1988). The complete denitrification pathway consists in the sequential reduction of nitrate (NO₃⁻) or nitrite (NO₂⁻) to dinitrogen (N₂), through the intermediates nitric oxide (NO) and nitrous oxide (N₂O) in a four-reaction process catalysed by nitrate-, nitrite-, nitric oxide- and nitrous oxide-reductase, respectively. Reviews covering the physiology, biochemistry and molecular genetics of denitrification have been published elsewhere (Zumft *et al.*, 1997; van Spanning *et al.*, 2005 and 2007). In *B. japonicum*, denitrification reactions are catalysed by the products of *napEDABC* (Delgado *et al.*, 2003), *nirK* (Velasco *et al.*, 2001), *norCBQD* (Mesa *et al.*, 2002) and *nosRZDYFLX* (Velasco *et al.*, 2004), which encode reductases for

nitrate, nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide, respectively. Similar to many other denitrifiers, expression of denitrification genes in *B. japonicum* requires both oxygen limitation and the presence of nitrate or a derived N oxide (NO_x). Microaerobic induction of transcription from the *nap*, *nir*, *nor* and *nos* promoter regions depends on the FixLJ-FixK₂ regulatory cascade (Bedmar *et al.*, 2005; Robles *et al.*, 2006). In addition to microaerobiosis, the presence of a NO_x is crucial for maximal expression of *B. japonicum* denitrification genes (Bedmar *et al.* 2005). N oxide-mediated induction of *nap*, *nir* and *nor* depends on NnrR, a protein with high similarity to FNR/CRP-type transcriptional regulators (Mesa *et al.*, 2003; Robles *et al.* 2006). NnrR expands the FixLJ-FixK₂ regulatory cascade by an additional control level which integrates the N-oxide signal required for maximal induction of the denitrification genes.

Our own previous results suggested that maximal expression of denitrification genes occurs at a very low oxygen concentration when the *cbb*₃ oxidase has consumed the oxygen present in the growth medium (Bueno *et al.*, 2008). These observations allowed us to propose that, in addition to the FixLJ-FixK₂ regulatory system, the NifA regulatory protein induces gene expression at a very low oxygen concentration (Sciotti *et al.*, 2003) and it might be involved in the expression of denitrification genes. In this work, we demonstrate that NifA is required for maximal induction of *napEDABC* and *nirK* genes suggesting a new role of this protein on the regulation of *B. japonicum* denitrification genes.

4.3. MATERIALS AND METHODS.

Bacterial strains and growth conditions. *Bradyrhizobium japonicum* 110spc4 (Regensburger & Hennecke, 1983) wild-type strain and *fixK*₂ 9043 (Nellen-Anthamatten *et al.*, 1998) and *nifA* A9 (Fischer *et al.*, 1986), mutant derivative strains were used in this study. Strains 0602 (Robles *et al.*, 2006) and 2498 (Mesa *et al.*, 2003) are wild-type *B. japonicum* strains containing a *napE-lacZ* and a *nirK-lacZ* transcriptional fusions, respectively. Strains 1108 (Robles *et al.*, 2006), and 2498K₂ (Mesa *et al.*, 2003) are *fixK*₂ mutant derivatives containing a *napE-lacZ* and *nirK-lacZ* transcriptional fusions, respectively. In this work, plasmids pBG0614 (Robles *et al.*, 2006) and pRJ2498 (Mesa *et al.*, 2003) containing a *napE-lacZ* and *nirK-lacZ* transcriptional fusions, respectively, were integrated by homologous recombination into the chromosome of the *nifA* mutant resulting in strains 1501 and 1502, respectively.

B. japonicum strains were grown aerobically in liquid batch cultures containing peptone-salts-yeast extract (PSY) medium (Regensburger & Hennecke, 1983) at 28 °C. Anaerobic batch cultures were kept at 30 °C in YEM medium (Vincent, 1974) supplemented with 10 mM KNO₃ in completely filled, rubber-stoppered serum bottles or tubes. Antibiotics were added to *B. japonicum* cultures at the following concentrations (µg ml⁻¹): spectinomycin 200, kanamycin, 200 and tetracycline 100. *E. coli* strains were cultured in Luria Bertani (LB) medium (Miller, 1972) at 37 °C. *E. coli* DH5α (Stratagene, Heidelberg) was used as host in standard cloning procedures and *E. coli* S17-1 (Simon *et al.*, 1983) served as the donor in conjugative plasmid transfer. The antibiotics used were (µg ml⁻¹): ampicillin, 200; gentamycin, 10; streptomycin, 20; spectinomycin, 20; kanamycin, 25 and tetracycline, 10. For primer extension experiments, an 878-bp *EcoRI/PstI* fragment from pRJ2498 (Mesa *et al.*, 2003) containing the promoter region of *nirK* was cloned into pBluescript KS (+) (Stratagene) resulting in plasmid pBG0103 (this work).

RNA isolation. Cells of *B. japonicum* were grown aerobically in 50 ml PSY medium to mid exponential phase (OD₆₀₀ of 0.3-0.4). Then, cells were harvested by

centrifugation at 8,000 g for 10 min at 4°C, washed twice with YEM medium and incubated anaerobically for 24 hours in YEM medium containing 10 mM KNO₃. Cultures were immediately transferred into cold tubes containing 0.1 volume of “stop solution” (10% phenol, pH 8, in ethanol; Bernstein *et al.*, 2002). After centrifugation at 10,800 g for 5 min at 4°C, the supernatant was decanted and the pellet immediately frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C. Total RNA was isolated using the hot phenol extraction procedure described previously (Babst *et al.*, 1996). RNA integrity and purity were checked by agarose gel electrophoresis. Quantification of RNA concentration was done by measuring absorbance at 260 nm with a spectrophotometer.

Transcript analysis. The transcriptional start site of the *nirK* gene was mapped by primer extension (Babst *et al.* 1996, Nienaber *et al.* 2000) using oligonucleotides nirK_rev_4 (5'-TTTCTGGCGCGGCAGTTTGAG-3') and nirK_rev_5 (5' GGCCACCAGCTCCACTTTCTG-3'). 50 picomoles of each primer were end-labelled with [γ -³²P]-ATP and T4 polynucleotide kinase (Fermentas, Vilnius, Lithuania). About 10⁵ c.p.m. of the corresponding labelled primer was hybridized overnight at 30 °C to 10 µg total RNA from anaerobically incubated *B. japonicum* 110*spc4* (wild type), A9 (*nifA*), and 9043 (*fixK*₂). Extension reactions were performed with 400 units of SuperScript reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 1 h at 42 °C. After phenol extraction followed by ethanol precipitation, extension products were loaded on 6% denaturing polyacrylamide gels adjacent to sequencing ladders generated with the same oligonucleotides and plasmid pBG0103.

Determination of nitrate reductase and nitrite reductase activity. Cells of *B. japonicum* grown aerobically in 50 ml PSY medium were harvested by centrifugation at 8,000 g for 10 min at 4°C, washed twice with YEM medium, and resuspended in 125 ml of the same medium supplemented with 10 mM KNO₃. Cultures were incubated under anaerobic conditions for 2 and 4 days. After incubation, cells were washed with 50 mM Tris/HCl buffer (pH 7.5) until no nitrite was detected, and then resuspended in 1.3 ml of the same buffer. Methyl viologen (MV⁺)-dependent periplasmic nitrate reductase activity (Nap) was analysed essentially as described by Delgado *et al.* (2003). For determination of MV⁺-

dependent NiR activity, the reaction mixture contained 50 mM Tris/HCl buffer (pH 7.5), 100 μM NaNO_2 , 800 μM methyl viologen and 200 μl of cell suspension (1–3 mg of protein). The reaction was started by the addition of 50 μl of freshly prepared sodium dithionite solution (30 mg \cdot ml⁻¹ in 300 mM NaHCO_3). After incubation for 20 min at 30°C, the reaction was stopped by vigorous shaking until the samples had lost their blue colour.

Determination of β -galactosidase activity. Cells were grown aerobically in YEM medium, collected by centrifugation at 8,000 g for 10 min at 4 °C, washed twice with YEM, and finally incubated microaerobically in the same medium supplemented with KNO_3 . Cultures with an initial OD_{600} of about 0.2 were incubated for 2 and 4 days. Activity was determined with permeabilized cells from at least three independently grown cultures as previously described (Miller, 1972). Cells removed from stoppered flasks were not kept microaerobic but were used immediately for assays.

Analytical methods. Nitrite concentration was estimated after diazotization by adding the sulfanilamide/naphthylethylene diamine dihydrochloride reagent (Nicholas & Nason, 1957). Protein concentration was estimated by using the Bio-Rad assay (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca) with a standard curve of varying bovine serum albumin concentrations.

Haem-c proteins analysis. Cells of *B. japonicum* grown aerobically in 500 ml PSY medium were harvested by centrifugation as above, washed twice with YEM, resuspended in 1 l of the same medium supplemented with 10 mM KNO_3 , and finally incubated under anaerobic conditions for 4 days. Membrane preparations were performed as described earlier (Delgado *et al.*, 2003). For that, anaerobically incubated cells were washed with 50 mM sodium-phosphate buffer (pH 7.0) containing 1 mM MgCl_2 , 0.1 mM CaCl_2 , and 0.9% NaCl, and resuspended in 3 ml of the same buffer containing 1 mM 4-amidinophenylmethanesulfonyl fluoride (APMSF), 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of DNase I, and 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of RNase A. Cells were disrupted by three passages through an ice-cold French pressure cell (SLM-Aminco) at a pressure of about 120 MPa. Unbroken cells were removed by

centrifugation at 10,000 g for 10 min at 4 °C. Membranes were prepared by ultracentrifugation of the supernatant at 140,000 g for 1 h at 4 °C. The membrane pellet was washed once with fractionation buffer, resuspended in 200 µl of the same buffer and stored at -20°C.

Membrane protein aliquots (30 µg) were diluted in sample buffer (124 mM Tris-HCl, pH 7.0, 20% glycerol, 4.6% SDS, and 50 mM 2-mercaptoethanol), and incubated at room temperature for 10 min. Membrane proteins were separated at 4°C in SDS-12% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), transferred to a nitrocellulose membrane and stained for haem-dependent peroxidase activity as described previously (Vargas *et al.*, 1993) by using the chemiluminescence detection kit “Super Signal” (Pierce).

4.4. RESULTS AND DISCUSSION.

Role of NifA in *B. japonicum* nitrate dependent anaerobic growth. To investigate the involvement of the NifA regulatory protein on denitrification, a *B. japonicum nifA* mutant strain A9 was incubated anaerobically in YEM medium with 10 mM KNO₃ as final electron acceptor. Growth was determined by monitoring the optical density at 600 nm [OD₆₀₀] (Fig. 4.1). In contrast to the *B. japonicum 110spc4* parental strain, the *nifA* mutant strain A9 showed a defect in growth, reaching a turbidity [OD₆₀₀] of only 0.21 compared with an [OD₆₀₀] of 0.58 observed in the wild-type cells after 10 days incubation under anaerobic conditions with nitrate (Fig. 1). As shown previously (Nellen-Anthamatten *et al.*, 1998) cells of the strain 9043 affected in the *fixK₂* gene, were unable to grow under denitrifying conditions.

While nitrate was not reduced to nitrite in the *B. japonicum 9043* strain, nitrite was accumulated in the growth medium of wild-type and A9 strain as a consequence of nitrate reduction (Fig. 4.1). However, a lag in nitrite formation was observed during growth of the *nifA* mutant compared to wild-type cells. After 4 days incubation under anaerobic conditions with nitrate, nitrite was consumed by *B. japonicum 110spc4*, decreasing its concentration in the growth medium to zero (Fig. 4.1). However, nitrite accumulated and

remained in the growth medium of the *nifA* mutant (Fig. 4.1). The defect in growth under nitrate-respiring conditions as well as the delay in nitrite formation and the incapacity to consume this nitrite observed in the *B. japonicum* strain A9 suggest that in the *nifA* mutant it may be an alteration in the periplasmic nitrate reductase encoded by *napEDABC* and in the Cu-containing nitrite reductase encoded by *nirK*, enzymes which are involved in the first two steps of the denitrification pathway in *B. japonicum* (Bedmar *et al.*, 2005). In contrast to our observations, Bauer *et al.*, (1998), showed that the *nifA* mutant strain A9 is able to grow under anaerobic conditions with nitrate at similar rates as the wild type. The apparent discrepancy with the results presented here could be due to the different growth conditions used in this work.

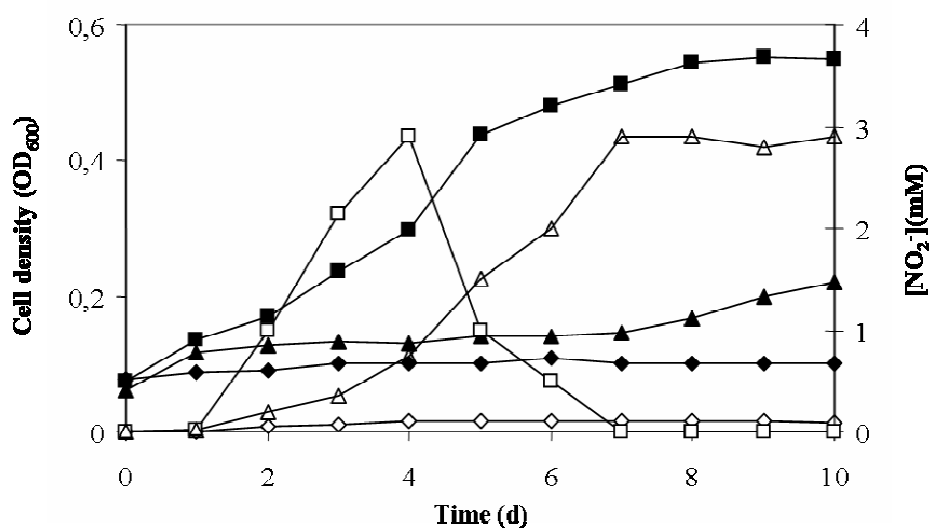


Figure 4.1. Nitrate-dependent anaerobic growth (closed symbols) and nitrite production (open symbols) of wild-type *B. japonicum* 110spc4 (■,□), *nifA* mutant derivative A9 (▲,△) and *fixK*₂ mutant derivative 9043 (◆,◇). Cells were incubated anaerobically in YEM medium supplemented with 10 mM KNO₃.

Role of NifA in *napEDABC* and *nirK* expression. After 2 days incubation under anaerobic conditions with nitrate, no differences in MV⁺-dependent nitrate reductase (NR) and nitrite reductase (NiR) activities were observed between the wild-type and *nifA* cells

(Fig. 4.2a and b). However, after 4 days incubation under nitrate-respiring conditions, levels of NR and NiR activities in cells of the *nifA* mutant strain A9 were about 2-fold and 4-fold lower, respectively, than those detected in the parental strain 110*spc4* (Fig. 4.2a and b).

No NR or NiR activities were observed in the *fixK2* mutant background either after 2 days or 4 days incubation (Fig. 4.2a and b), confirming the inability of this strain to grow under nitrate-respiring conditions.

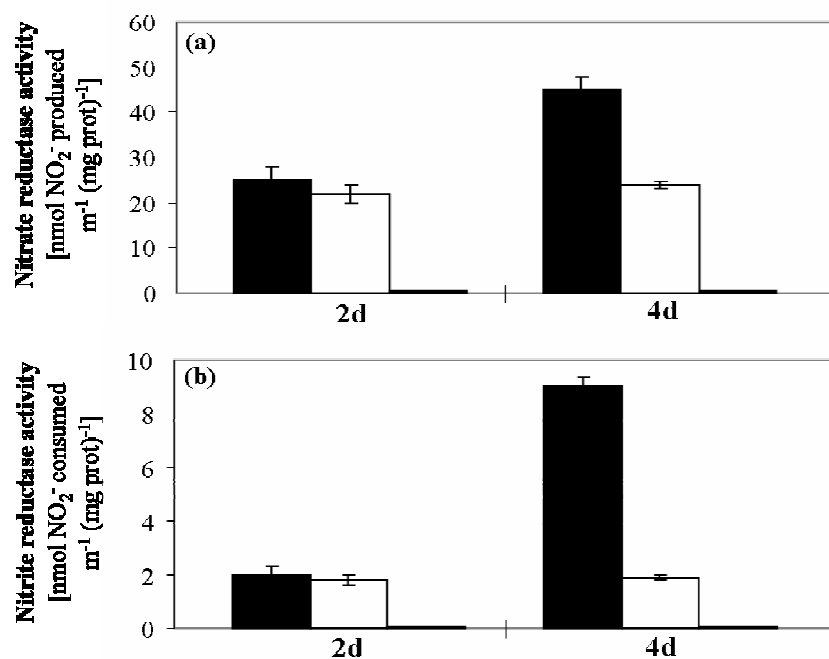


Figure 4.2. MV⁺-dependent nitrate reductase (a) and nitrite reductase (b) activity in cells from *B. japonicum* 110*spc4* (black bars), *nifA* mutant derivative A9 (white bars) and *fixK2* mutant derivative 9043 (grey bars). Cells were incubated in YEM medium supplemented with 10 mM KNO₃ for 2 and 4 days. Data are means + standard error from at least two different cultures, assayed in triplicate.

After 2 days incubation, similar levels of β-galactosidase activity were observed in the wild type and *nifA* mutant containing a *napE-lacZ* or a *nirK-lacZ* fusions (Fig. 4.3a and b). However, after 4 days incubation under anaerobic conditions with nitrate, cells of *nifA*

mutant strains 1501 and 1502, with a *napE-lacZ* and *nirK-lacZ* fusions, respectively, showed very low levels of β -galactosidase activities compared to those detected in cells of parental strains 0602 and 2498 containing the *napE-lacZ* and *nirK-lacZ* fusions (Fig. 4.3a and b). As shown previously (Robles *et al.*, 2006; Velasco *et al.*, 2001; Mesa *et al.*, 2003) expression of *B. japonicum napEDABC* and *nirK* genes was completely inhibited in cells of the *B. japonicum* strain 9043 lacking the *fixK₂* gene after 2 and 4 days incubation under anaerobic conditions with nitrate (Fig. 4.3a and b).

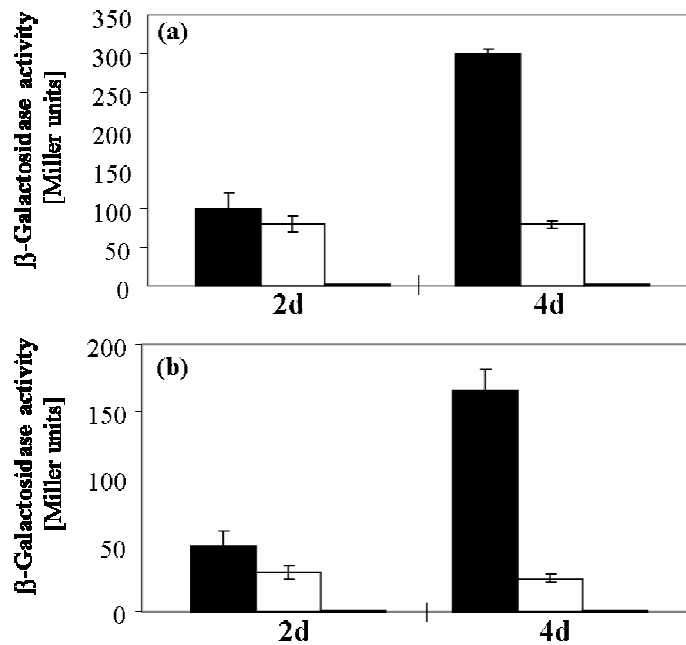


Figure 4.3. β -Galactosidase activity from a *napE-lacZ* (a) or *nirK-lacZ* (b) fusion in wild-type *B. japonicum* strains 0602 and 2498 (black bars), *nifA* mutant derivatives 1501 and 1502 (white bars) and *fixK₂* mutant derivatives 1108 and 2498K₂ (grey bars). Cells were incubated in YEM medium supplemented with 10 mM KNO₃ for 2 and 4 days. Data are means + standard error from at least two different cultures, assayed in triplicate.

These results demonstrate that induction of NR and NiR activities, as well as *napEDABC* and *nirK* expression, observed after 2 days incubation under anaerobic conditions is mediated by FixK₂, since it is retained in the *nifA* mutant, and is completely inhibited in

the *fixK₂* mutant. However, since the increased expression of *napEDABC* and *nirK* genes observed after 4 days incubation, is not observed in the *nifA* mutant, we propose that expression of those genes is under the additional control of NifA. No expression was observed in the *fixK₂* mutant background after 4 days incubation suggesting that FixK₂ is absolutely required for activation of both the *napEDABC* and *nirK* promoters. After 4 days incubation, the cellular oxygen concentration decreases after being consumed by the *cbb₃* oxidase. Then, maximal induction of *nirK* and *napEDABC* genes when the oxygen concentration within the cells has dropped to a very low level is probably NifA dependent.

Supporting this hypothesis, it has been proposed that induction of the NifA-dependent genes only occurs at very low oxygen concentration (below 2%) whereas that of the FixK₂-targets progressively increased when oxygen concentration decreased from 21 to 0.5 % in the gas phase (Sciotti *et al.*, 2003).

Recently, microarrays experiments to characterize the *B. japonicum* NifA+ σ^{54} regulon were performed (Hauser *et al.*, 2007). In these studies, neither *nirK* or *napEDABC* genes could be identified as NifA-dependent genes. These results do not support our observations. As suggested above, this discrepancy is probably due to the different growth conditions used in this work.

Haem-c analyses. To investigate the expression levels of the NapC component of the periplasmic nitrate reductase in the *nifA* mutant, haem *c* staining experiments were performed in membranes of cells incubated under anaerobic conditions with nitrate. Six stained bands of 32, 28, 25, 24, 20 and 16 kDa were detected in wild-type membranes (Fig. 4.4, lanes 1 and 4). The proteins of 28, 20 and 16 kDa have been identified previously as the *B. japonicum* cytochrome *c*₁ (Thöny-Meyer *et al.*, 1989), CycM (Bott *et al.*, 1991), and NorC subunit of the nitric oxide reductase enzyme (Mesa *et al.*, 2002), respectively. As

described by Preisig *et al.*, (1993), there is even a seventh protein of 28 kDa co-migrating with cytochrome c_1 . This 28 kDa protein and the 32 kDa c -type cytochrome have been identified as the *B. japonicum* FixP and FixO proteins, respectively, of the *cbb*₃-type, high-affinity cytochrome oxidase encoded by the *fixNOQP* operon (Preisig *et al.*, 1993; Preisig *et al.*, 1996). The haem-stainable band of approximately 25 kDa, corresponds to NapC (Delgado *et al.*, 2003). In this work, we found that expression of NapC protein was very low in cells of the *nifA* mutant, compared to expression levels detected in wild-type cells (Fig. 4.4, lanes 1 and 3 respectively). In the *nifA* mutant, expression of the cytochrome of about 24 kDa is also lower than that observed in the wild-type strain (Fig. 4.4, lanes 1 and 3). The physiological role of this cytochrome is yet unknown.

In addition to NapC, very low expression of NorC was observed in *nifA* cells after 4 days incubation compared to the wild-type expression levels (Fig. 4.4, lanes 1 and 3).

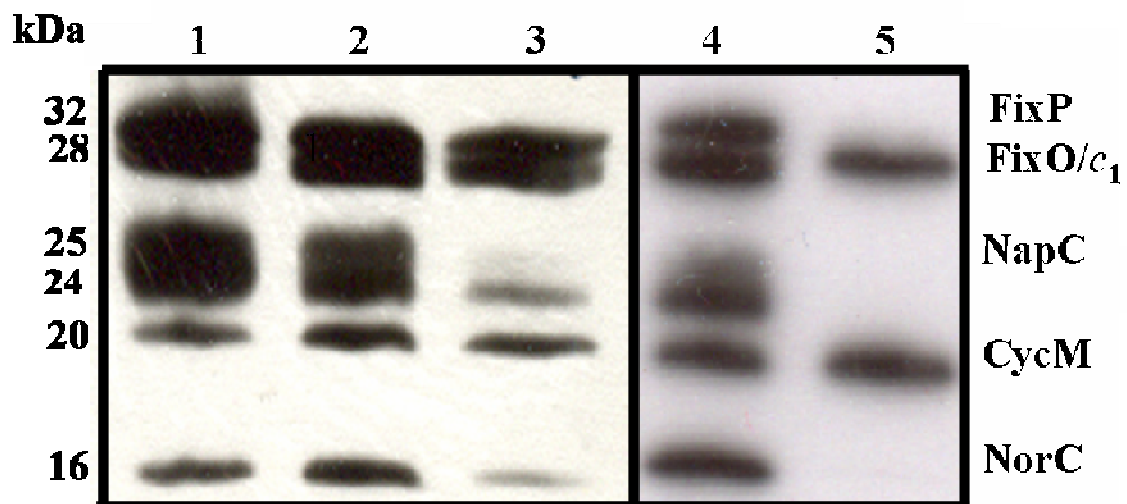


Figure 4.4. Haem-stained proteins in membranes prepared from cells of wild-type *B. japonicum* 110*spc4* (lanes 1 and 4), *regR* mutant strain 2426 (lane 2), *nifA* mutant strain A9 (lane 3) and *fixK*₂ mutant strain 9043 (lane 5). Cells were grown aerobically in PSY medium, collected by centrifugation and further incubated anaerobically in YEM medium

supplemented with 10 mM KNO₃ for 4 days. Each lane contains about 25 µg membrane proteins. Haem-stained *c*-type cytochromes identified previously are specified at the right margin. Apparent masses of the proteins (kDa) are shown at the left margin.

These results suggest that NifA may have also a negative effect in expression of *nor* genes. In fact, lower expression of a *norC-lacZ* fusion was observed in the strain A9 as compared to that observed in the wild-type strain (data not shown). In denitrifiers, such as *P. denitrificans* (van Spanning *et al.*, 1999) and *R. sphaeroides* (Kwiatkowski & Shapleigh, 1996) nitric oxide (NO) acts as the signal molecule for transcriptional activation of *nor* genes. Recent results from our group, showed that NO formation by NirK is required for maximal expression of *B. japonicum nor* genes (Robles *et al.*, submitted). As we have observed in Figures 2b and 3b, in the *B. japonicum nifA* mutant strain A9, there is very low expression of *nirK* and the reduction of nitrite to NO is impaired. The defect in NO formation may prevent maximal expression of NorC in the *nifA* mutant. Whether or not NifA controls *nor* genes expression (directly or indirectly) needs to be elucidated.

As observed by β-galactosidase activity analysis (Fig. 4.3a), no expression of NapC could be observed in the *fixK₂* mutant (Fig. 4.4, lane 5). In addition to NapC, the FixP component of the *cbb₃* cytochrome *c* oxidase, the cytochrome of about 24 kDa, and the NorC protein were absent in membranes of the *fixK₂* mutant strain 9043. These results confirm the previously described role of FixK₂ in the activation of the *fixNOQP* (Nellen-Attamaten *et al.*, 1998) and *norCBQD* promoters (Mesa *et al.*, 2002). They also suggest a possible role of the 24 kDa cytochrome *c* in *B. japonicum* microaerobic metabolism.

A mutant in the regulatory RegR protein was also included in the assay (Fig. 4.4, lane 2). No differences in expression of NapC and NorC proteins were observed in the *regR* mutant compared with the wild-type expression levels (Fig. 4.4, lanes 1 and 2). This observation rules out the possibility of an implication of the two-component regulatory system RegSR in the negative effect of NifA on the expression of the denitrification genes. Although

RegSR two-component regulatory system induces expression of the *fixR-nifA* operon (Bauer *et al.*, 1998), the activity of NifA is only partially controlled by RegR (Fischer, 1996). In fact, NifA was suggested to sense oxygen or redox conditions directly, through the cysteines residues presents in its structure (Fischer *et al.*, 1989, Fischer and Hennecke 1987, Kullik *et al.*, 1991). Results from this work clearly demonstrate that the role of NifA protein on *napEDABC* and *nirK* genes expression is not dependent on RegSR. In contrast to our findings, a role of the PrrAB two-component system in *nirK* expression has been demonstrated in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3 (Laratta *et al.*, 2002). However, in this bacterium the primary function of nitrogen oxide respiration is redox balancing rather than supporting anaerobic growth as seen in many “true denitrifiers” like *B. japonicum*. Very recently, a role of the Prr/Reg ortholog designated ActR in controlling expression of *nirK* and *nor* has been proposed in *Agrobacterium tumefaciens* (Baek *et al.* 2008).

Transcription analysis of the *nirK* gene. Primer extension experiments were performed to analyze *nirK* transcription in cells of *B. japonicum* 110*spc4*, and the *fixK₂* and *nifA* mutant strains, incubated anaerobically with nitrate. Reverse transcription with RNA from the wild-type strain revealed a major *nirK*-specific transcript starting at a C, 26 nucleotides upstream of the putative translational start codon (Fig. 4.5a, lane 1). Levels of cDNA obtained after extension with the *nirK* primer were significantly lower in the *nifA* mutant strain A9 compared with those detected in the wild-type strain 110*spc4* (Fig. 4.5a, lanes 1 and 3). No transcript was detected when RNA was isolated from cells of the *fixK₂* mutant strain 9043 (Fig. 4.5a, lane 2). Inspection of the DNA sequence upstream of the *nirK* transcriptional start site (Fig. 4.5b) revealed the presence of the sequence 5'-TTGTT-N₄-CGCAA-3' located at position -40.5 upstream of the transcriptional start site. This sequence has been proposed previously as the binding site for the FixK₂ regulatory protein (Velasco *et al.* 2001) and has seven out of ten matches with the FNR consensus sequence, 5'-TTGAT-N₄-ATCAA-3', and the FixK consensus sequence, 5'-TTGAT-N₄-GTCAA-3', respectively (Zumft 1997, Fischer 1994, Spiro *et al.* 1994). Overlapping with the FixK₂-anaerobox there is the sequence 5'-TGT-N₁₀-ACA-3' similar to the upstream activator sequence (UAS) corresponding to the binding site for the transcriptional activator protein

NifA (Fig. 4.5b) which is present in most (but not all) NifA-dependent promoters at a distance of 80 to 150 nucleotides upstream of the transcriptional start site (Fischer, 1994). However, the NifA-UAS sequence detected in the *B. japonicum nirK* promoter is only at a distance of 30 nucleotides upstream of the *nirK* transcriptional start site (Fig. 4.5b). It is well established that NifA activates gene expression in concert with RNA polymerase containing the specialized factor σ^{54} , which enables the core polymerase to recognize -24/-12 type promoters (Buck *et al.*, 1987). However, in the promoter region of *B. japonicum nirK*, the σ^{54} consensus sequence could not be detected (Fig. 4.5b). Consistent with this observation, phenotypic studies of a *B. japonicum rpoN_{1/2}* mutant lacking σ^{54} demonstrated that this strain was able to grow and to express wild-type levels of MV⁺-dependent NiR activity and β -galactosidase activity from a *nirK-lacZ* fusion when was incubated under anaerobic conditions with nitrate as electron acceptor (data not shown). These results suggest that expression of *nirK* is not dependent on σ^{54} . As far as we know, this is the first case in which a gene is NifA-dependent, but is not dependent on σ^{54} (at least in the conventional way).

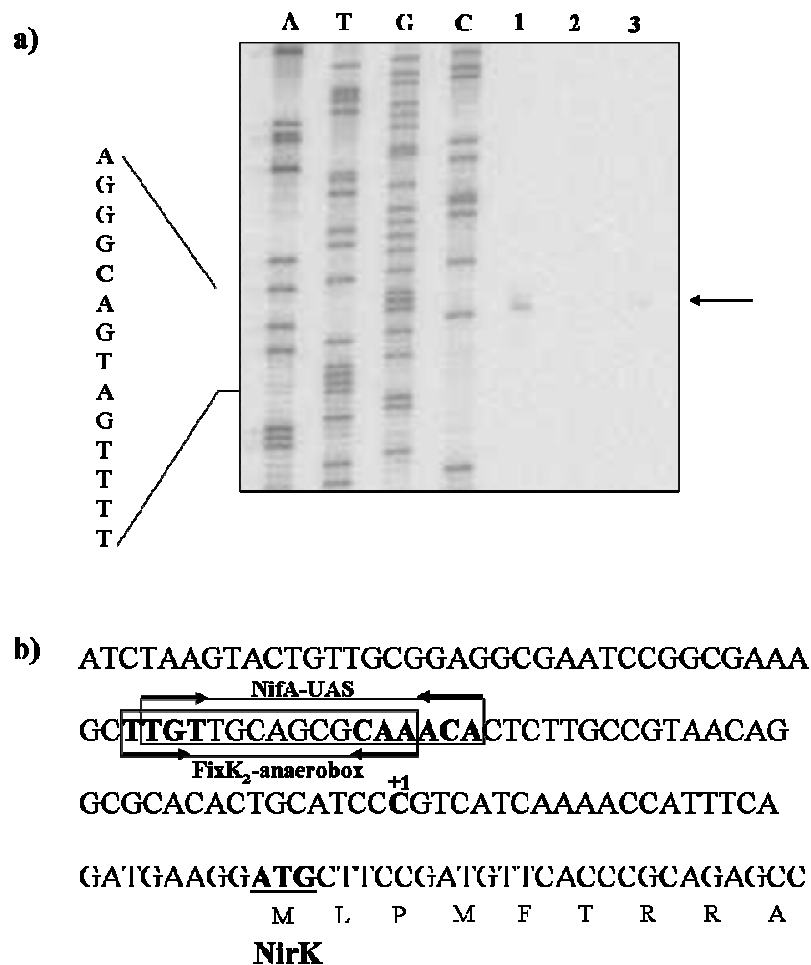


Figure 4.5. (a) Mapping of the transcription start site of *B. japonicum nirK* gene by primer extension. For RNA isolation cells of wild-type *B. japonicum* 110spc4 (lane 1), *fixK₂* mutant strain 9043 (lane 2) and *nifA* mutant strain A9 (lane 3) were incubated anaerobically with nitrate. The sequencing ladder shown was generated with pBG0103 and primer *nirK_rev_4*, which was used for the transcript mapping. The transcriptional start site for *nirK* is marked with an arrow. The same transcription start site was determined also with primer *nirK_rev_5* (data not shown) (b) *nirK* promoter sequence. The nucleotide at which transcription initiates is shown in bold and marked +1 above. A potential binding site for NifA (UAS) and FixK₂ (anaerobox) are shown. The putative translational start codon is indicated in bold. The N-terminal sequence of the NirK protein is present in one letter code.

NifA, a novel regulator for denitrification genes. In *B. japonicum* is well

established the involvement of the FixLJ/FixK₂ regulatory cascade in the microaerobic induction of the denitrification genes (Bedmar *et al.*, 2005) as well as other genes such as the *fixNOQP* operon (Nellen-Anthamatten *et al.*, 1998). Induction of FixK₂-controlled targets progressive increases when the oxygen concentration is lowered from 21 to 0.5 %. Only when oxygen concentration decreases below 2%, the NifA protein activates expression of a set of genes—that comprises those involved in nitrogen fixation and other functions (Sciotti *et al.* 2003). In this work we confirm previous work (Bedmar *et al.*, 2005) by showing that FixK₂ is absolutely required for *nirK* and *napEDABC* expression. However, maximal expression of denitrification genes, which occurs after 4 days incubation under anaerobic conditions, when oxygen concentration is probably very low, requires the NifA protein. These results suggest that in addition to FixK₂, NifA also controls the expression of the *napEDABC* and *nirK* denitrification genes emphasizing the previously suggested role of NifA as an activator of anaerobically induced genes in addition to the classical nitrogen fixation genes (Nienaber *et al.* 2000, Hauser *et al.* 2007).

In this work, we propose a new model on the control of denitrification genes in *B. japonicum*. In this model, denitrification genes expression is under the control of the two oxygen responsive regulatory cascades FixLJ/FixK₂-NnrR and RegRS/NifA. The first cascade is essential for a basal microaerobic induction of denitrification genes. In this cascade an additional N oxide induction of denitrification genes is mediated by NnrR (Mesa *et al.*, 2003; Robles *et al.*, 2006). In response to microaerobic conditions, FixK₂ also activates other genes like the *fixNOQP* operon encoding the *cbb*₃ terminal oxidase. When oxygen is consumed by this oxidase (after 4 days incubation under low oxygen conditions), maximal expression of denitrification genes is controlled by the NifA regulatory protein. This model is supported by our recently published haem-staining experiments (Bueno *et al.*, 2008) where after 2 days incubation under anaerobic conditions with nitrate, the *cbb*₃ oxidase is fully expressed in *B. japonicum* 110*spc4* cells. However, expression of NapC and NorC proteins is still very weak being fully expressed after 4 days growth suggesting that oxygen consumption by the cells is required for full expression of denitrification proteins.

The results from this work clearly demonstrate that NifA is involved in the regulation of *napEDABC* and *nirK* denitrification genes (Fig. 4.6). Whether or not these genes are direct or indirect targets of NifA is under investigation.

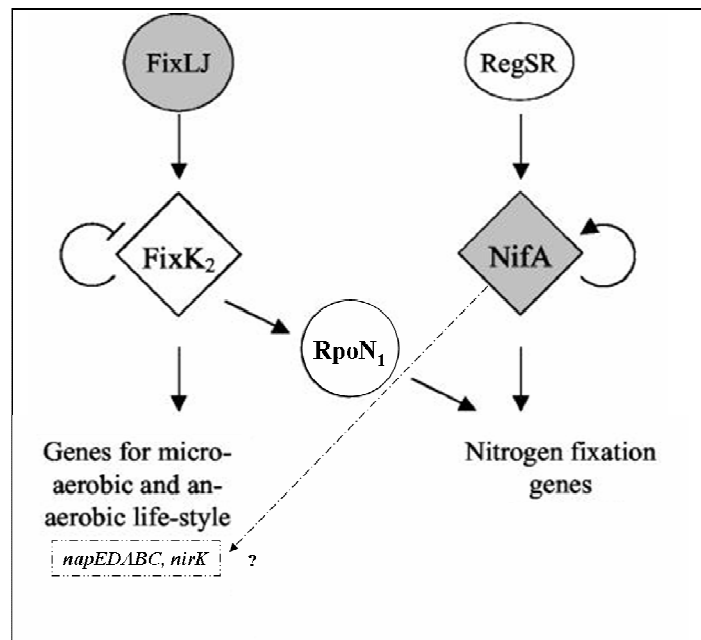


Figure 4.6. Proposed model of regulation of *B. japonicum* denitrification genes by FixLJ-FixK₂-NnrR and NifA oxygen-responsive regulatory cascades. (Modified from Mesa *et al.*, 2003).

4.5. REFERENCES.

Babst M, Hennecke H, Fischer H. M.. 1996. Two different mechanisms are involved in the heat-shock regulation of chaperonin gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. Mol. Microbiol. 19: 827-839.

Baek, S. H., A. Hartsock, and J. P. Shapleigh. 2008. *Agrobacterium tumefaciens* C58 uses ActR and FnrN to control *nirK* and *nor* expression. J. Bacteriol. 190:78-86.

Barrios H., Fischer H. M., Hennecke H., and Morett E. 1995. Overlapping promoters for two different RNA polymerase holoenzymes control *Bradyrhizobium japonicum nifA* expression. J. Bacteriol. 177:1760-1765

Barrios, H., B. Valderrama, and E. Morett. 1998. Compilation and analysis of σ^{54} -dependent promoter sequences. Nucleic Acids Res. 27:4305-4313.

Bauer, E., T. Kaspar, H. M. Fischer, and H. Hennecke. 1998. Expression of the *fixR-nifA* operon in *Bradyrhizobium japonicum* depends on a new response regulator, RegR. J. Bacteriol. 180:3853-3863.

Bedmar EJ, Robles EF, Delgado MJ. 2005. The complete denitrification pathway of the symbiotic, nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. Biochem. Soc. Trans. 33:141-144.

Buck, M., M. T. Gallegos, D. J. Studholme, Y. Guo, and J. D. Gralla. 2000. The bacterial enhancer-dependent σ^{54} transcription factor. J. Bacteriol. 182:4129-4136.

Buck, M., W. Cannon, and J. Woodcock. 1987. Mutation analysis of upstream sequences required for transcriptional activation of the *Klebsiella pneumoniae nifH* promoter. Nucleic Acids Res. 15: 9945-9956.

Buck, M., S. Miller, M. Drummond, and R. Dixon. 1986. Upstream activator sequences are present in the promoters of nitrogen fixation genes. *Nature (London)* 320:374-378.

Bueno E., Bedmar E. J., Richardson D. J. and Delgado M. J. 2008. The role of *Bradyrhizobium japonicum* cytochrome *c*₅₅₀ in nitrite and nitrate respiration. *FEMS Microbiol. Lett.* 279: 188-194.

Chauhan S, O'Brian MR. 1997. Transcriptional regulation of delta-aminolevulinic acid dehydratase synthesis by oxygen in *Bradyrhizobium japonicum* and evidence for developmental control of the *hemB* gene. *J. Bacteriol.* 179: 3706-3710

Delgado, M. J., N. Bonnard, A. Tresierra-Ayala, E. J. Bedmar, and P. Müller. 2003. The *Bradyrhizobium japonicum napEDABC* encoding the periplasmic nitrate reductase are essential for nitrate respiration. *Microbiology* 149: 3395-3403.

Dixon, R., and D. Kahn. 2004. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:621-31.

Durmowicz MC, Maier RJ. 1998. The FixK₂ protein is involved in regulation of symbiotic hydrogenase expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol.* 180:3253-6

Fischer H. M., Alvarez-Morales A, Hennecke H. 1986. The pleiotropic nature of symbiotic regulatory mutants: *Bradyrhizobium japonicum nifA* gene is involved in control of *nif* gene expression and formation of determinate symbiosis. *EMBO J.* 5:1165-73.

Fischer H. M., Hennecke H. 1987. Direct response of *Bradyrhizobium japonicum* NifA-mediated *nif* gene regulation to cellular oxygen status. 1987. *Mol. Gen. Genet.* 209:621-6.

Fischer H.M., Bruderer, T., and Hennecke, H. 1988. Essential and non-essential domains in the *Bradyrhizobium japonicum* NifA protein: identification of indispensable cysteine residues potentially involved in redox reactivity and/or metal binding. *Nucleic Acids* 16: 2207-2224.

Fischer H. M., Fritsche S, Herzog B, Hennecke H. 1989. Critical spacing between two essential cysteine residues in the interdomain linker of the *Bradyrhizobium japonicum* NifA protein. FEBS Lett. 255:167-71.

Fischer H. M.. 1994. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. Microbiol Rev. 58:352-86.

Fischer H. M.. 1996. Environmental regulation of rhizobial symbiotic nitrogen fixation genes. Trends Microbiol. 4:317-20

Fischer, H. M., Velasco, L., Delgado, M. J., Bedmar, E. J., Schären, S., Zingg, D., Göttfert, M., and Hennecke, H. 2001. One of two *hemN* genes in *Bradyrhizobium japonicum* is functional during anaerobic growth and in symbiosis. J. Bacteriol. 183:1300-1311.

Hauser F., Pessi G., Friberg M., Weber C., Rusca N., Lindemann A., Fischer H. M., Hennecke H. 2007. Dissection of the *Bradyrhizobium japonicum* NifA+ σ^{54} regulon, and identification of a ferredoxin gene (*fdxN*) for symbiotic nitrogen fixation. Mol. Genet. Genomics. 278: 255-271.

Hunt S. and Layzell D.B. 1993. Gas exchange of legume nodules and the regulation of nitrogenase activity, Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 44: 483–501.

Korner, H., Sofia, H.J. and Zumft, W.G. 2003. Phylogeny of the bacterial superfamily of CRP–FNR transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. FEMS Microbiol. Rev. 27, 559–592.

Kullik I., Fritsche S., Knobel H., Sanjuan J., Hennecke H., and Fischer H. M. 1991. *Bradyrhizobium japonicum* has two differentially regulated, functional homologs of the σ^{54} gene (*rpoN*). J. Bacteriol. 173:1125-1138.

- Kwiatkowski, A. V., and J. P. Shapleigh. 1996. Requirement of nitric oxide for induction of genes whose products are involved in nitric oxide metabolism in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3. J. Biol. Chem. 271: 24382-24388.
- Laratta, W. P., P. S. Choi, I. E. Tosques, and J. P. Shapleigh. 2002. Involvement of the PrrB/PrrA two-component system in nitrite respiration in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3: evidence for transcriptional regulation. J. Bacteriol. 184:3521-9.
- Mesa, S., E. J. Bedmar, A. Chanfon, H. Hennecke and H. M. Fischer. 2003. *Bradyrhizobium japonicum* NnrR, a denitrification regulator, expands the FixLJ-FixK₂ regulatory cascade. J. Bacteriol. 185:3978-3982.
- Mesa, S., L. Velasco., M. E. Manzanera, M. J. Delgado, and E. J. Bedmar. 2002. Characterization of the *norCBQD* genes, encoding nitric oxide reductase, in the nitrogen fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. Microbiology 148: 3553-3560.
- Miller, J. H. 1972. Experiments in Molecular Genetics. ColdSpring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Nellen-Anthamatten, D., P. Rossi, O. Preisig, I. Kullik, M. Babst, H. M. Fischer and H. Hennecke. 1998. *Bradyrhizobium japonicum* FixK₂, a crucial distributor in the FixLJ-dependent regulatory cascade for control of genes inducible by low oxygen levels. J. Bacteriol. 180: 5251-5255.
- Nicholas, D. J. D. & Nason, A. 1957. Determination of nitrate and nitrite. Methods Enzymol. 3, 981-984.
- Nienaber, A., Huber, A., Göttfert, M., Hennecke, H., Fischer, H.-M. 2000. Three new NifA-regulated genes in the *Bradyrhizobium japonicum* symbiotic gene region discovered by competitive DNA-RNA Hybridization. J. Bacteriol. 182: 1472-1480.
- Page, K.M. and Guerinot, M.L. 1995. Oxygen control of the *Bradyrhizobium japonicum*

hemA gen. J. Bacteriol. 177: 3979–3984.

Preisig, O., Anthamatten, D. & Hennecke, H. 1993. Genes for a microaerobically induced oxidase complex in *Bradyrhizobium japonicum* are essential for a nitrogen-fixing endosymbiosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 90:3309-3313.

Preisig, O., Zufferey, R., Thöny-Meyer, L., Appleby, C. A. & Hennecke, H. 1996. A high-affinity *cbb₃*-type cytochrome oxidase terminates the symbiosis-specific respiratory chain of *Bradyrhizobium japonicum*. J. Bacteriol 178:1532-1538.

Regensburger, B., and H. Hennecke. 1983. RNA polymerase from *Rhizobium japonicum*. Arch. Microbiol. 135:103-109.

Robles, E. F., C. Sánchez, M. J. Delgado, and E. J. Bedmar. 2006. The *Bradyrhizobium japonicum napEDABC* genes are controlled by the FixLJ-FixK₂-NnrR regulatory cascade. Biochem. Soc. Trans. 34: 108-110.

Sawada, H., L. D. Kuykendall, and J. M. Young. 2003. Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. J. Gen. Appl. Microbiol. 49: 155-179.

Sciotti M. A., Chanfon A., Hennecke H., and Fischer H. M. 2003. Disparate oxygen responsiveness of two regulatory cascades that control expression of symbiotic genes in *Bradyrhizobium japonicum*. J. Bacteriol. 18:5639-5642.

Simon, R., Priefer, U., and Pühler, A. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. Bio/Technology 1:784-791

Spiro, S. 1994. The FNR family of transcriptional regulators. Antonie Leeuwenhoek 66:23-

36.

Thöny-Meyer, L., Stax, D. & Hennecke, H. 1989. An unusual gene cluster for the cytochrome *bc*₁ complex in *Bradyrhizobium japonicum* and its requirement for effective root nodule symbiosis. *Cell*. 57:683-697.

Vairinhos, F., W. Wallace, and D. J. D. Nicholas. 1989. Simultaneous assimilation and denitrification of nitrate by *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Gen. Microbiol.* 135: 189-193.

Van Spanning, R. J., E. Houben, W. N. Reijnders, S. Spiro, H. V. Westerhoff, and N. Saunders. 1999. Nitric oxide is a signal for NNR-mediated transcription activation in *Paracoccus denitrificans*. *J. Bacteriol.* 181: 4129-4132.

Van Spanning, R.J., M.J. Delgado, and D.J. Richardson. 2005. The nitrogen cycle: denitrification and its relationship to N₂ fixation. In *Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology and the environment*. Eds. D. Werner and W. E. Newton. The Netherlands, pp. 277-342.

Van Spanning, R.J., Richardson D. J. and Ferguson S.J. 2007. Introduction to the biochemistry and molecular biology of denitrification. In: *Biology of the nitrogen cycle*, (eds. Bothe H. Ferguson S.J. and Newton W. E). Elsevier, pp. 3-20.

Vargas, C., McEwan, A. G. and Downie, J. A. 1993. Detection of *c*-type cytochromes using enhanced chemiluminescence. *Anal. Biochem.* 209:323-326.

Velasco, L., S. Mesa, C. Xu, M. J. Delgado and E. J. Bedmar. 2004. Molecular characterization of *nosRZDFYLX* genes coding for denitrifying nitrous oxide reductase of *Bradyrhizobium japonicum*. *Antonie Leeuwenhoek.* 85: 229-235.

Velasco, L., S. Mesa, M.J. Delgado, and E.J. Bedmar. 2001. Characterization of the *nirK* gene encoding the respiratory, Cu-containing nitrite reductase of *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1521: 130-134.

Vincent, J. M. 1974. .Root-nodule symbioses with Rhizobium. In: The Biology of nitrogen fixation, pp. 265-341. Edited by A. Quispel, New York, NY, American Elsevier Publishing Co.

Zufferey R, Preisig O, Hennecke H, Thony-Meyer L. 1996. Assembly and function of the cytochrome *cbb*₃ oxidase subunits in *Bradyrhizobium japonicum*. J. Biol. Chem. 12:9114-9271

Zumft, W. G. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 533-616.

Capítulo 5

**Transcription activation *in vitro* of
denitrification genes by the
Bradyrhizobium japonicum regulatory
protein FixK₂.**

5.1. ABSTRACT.

In *Bradyrhizobium japonicum*, denitrification is catalyzed by the products of *napEDABC*, *nirK*, *norCBQD* and *nosRZDYFLX* genes which encode reductases for nitrate, nitrite, nitric oxide and nitrous oxide, respectively. Maximal expression of denitrification genes requires both low oxygen conditions and the presence of nitrate, or a derived N oxide (NO_x), and depends on the FixLJ-FixK₂-NnrR regulatory cascade. In this work, we have studied the *in vitro* transcription activation of *napE*, *nirK*, and *norC* genes by FixK₂. Purified FixK₂ productively interacted with the *B. japonicum* σ 80-RNA polymerase holoenzyme, to activate transcription *in vitro* from the *B. japonicum napE*, *nirK* promoters, but not from the *norC* promoter. Primer extension *in vitro* experiments of *napE* promoter, revealed the presence of a transcription start site situated at 41.5 bp from the axis of symmetry of the FixK₂ binding site. However, this site is different to that found previously by *in vivo* primer extension experiments where was located at 66.5 bp from the FixK₂-box. By contrast to *napE*, *in vitro nirK* transcription start site was similar to that identified previously by *in vivo* transcription studies and is located at 41.5 bp from the FixK₂ binding site. All these findings indicate a disparate regulation by FixK₂ of *B. japonicum* denitrification genes, in which this regulatory protein is directly involved in activating *in vitro* transcription of *nap* and *nirK* promoters but not in *nor* transcription.

5.2. INTRODUCTION.

Bradyrhizobium japonicum is a Gram-negative soil α -proteobacterium with the ability to form N₂-fixing symbiotic nodules with soybean plants (*Glycine max*). In this bacterium, transcriptional regulation of a wide range of genes required for microaerobic, anaerobic or symbiotic growth is supported by the FixK₂ protein (Nellen-Anthamatten *et al.*, 1998; Mesa *et al.*, 2003; for reviews, see Fischer *et al.*, 1996 and 1994). FixK₂ is part of the FixLJ-FixK₂ regulatory cascade (Nellen-Anthamatten *et al.*, 1998). Conditions of low oxygen concentration are sensed by the FixL hemoprotein, which, in its deoxygenated form undergoes autophosphorylation (Gilles González *et al.*, 1991; Gong *et al.*, 1998). In turn, the phosphoryl group is transferred to the cognate response regulator FixJ, whose only known target is the *fixK₂* gene. Apart from being activated by FixJ-phosphate, the *fixK₂* gene is repressed (directly or indirectly) by its own product (negative autoregulation) (Nellen-anthamatten *et al.* 1998). The FixK₂ protein belongs to the cyclic (cAMP) receptor protein (CRP) and the fumarate and nitrate reductase (FNR) activator protein superfamily of transcription factors that trigger physiological changes in response to a variety of metabolic and environmental signals (Green *et al.*, 2001; Körner *et al.*, 2003). Members of this superfamily are predicted to be structurally related to CRP. Typically, they consist of four functionally distinct domains: a N-terminal sensor domain where three cysteine residues (C20, C23 and C29) together with a centrally located cysteine (C122) coordinate binding of redox-responsive [4Fe-4S]²⁺, a central β -roll domain that interacts with RNA polymerase, a long α -helix involved in protein dimer formation, and a C-terminal helix-turn-helix (H-T-H) motif involved in DNA binding. By contrast, FixK₂ and its homologs lack the cysteine motif and there is no evidence that members of this protein class are redox responsive (Fisher, 1994; Körner *et al.*, 2003). Transcription activation by CRP/FNR-type proteins requires (i) direct contact between them and different parts of RNAP and (ii) binding to an imperfect palindromic DNA sequence with a consensus of AAATGTGA-N₆-TCACATTT (CRP box) or TTGAT-N₄-ATCAA (FNR box; Busby *et al.* 1999, Green *et al.* 2001) or TTGAT-N₄-GTCAA (FixK box, Fisher *et al.*, 1994). Amino acid residues involved in specific interaction with DNA are located in the DNA recognition helix (α_F) of the H-T-H DNA binding motif (α_E - α_F). Three charged residues, R180, E181, and R185, of CRP- α_F make contacts with each CRP box half-site, whereas the FNR residues E209, R213, and S212 interact with each FNR box half-site (Green *et al.* 2001). Thus,

S212 of FNR and R180 of CRP provide the discriminatory contacts between the regulators and their respective targets.

CRP/FNR-dependent promoters can be grouped into three classes (I, II, and III) based on the number and the position of CRP/FNR binding sites relative to the start of transcription as well as on the mechanism for transcription activation (Busby et al. 1999). The upstream DNA binding site in class I promoters is centered either at position -61.5 (i.e., its axis of symmetry is between positions -61 and -62) or one to three helical turns further upstream (i.e., -71.5, -82.5, or -92.5). At class II promoters, the symmetry axis of the binding site is located at position -41.5 relative to the transcription start site, thus overlapping with the -35 region. Class III promoters comprise twin DNA sites for CRP or FNR (Busby et al. 1996, Guest et al. 1996); that is, they require binding of two (or more) CRP/FNR dimers or a combination with other activators to achieve maximal transcription activation.

B. japonicum is also able to assimilate and denitrify NO_3^- simultaneously to NH_4^+ and N_2 when cultured under microoxic conditions with nitrate as the only source of nitrogen (Vairinhos et al., 1989). Denitrification reactions in this specie are catalysed by the products of the *napEDABC*, *nirK*, *norCBQD* and *nosRZDYFLX* genes which encode reductases for nitrate, nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide, respectively (Bedmar et al., 2005). Like in many other denitrifiers, maximal expression of denitrification genes in *B. japonicum* requires both low oxygen conditions and the presence of nitrate, or a derived N oxide (NOx). In *B. japonicum*, it has been demonstrated *in vivo*, by using transcriptional fusions to the *lacZ* reporter gene, that induction of transcription from the *nap*, *nir*, *nor* and *nos* promoters depends on FixK₂ (Mesa et al., 2003; Bedmar et al., 2005; Robles et al., 2006). In *B. japonicum* in addition to *fixLJ-fixK₂*, the gene encoding the NnrR (nitrite and nitric oxide respiratory regulator) protein which belong also to the FNR-like proteins has been identified (Mesa et al., 2003). Mutant strains carrying an *nnrR* null mutation were unable to grow under anaerobic conditions in the presence of nitrate or nitrite, they lacked nitrate and nitrite reductase activities and showed decreased expression of *nap* and *nir* promoters. Induction of the *norCBQD* promoter was completely abolished in the absence of a functional *nnrR* gene (Mesa et al., 2003; Robles et al., 2006). Thus, NnrR expands the FixLJ-FixK₂ regulatory cascade by an

additional control level which integrates the N oxide signal required for maximal induction of the denitrification genes (Mesa *et al.*, 2003).

In *B. japonicum* it has been identified at least thirteen FixK₂-dependent genes or operons that are associated with a putative FixK₂ binding site (Nellen-Anthamatten *et al.*, 1998; Bedmar *et al.*, 2005). Among them, the denitrification genes *napE* (Delgado *et al.*, 2003), *nirK* (Velasco *et al.*, 2001) and *norC* (Mesa *et al.*, 2002) transcriptional start site had been mapped. The *nirK* and *norC* promoters have the typical class II architecture, with the location of the binding site at -41.5 bp from the transcriptional start site. However, the *napE* promoter might be an exception in that since the putative FixK₂ binding site is centred 66.5 bases upstream of the transcriptional start site (Delgado *et al.*, 2003), which makes it a candidate for being a class I promoter.

Very recently, it has been demonstrated that purified FixK₂ protein activates transcription from the *B. japonicum* *fixNOQP*, *fixGHIS* and *hemN₂* promoters *in vitro* (Mesa *et al.*, 2005) suggesting that this protein is sufficient to activate *in vitro* transcription to at least a basal level. This contrasts with the well-studied CRP/FNR-type proteins, which do require coregulators.

In this work, we report the *in vitro* transcription activation by the FixK₂ on the *B. japonicum* *napE*, *nirK* and *norC* genes. Our results suggest that *napE* and *nirK* promoters are direct targets of the FixK₂-mediated activation but not the *norC* promoter.

5.3. MATERIALS AND METHODS.

Plasmid construction. Plasmid used as transcription templates were based on pRJ9519 which contains a *B. japonicum rrn* transcriptional terminator (Belyaeva et al. 1993).

Plasmid pRJ8816 bearing a *Bam*HI/*Eco*RI-digested 563-bp fragment containing the *fixNOQP* promoter (Mesa *et al.*, 2005) was used as positive control. Plasmid pRJ3322 is plasmid pRJ9519 with a *Bam*HI/*Eco*RI 273-bp fragment containing *napEDABC* promoter that was amplified by PCR using bsr7036_for_1 and bsr7036_rev_1 primers.

Plasmid pRJ8822 is pRJ9519 with a *Bam*HI/*Eco*RI 465-pb PCR fragment amplified with primers nirK_rev_1 and . Plasmid pRJ8839 is a pRJ9519 derivative that contains the *norC* promoter consisting in a - *Eco*RI-*Bam*HI fragment (Soco) that was amplified by PCR using primers and().

Primer Name	Nucleotide Sequence
bsr7036_for_1	5'-CGGGATCCCGCCCCATCTGGTTCACAATTC-3'
bsr7036_rev_1	5'-GGAATTCAGGAAGGCGAAAATCTCCAT-3'
nirK_for_4?soco	
nirK_rev_4	5'-TTTCTGGCGCGGCAGTTTGAG-3'
nirK_for_5?soco	
nirK_rev_5	5'-GGCCACCAGCTCCACTTTCTG-3'
norC_for_?soco	
norC_rev_?soco	

Specific *in vitro* transcription assay. RNA was synthesized in a 18- μ l reaction volume containing 4 μ l of 5x IVT buffer (fermentas), 2 μ l of 10 mM NTP, 0.5 μ l of RNase inhibitor (40 U/ μ l), 1.5 μ l plasmid DNA as template (1 μ g/ μ l) and 0.1 μ l [α - 32 P] UTP (10 μ Ci/ μ l, DuPont NEN, Boston, Mass.).

Different amounts (1.5 to 3 μ M) of previously purified FixK₂ recombinant protein (Mesa *et al.*, 2005) were added to the reaction mixture. The reaction was started by adding 1.4 μ g of *B. japonicum* RNAP (100 nM; purified as previously described by Beck *et al.*, 1997) and incubated for 30 min at 37°C. The reaction was terminated by placing the reaction tubes on ice. The RNA was purified by extraction with phenol-methylene chloride (1:1) and subsequent ethanol precipitation. The RNA was dissolved in 6 μ l of loading dye (38% formamide, 8 mM EDTA [pH 8.0], 0.02% bromophenol blue, and 0.02% xylene cyanol FF), heated to 85°C for 2 min, and loaded onto a 6% polyacrylamide–7 mM urea gel. Suitable RNA size markers were prepared *in vitro* with T3 RNA polymerase according to Liggitt *et al.* (1994). Markers 1 and 2 were obtained by digestion of pRJ9601 and pRJ8817 plasmids with *Bst*XI and *Bg*III restriction enzymes to yield runoff transcripts of 286 and 180 nucleotides, respectively (Mesa *et al.*, 2005). Transcripts were visualized with a phosphorimager. For quantification, signal intensities were determined with the Bio-Rad Quantity One software (version 4.5.2).

Transcript mapping. The transcription start site of the *napE* and *nirK* genes transcripts synthesized *in vitro* was determined by using plasmids pRJ3322 and pRJ8822, respectively. RNA subjected to primer extension was synthesized as described above for the specific transcription assay with the exception that no radiolabeled nucleoside triphosphate was used.

The primer extension experiments were done using primer 9519_1 that hybridizes with plasmid pRJ9519 sequence located immediately downstream of the HindIII site.

50 picomoles of each primer were labeled with [γ - 32 P]ATP by using T4 polynucleotide kinase (Fermentas, Vilnius, Lithuania), then free nucleotides were removed by gel filtration. RNA obtained by *in vitro* transcription was dissolved in 28 μ l of hybridization buffer (100 mM Tris-HCl [pH 8.3], 20 mM MgCl₂, 160 mM KCl). Five microliters of the labeled oligonucleotides (approximately 10⁵ cpm) was annealed to the RNA *in vitro* synthesized by incubation at 85°C for 5 min and subsequent rapid cooling at -20°C. Extension reactions were performed with 400 units of SuperScript reverse transcriptase

(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 1 h at 42 °C and terminated with 350 µl of stop solution (30 µl NH₄AC 7.5M + 300 µl biophenol). After phenol extraction followed by ethanol precipitation, extension products were loaded on 6% denaturing polyacrylamide gels adjacent to sequencing ladders generated with 9519_1 oligonucleotide and plasmids pRJ3322 and pRJ8822 (200 ng/ µl).

5.4. RESULTS AND DISCUSSION

***In vitro* transcription of *napE* by FixK₂.** Previous work from our group demonstrated, by using transcriptional fusions of *nap*, *nir*, *nor* and *nos* promoters to the reporter *lacZ* gene, that expression of the denitrification genes depends on the FixK₂ regulatory protein (Bedmar *et al.*, 2005; Robles *et al.*, 2006). However, *in vitro* direct activation of FixK₂ over these genes was not reported. To confirm that FixK₂ mediates transcription activation at such denitrification genes directly, we monitored RNA synthesis by multiple round *in vitro* transcription from the *napE*, *nirK*, and *norC* promoters cloned into template plasmid pRJ9519 (Beck *et al.*, 1997), which carries a *rrn* terminator, obtaining plasmids pRJ3322, pRJ8822 and pRJ8839, respectively. In these experiments, previously purified FixK₂ (Mesa *et al.*, 2005) and ARN polymerase (RNAP) from *B. japonicum* were used. Without FixK₂, *B. japonicum* RNAP did not transcribe from either of the three promoters efficiently, (Fig. 5.1a,b and c, lane 1), whereas it produced a vector-encoded transcript of 107 nucleotides that served as an useful control (Fig. 5.1a, b, and c) as previously observed by Mesa *et al.*, (2005).

As positive control, we used *fixN* promoter that as described previously (Mesa *et al.*, 2005) is transcribed *in vitro* by FixK₂ producing a transcript of about 243 nucleotides (Fig. 5.1a, lane 1 of the *fixN* panel). In the presence of different concentrations of FixK₂ (1.5, and 3 µM), *B. japonicum* RNAP transcribed the *napE* promoter efficiently producing a transcript of about 305 bp (Fig. 5.1a, lanes 2, and 3, respectively). However, the *napE* transcript obtained was approximately 25 bp higher than the theoretically expectable transcript of 280 bp according to previous *in vivo* primer extension experiments performed by Delgado *et al.* (2003). This 280 bp product comprises a DNA fragment of 91 bp downstream from the *in vivo* transcription start site (Delgado *et al.*, 2003) plus 189 bp until the *rrn* transcriptional terminator present in pRJ3322 plasmid where the *napE* promoter was cloned.

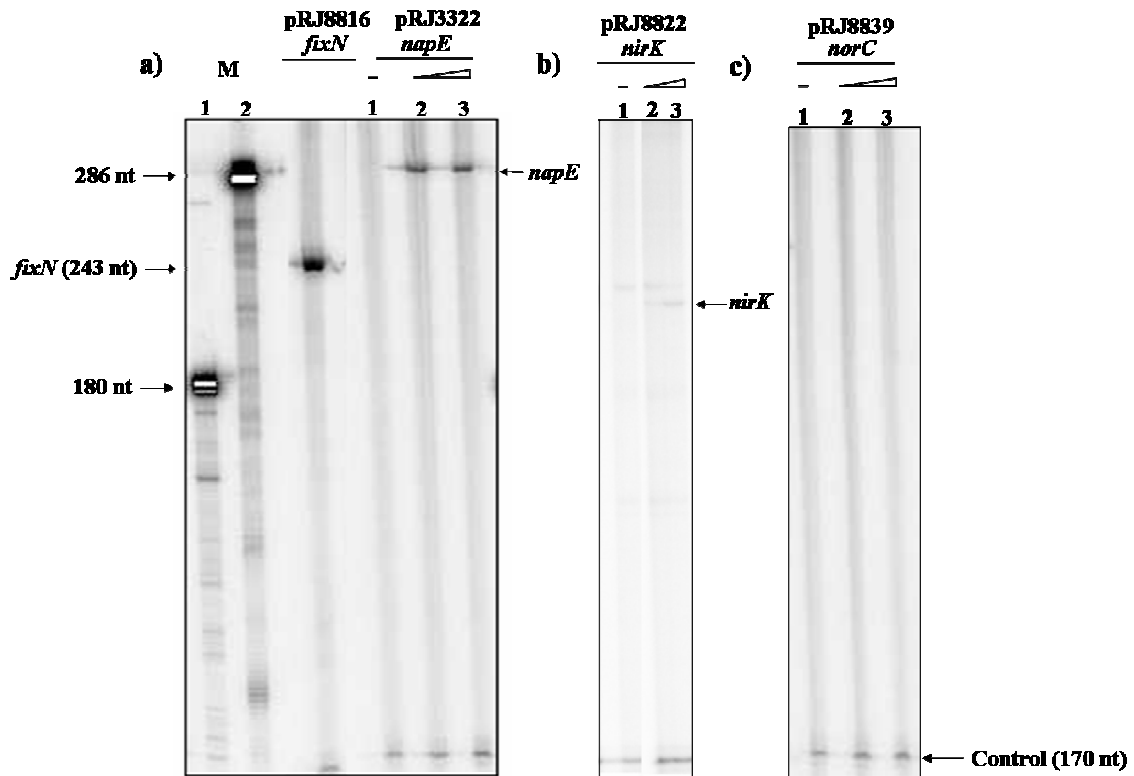


Figure 5.1. *napE* (a), *nirK* (b), and *norC* (c) *in vitro* transcription activation by FixK₂. Supercoiled template plasmids containing either of the indicated promoters cloned upstream of a strong transcriptional terminator were used for multiple-round *in vitro* transcription assays with increasing amounts of purified FixK₂ protein and RNAP from *B. japonicum*. FixK₂ concentrations were as follows: no protein (lane 1), 1.5 μM (lane 2), 3 μM (lane 3). Transcripts synthesized *in vitro* in the presence of [α -³²P]UTP were separated on a 6% denaturing polyacrylamide gel and visualized by phosphorimager analysis of the dried gel. Marker transcripts (M) loaded in lanes M1 and M2 were generated by *in vitro* transcription with T3 RNAPolymerase of the plasmids pRJ9061 and pRJ8817 linearized with BstXI and BglII, respectively. The 107-nucleotide transcript present in all lanes originates from a promoter located on the plasmid vector and serves as an internal control. Shown are the results from a typical transcription experiment that was repeated at least once for each individual promoter.

To test the fidelity of the *in vitro napE* transcription results and in order to confirm the presence of the non-expected transcript product, we determined the 5' end of the transcript generated by FixK₂-dependent *in vitro* transcription from the *napE* promoter.

RNA synthesized *in vitro* and purified FixK₂ protein (1.25 μM) was used for primer extension with 9519-1 primers that hybridized with the template plasmid pRJ9519. Extension products were run on a sequencing gel next to a sequence ladder generated with the same oligonucleotide and plasmid pRJ3322. As shown in Figure 2a, the 5′ end of the *in vitro* synthesized *napE* transcript was located at 41.5 bp from the FixK₂ binding site TTGAT-N₄-ATCAA (Fig. 5.2b) confirming the presence of the 305 bp product obtained after *in vitro* transcription analysis.

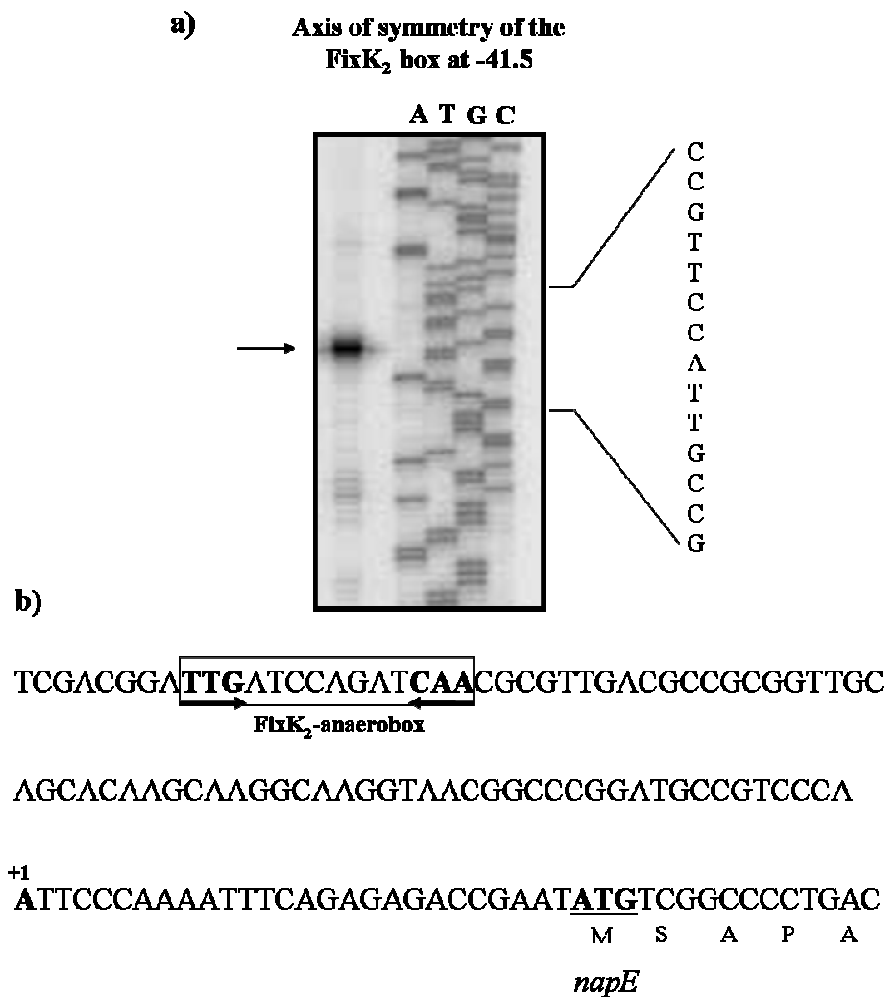


Figure 5.2. (a) Mapping of the transcription start site of *B. japonicum napE* gene. RNA synthesized by transcription *in vitro* was subjected to primer extension. The sequencing ladder shown was generated with pRJ3322 and primer 9519-1 was used for the transcript mapping. The transcriptional start site for *napE* is marked with an arrow. (b) The *napE* promoter sequence. The nucleotide at which transcription initiates is shown in bold and marked +1 above. The putative FixK₂-binding site is indicated by two arrows.

The putative translational start codon is indicated in bold. The N-terminal sequence of the NapE protein is present in one letter code.

However, this location is different to that observed after *in vivo* transcription experiments (Delgado *et al.*, 2003) where the anaerobox was situated at 66.5 bp from the start site. It might be possible that under the experimental conditions used by Delgado *et al.*, (2003), this FixK₂-dependent transcript found in this work could not be detected. In fact, after looking at other gels obtained after *in vivo* primer extension experiments where RNA concentration was increased, a second signal located at 41.5 bp from the FixK₂-binding site could be detected (data not shown). This second signal corresponds to the FixK₂-dependent transcript detected *in vitro* in this work. These results suggest the presence in *nap* promoter of two transcriptional start sites P1 at 66.5 bp and P2 at 41.5 bp from the FixK₂-binding site (Fig. 5.3). P2 *nap* promoter is less active *in vivo* than P1 promoter. It has been previously demonstrated that levels of *napE* expression were higher in nitrate-respiring cells than in those that were incubated anaerobically in the absence of nitrate (Delgado *et al.*, 2003; Robles *et al.*, 2006). It might be possible that transcription from the P2 FixK₂-dependent promoter in response to low oxygen conditions is lower than transcription from the P1 promoter which could respond to the presence of nitrate or a derived N oxide (NO_x).

CCAAACTTGCGGTTGTGGTCACGGCCCAACCATCCTCGCAAATCGA



CAGAGAGACCGAATATGTCGGCCCCTGACGACACGACCTCG
M S A P D D T T S
napE

Figure 5.3. DNA sequence of the *napE* promoter region and transcription start sites P1 and P2 are shown as angled arrows. The putative FixK₂-binding site is indicated by two arrows. The putative translational start codon is indicated in bold. The N-terminal sequence of the NapE protein is present in one letter code.

Taken together, these results and complementary results obtained in our group allow us to propose that *nap* gene expression is modulated by FixK₂ in response to low oxygen conditions, but another regulatory proteins might be involved in *nap* expression in response to nitrate or a NO_x. The first candidate is the transcriptional regulator NnrR which has been demonstrated is involved in the regulation of the *B. japonicum nap* genes (Robles *et al.*, 2006). These authors found that microaerobic induction of a *napE-lacZ* fusion was retained in a *B. japonicum nnrR* mutant, but no increase in β-galactosidase activity was observed upon nitrate addition. However, recent experiments by isothermal titration calorimetry (ITC) showed that NnrR is not involved in the direct transcription activation of *napE* (Robles *et al.*, submitted for publication).

Other regulatory proteins such as NarXL, NarQP, and NarR have been identified in denitrifying species in response to NO₃⁻/NO₂⁻ (Spanning *et al.*, 2007). NarXL and NarQP are members of two-component regulatory systems (Unden *et al.*, 1995). The NarX and NarQ proteins are the signal sensors, which both respond to NO₃⁻ and NO₂⁻ although with different affinities. NarX is more specific for NO₃⁻ and NarQ for NO₂⁻. The NarL and NarP proteins are their cognate response regulators respectively. In *E. coli*, they bind DNA to control the induction of the genes encoding membrane-bound and periplasmic nitrate reductases and repression of genes encoding alternate anaerobic respiratory enzymes. NarR is a member of the FNR family of transcriptional activators, but it lacks cysteines to incorporate a [4Fe-4S] cluster. NarR of *Paracoccus pantotrophus* (Wood *et al.*, 2001) and *P. denitrificans* (Veldman *et al.*, 2006) is specifically required for transcription of the *narKGHJI* genes most likely in response to NO₃⁻ and/or NO₂⁻. However, neither *narXL*, *narQP*, or *narR* genes have been annotated in the *B. japonicum* genome sequence (<http://www.kazusa.jp/rhizobase>).

***In vitro* transcription of *nirK* by FixK₂.** As explained above and similar as *napE* promoter, *nirK* promoter was efficiently activated by the FixK₂ protein producing a very weak but theoretically expectable transcript of 239 bp according to previous *in vivo* primer extension experiments performed by Bueno *et al.*, (2008, submitted for

publication) (Fig. 5.1b). To test the fidelity of the *in vitro* transcription system we determined the 5' end of the transcript generated by FixK₂-dependent *in vitro* transcription from the *nirK* promoter. 5' end of the *in vitro* synthesized *nirK* transcript was located at 41.5 bp from the FxK₂-binding site, similarly as the *nirK* start site determined previously *in vivo* (Fig. 5.4). By contrast to *napE* promoter, these results demonstrate that only one transcription start site dependent on FixK₂ protein is responsible of *nirK* gene expression. Other regulatory proteins, such as NnrR has been previously proposed to be involved in induction of *nirK* gene (Mesa *et al.*, 2003). However, recent experiments based in isothermal titration calorimetry (ITC) demonstrated that NnrR is not a transcriptional activator of *nirK* gene (Robles *et al.*, submitted for publication). Whether or not other regulatory proteins are involved in *nirK* transcription in *B. japonicum* is unknown.

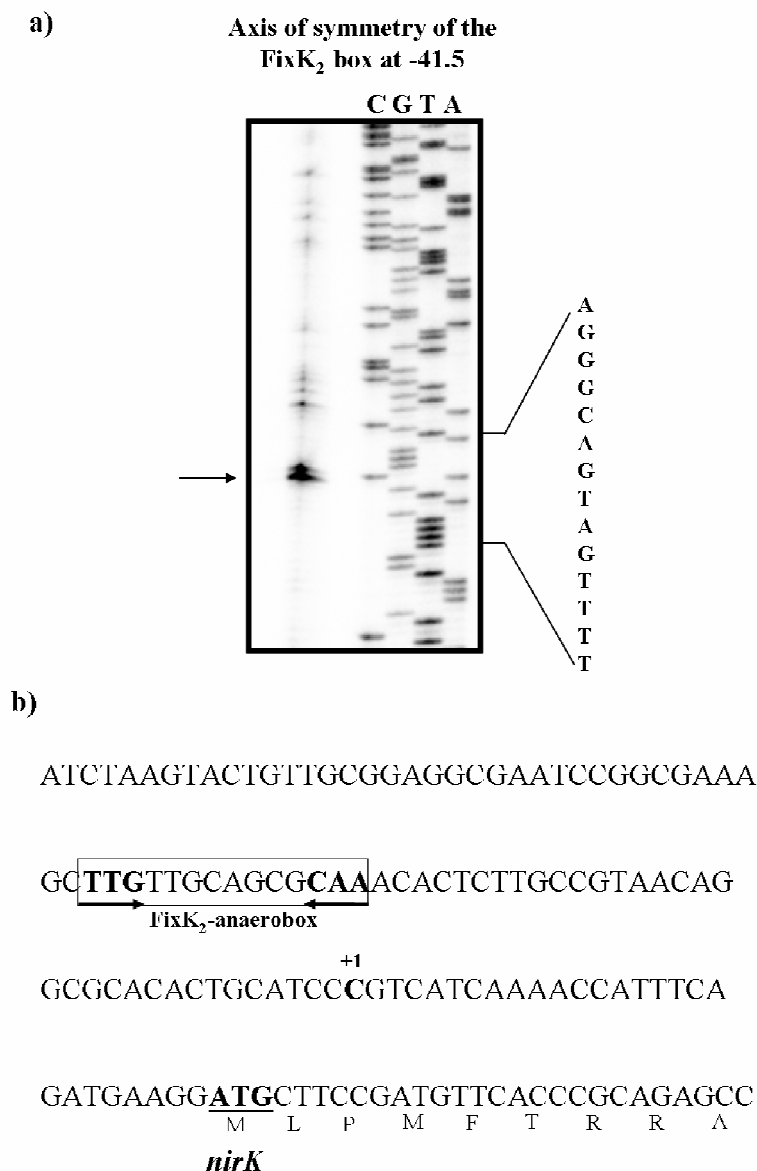


Figure 5.4. (a) Mapping of the transcription start site of *B. japonicum nirK* gene. RNA synthesized by transcription *in vitro* was subjected to primer extension. The sequencing ladder shown was generated with pRJ8822 and primer 9519-1 was used for the transcript mapping. The transcriptional start site for *nirK* is marked with an arrow. (b) The *nirK* promoter sequence. The nucleotide at which transcription initiates is shown in bold and marked +1 above. The putative FixK₂-binding site is indicated by two arrows. The putative translational start codon is indicated in bold. The N-terminal sequence of the NirK protein is present in one letter code.

***In vitro* transcription of *norC* by FixK₂.** To confirm that FixK₂ mediates directly transcription activation of *norCBQD* genes encoding the nitric oxide reductase, we monitored RNA synthesis by multiple round *in vitro* transcription from the *norC* promoter. In contrast to the positive *in vitro* activation mediated by FixK₂ over the *napE* and *nirK* promoters, *in vitro* transcription product using a *norC* promoter could not be detected after using different concentrations of FixK₂ (Fig. 5.1c). However, a vector-encoded transcript of 107 nucleotides that served as a control could be observed (Fig. 5.1c). These results were unexpected since it has been established that FixK₂ is required for *nor* expression. (Mesa *et al.*, 2002). The promoter region of the *norCBQD* genes has also been previously characterized by primer extension and a major transcript initiates 45.5 bp downstream to the centre of a putative FNR-binding site was identified (Mesa *et al.*, 2002). Recent isothermal titration calorimetry allowed demonstration that NnrR bound to a specific DNA fragment from the promoter region of the *norCBQD* genes and that interaction requires anaerobic conditions, but not the presence of an N oxide. Since NnrR is a FNR-like transcriptional regulator, it might be possible that this protein is able to recognize the FNR binding site found in the *norC* promoter region. These findings support our observations and rule out the previously proposed hypothesis that FixK₂ is the transcriptional activator of *nor* genes in *B. japonicum*. Since microaerobic activation of an *nnrR'*-*lacZ* fusion requires FixLJ and FixK₂, expression of a *norC-lacZ* fusion is not observed in a *fixK₂* mutant (Mesa *et al.*, 2003).

According to the recently sequenced *B. japonicum* genome (<http://www.kazusa.jp/rhizobase>), a *norE*-like gene is located very close to the *norCBQD* genes. In some denitrifying bacteria, upstream to the structural genes *norCB* genes, other two *nor* genes called *norEF* are present (Kukimoto *et al.*, 2000; Bedzyk *et al.*, 1999; Arai *et al.*, 1994). Looking at the promoter region of the *B. japonicum norE* gene, a typical TTGTC-N₄-GACAA FNR-like binding site has been identified. To investigate if this *norE* promoter is FixK₂ dependent, *in vitro* transcription studies were performed (data not shown). Similarly as observed in the *norC in vitro* transcription experiments, no FixK₂-dependent transcript was detected (data not shown).

All these findings indicate a disparate regulation of *B. japonicum* denitrification genes by FixK₂, in which this regulatory protein is directly involved in *nap* and *nirK* transcription, but not in *nor* transcription. In fact, by using promoter fusions to the *lacZ*

reporter gene, Mesa *et al.*, (2003) and Robles *et al.*, (2006) have demonstrated that induction of the *norCBQD* promoter was completely abolished in the absence of a functional *nnrR* gene. By contrast, microaerobic induction of the *napEDABC* and *nirK* promoters was retained in the *nnrR* mutant background, implying that the *napEDABC* or *nirK* and the *norCBQD* promoter exhibit slight differences with regard to their dependence on FixK₂ in the absence of NnrR. Taken together, these results confirm the hypothesis that propose a disparate regulation of denitrification genes in *B. japonicum*, in which NnrR is involved in transcription activation of the *nor* genes, and FixK₂ is the transcriptional regulator of the *nap* and *nirK* genes.

In addition, recent results from genome-wide transcriptional profiling analysis of a *B. japonicum nnrR* mutant revealed that *norCBQD* operon expression was reduced by a factor of 159 to 69. However, *napEDABC* operon and *nirK* gene showed only a decreased expression factor of about 20 (data not shown).

Although NnrR is not a transcriptional activator of *nirK* or *napEDABC* genes (Robles *et al.*, submitted for publication), low expression of those genes were observed in a *B. japonicum nnrR* mutant (Mesa *et al.*, 2003; Robles *et al.*, 2006). Since *nor* expression is completely abolished in a *nnrR* mutant (Mesa *et al.*, 2003), NO might be accumulated in this mutant due to the loss of NO reductase activity during incubation under microaerobic conditions with nitrate. The accumulated NO might have an inhibitory effect on *nirK* or *napEDABC* expression. In recent publications, a nitric oxide-responsive regulator called NsrR has been proposed to sense NO made as a product of nitrite reduction, and to repress transcription of the gene *nirK* encoding the copper nitrite reductase (Beaumont *et al.*, 2004). This predicted role for NsrR has recently been confirmed for *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and the obligate human pathogen *Neisseria gonorrhoeae* (Fileenko *et al.*, 2007, Nakano *et al.*, 2006; Overton *et al.*, 2006). However, a *nsrR*-like gene has not been annotated in the genome sequence of *B. japonicum*, (<http://www.kazusa.jp/rhizobase>). Whether or not *B. japonicum* denitrification genes are repressed by NO as well as the identity of the regulatory protein involved in this regulation is in this moment under investigation.

5.5. REFERENCES.

Arai, H., Y. Igarashi, and T. Kodama. 1995. Expression of the *nir* and *nor* genes for denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* requires a novel CRP/FNR-related transcriptional regulator, DNR, in addition to ANR. FEBS Lett. 371:73-76.

Beaumont, H. J. E., S. I. Lens, W. N. M. Reijnders, H. V. Westerhoff, and R. J. M. van Spanning. 2004. Expression of nitrite reductase in *Nitrosomonas europaea* involves NsrR, a novel nitrite-sensitive transcription repressor. Mol. Microbiol. 54:148-158.

Beck, C., R. Marty, S. Kläusli, H. Hennecke, and M. Göttfert. 1997. Dissection of the transcription machinery for housekeeping genes of *Bradyrhizobium japonicum*. J. Bacteriol. 179:364–369.

Bedzyk L, Wang T, Ye RW. 1999. The periplasmic nitrate reductase in *Pseudomonas* sp. strain G-179 catalyzes the first step of denitrification. J. Bacteriol. 181:2802-2806.

Belyaeva, T., L. Griffiths, S. Minchin, J. Cole, and S. Busby. 1993. The *Escherichia coli* *cysG* promoter belongs to the ‘extended 10’ class of bacterial promoters. Biochem. J. 296:851–857.

Busby, S., and R. H. Ebright. 1999. Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). J. Mol. Biol. 293:199–213.

Busby, S.; Kolb, A. The CAP modulon. In: Lin E C C, Lynch A S. , editors. Regulation of gene expression in *Escherichia coli*. R. G. Austin, Tex: Landes Company; 1996. pp. 255–279.

Delgado, M.J., Bonnard, N., Tresierra-Ayala, A., Bedmar, E.J. and Muller, P. 2003. Microbiology 149:3395–3403

Filenko N., Spiro S., Browning D. F., Squire D., Overton T. W., Cole J., and Constantinidou C. 2007. The NsrR Regulon of *Escherichia coli* K-12 includes genes

encoding the hybrid Cluster Protein and the Periplasmic, Respiratory Nitrite Reductase. *J. Bacteriol.* 189 : 4410-4417.

Fischer, H. M. 1994. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol. Rev.* 58:352–386.

Fischer, H. M. 1996. Environmental regulation of rhizobial symbiotic nitrogen fixation genes. *Trends Microbiol.* 4:317–320.

Gilles-Gonzalez, M. A., Ditta G. S., and Helinski D. R. 1991. A haemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *Rhizobium meliloti*. *Nature* 350:170–172.

Gong, W., Hao B., Mansy S. S., Gonzalez G., Gilles-Gonzalez M. A., and Chan. M. K. 1998. Structure of a biological oxygen sensor: a new mechanism for heme-driven signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:15177–15182.

Green, J., Scott C., and J. R. Guest. 2001. Functional versatility in the CRP-FNR superfamily of transcription factors: FNR and FLP. *Adv. Microb. Physiol.* 44:1–34.

Guest, J. R., J. Green, A. S. Irvine, and S. Spiro. 1996. The FNR modulon and FNR-regulated gene expression, p. 317–342. *In* E. C. C. Lin and A. S. Lynch (ed.), *Regulation and gene expression in Escherichia coli*. Landes and Co., Austin, Tex.

Körner, H., H. J. Sofia, and W. G. Zumft. 2003. Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiol. Rev.* 27:559–592.

Kukimoto M, Nishiyama M, Tanokura M, Horinouchi S. 2000. Gene organization for nitric oxide reduction in *Alcaligenes faecalis* S-6. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64:852–7.

Liggit, P., S. H. Cheng, and E. J. Baker. 1994. Generating customized, long-lived ³²P-labeled RNA size markers. *BioTechniques* 17:465–467.

- Mesa S., Ucurum Z., Hennecke H., Fischer H.M. 2005. Transcription activation in vitro by the *Bradyrhizobium japonicum* regulatory protein FixK₂. J. Bacteriol. 187:3329-38.
- Mesa, S., E. J. Bedmar, A. Chanfon, H. Hennecke, and H. M. Fischer. 2003. *Bradyrhizobium japonicum* NnrR, a denitrification regulator, expands the FixLJ-FixK₂ regulatory cascade. J. Bacteriol. 185:3978–3982.
- Mesa, S., L. Velasco., M. E. Manzanera, M. J. Delgado, and E. J. Bedmar. 2002. Characterization of the *norCBQD* genes, encoding nitric oxide reductase, in the nitrogen fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. Microbiology 148: 3553-3560.
- Muse, W. B., Rosario C. J., and Bender R. A.. 2003. Nitrogen regulation of the *codBA* (cytosine deaminase) operon from *Escherichia coli* by the nitrogen assimilation control protein, NAC. J. Bacteriol. 185:2920–2926.
- Nakano, M. M., Geng H., Nakano S., and Kobayashi K.. 2006. The nitric oxide-responsive regulator NsrR controls ResDE-dependent gene expression. J. Bacteriol. 188:5878-5887.
- Nellen-Anthamatten, D., Rossi P., Preisig O., Kullik I., Babst M., Fischer H. M., and Hennecke H.. 1998. *Bradyrhizobium japonicum* FixK₂, a crucial distributor in the FixLJ-dependent regulatory cascade for control of genes inducible by low oxygen levels. J. Bacteriol. 180:5251–5255.
- Overton, T. W., Whitehead R., Li Y., Snyder L. A. S., Saunders N. J., Smith H., and Cole J. A.. 2006. Coordinated regulation of the *Neisseria gonorrhoeae* truncated denitrification pathway by the oxygen-sensitive repressor, NsrR, and nitrite-insensitive NarQ-NarP. J. Biol. Chem. 281:33115-33126.
- Robles, E. F., Sánchez C., Delgado M. J., and Bedmar E. J.. 2006. The *Bradyrhizobium japonicum* *napEDABC* genes are controlled by the FixLJ-FixK₂-NnrR regulatory cascade. Biochem. Soc. Trans. 34: 108-110.

Uden G., Becker S., Bongaerts J., Holighaus G., Schirawski J. and Six S. 1995. O₂-Sensing and O₂-dependent gene regulation in facultatively anaerobic bacteria. Arch. of Microbiol. 164:81-90.

Vairinhos, F., Wallace W., and Nicholas D. J. D.. 1989. Simultaneous assimilation and denitrification of nitrate by *Bradyrhizobium japonicum*. J. Gen. Microbiol. 135: 189-193.

Velasco L., Mesa S., Delgado M., Bedmar E. J. 2001. Characterization of the *nirK* gene encoding the respiratory, Cu-containing nitrite reductase of *Bradyrhizobium japonicum*. Biochimica et Biophysica acta. 1521:130-134.

Veldman R., Reijnders W.N., van Spanning R.J. 2006. Specificity of FNR-type regulators in *Paracoccus denitrificans*. Biochem. Soc. Trans. 34:94-6.

Wood N.J., Alizadeh T., Bennett S., Pearce J., Ferguson S.J., Richardson D.J., and Moir J.W. 2001. Maximal expression of membrane-bound nitrate reductase in *Paracoccus* is induced by nitrate via a third FNR-like regulator named NarR. J. Bacteriol. 183: 3606-13.

DISCUSIÓN GENERAL

1. implicación del citocromo c_{550} de *Bradyrhizobium japonicum* en el proceso de desnitrificación.

En *Bradyrhizobium japonicum* se han identificado y caracterizado los genes responsables de la síntesis de las enzimas nitrato reductasa periplásmica, nitrito reductasa, óxido nítrico reductasa y óxido nitroso reductasa que intervienen en la reducción secuencial de nitrato hasta nitrógeno molecular en el proceso de desnitrificación. Sin embargo, se desconocía la implicación de otras proteínas que pudieran intervenir como intermediarios en el transporte electrónico asociado al proceso de desnitrificación. Desde 1991, se conocía la existencia en *B. japonicum* de tres citocromos solubles de bajo peso molecular, c_{550} , c_{552} , y c_{555} , los cuales son codificados por los genes *cycA*, *cycB* and *cycC*, respectivamente (Appleby *et al.*, 1991, Tully *et al.*, 1991, Bott *et al.*, 1995), sin embargo su función era desconocida. En el caso concreto del citocromo c_{550} , se había sugerido que pudiera estar implicado en la respiración de nitrato (Bott *et al.*, 1995), pero se desconocía su papel en dicho proceso. En el segundo capítulo de esta tesis, se ha estudiado la implicación del citocromo periplásmico c_{550} , codificado por el gen *cycA*, en la respiración de nitrato y nitrito en *B. japonicum*. Para ello, se ha analizado la capacidad de una cepa mutante en el gen *cycA* de crecer en condiciones anaeróbicas con nitrato o nitrito como aceptores de electrones. Puesto que dicha mutante fue incapaz de crecer con nitrito y de consumirlo (Fig. 2.1a y b), procedimos a analizar la actividad nitrito reductasa (Nir) en dicha cepa. Para ello, se utilizó un donador artificial [metil viológeno (MV)] o un donador fisiológico (succinato) de electrones. La actividad de la enzima nitrito reductasa (Nir) no se afectó en la mutante *cycA*, cuando se utilizó MV, sin embargo, cuando se utilizó succinato como donador de electrones, los niveles de actividad Nir disminuyeron en la mutante (Fig. 2.1c). En presencia de succinato, puesto que la enzima es activa, es posible que se haya afectado la transferencia de electrones desde este donador de electrones a la NirK. Considerados en conjunto, estos resultados sugieren que el citocromo c_{550} podría actuar como donador de electrones intermediario entre el complejo de membrana bc_1 y la nitrito reductasa periplásmica NirK. En otras bacterias desnitrificantes, se ha demostrado la existencia de una flexibilidad en el transporte electrónico a la nitrito reductasa, ya que, además del citocromo c_{550} , otras proteínas de cobre (azurinas o pseudoazurinas), así como otros

citocromos, también transfieren electrones a la enzima (Pearson *et al.*, 2003; Laratta *et al.*, 2006). Sin embargo, en *B. japonicum* no se da esta flexibilidad a la vista del fenotipo observado en la mutante *cycA*. Además, en la secuencia del genoma de *B. japonicum* (<http://www.kazusa.or.jp/rhizobase>) no se han identificado proteínas homólogas a azurinas o pseudoazurinas.

Además de su incapacidad de crecer con nitrito, la mutante *cycA* mostró un retraso en su crecimiento en condiciones anaeróbicas con nitrato en comparación con la cepa parental (Fig. 2.2a). Apoyando estos resultados, también se observó un retraso en la expresión de una fusión transcripcional *napE-lacZ*, y en la actividad nitrato reductasa (Fig. 2.2a y b). Este retraso en la expresión de los genes *nap*, también se observó en una cepa mutante alterada en el gen *fixN*, responsable de la síntesis de la subunidad catalítica de la oxidasa terminal *cbb₃* de elevada afinidad (Fig. 2.3a y b).

Hasta siete proteínas que contienen hemo *c* se han identificado en las membranas de *B. japonicum* USDA110 después de 4 días de cultivo en anaerobiosis con nitrato (Fig. 2.4b, carril 1). De esas siete bandas, la de 25 kDa se ha demostrado que es la subunidad NapC de la enzima nitrato reductasa periplásmica (Delgado *et al.* 2003). La detección de citocromos *c* en las mutantes *cycA* y *fixN* (Fig. 2.4b), reveló una disminución en la expresión de la proteína NapC a los 4 días de cultivo en anaerobiosis con nitrato. Estos resultados confirman el retraso observado en la expresión de los genes *napEDABC* en ambas mutantes. De hecho, en experimentos de cultivo continuo usando un quimiostato, se observó un retraso en el consumo de oxígeno en las mutantes *cycA* y *fixN*, que era paralelo al retraso observado en la expresión del gen *napE* en dichas cepas, en comparación con la cepa parental.

De las siete bandas identificadas en la cepa parental tras 4 días de cultivo en condiciones anaeróbicas con nitrato (Fig. 2.4b), los citocromos de 32 y 28 kDa corresponden a los componentes FixP y FixO de la oxidasa *cbb₃* de *B. japonicum*. La detección de estas proteínas en la cepa mutante *cycA* demostró una disminución en su expresión en comparación con la cepa parental. Este resultado, junto con el defecto en el consumo de

oxígeno detectado en la mutante *cycA*, nos llevó a pensar que en dicha mutante, el defecto en la expresión de los genes *nap*, pudiera ser el resultado de la alteración en la expresión de la oxidasa terminal *cbb₃*, y consecuentemente de su menor eficiencia respiratoria. Estos resultados nos permiten postular, que la máxima expresión de los genes *nap* requiere condiciones muy limitantes en oxígeno, las cuales ocurren cuando la oxidasa *cbb₃* ha consumido el oxígeno presente en el medio. A favor de esta hipótesis, y como se observa en la figura 2.4a y b, a los dos días de incubación en condiciones anaeróbicas con nitrato, se observó expresión de las proteínas FixP y FixO en la cepa parental, sin embargo, aún no se detectaron las proteínas NapC o NorC, las cuales se expresan a los 4 días de incubación en estas condiciones. En *B. japonicum* se ha descrito la existencia de dos cascadas regulatorias en respuesta a oxígeno, el sistema FixLJ/FixK₂, que responde a condiciones microaeróbicas y del que depende la inducción de los genes de la desnitrificación (Bedmar *et al.*, 2005) y otros genes implicados en el metabolismo microaeróbico como el operón *fixNOQP* que codifica la oxidasa terminal *cbb₃* (Nellen-Anthamatten *et al.*, 1998). El segundo sistema es el dependiente de NifA el cual activa la expresión de los genes de la fijación de nitrógeno a concentraciones muy bajas de oxígeno (<2%, Sciotti *et al.*, 2003). Puesto que los resultados obtenidos en este capítulo sugieren que la expresión máxima de los genes de la desnitrificación ocurre a concentraciones muy bajas de oxígeno, cabe pensar que la proteína NifA pudiera tener algún papel en este control.

2. Efecto del potencial redox en la expresión de la oxidasa *cbb₃* de *Bradyrhizobium japonicum*.

En el capítulo 2 de esta tesis, se ha demostrado que una cepa de *B. japonicum* afectada en el citocromo *c₅₅₀*, cultivada en condiciones desnitrificantes, muestra menor capacidad de consumir oxígeno, así como una disminución en la expresión de las proteínas FixP y FixO. Estos resultados sugieren que dicho citocromo podría estar implicado en la transferencia de electrones a la citocromo *c* oxidasa *cbb₃*. En el tercer capítulo de la tesis, y con el objeto de establecer el papel del citocromo *c₅₅₀* en la transferencia de electrones a la oxidasa *cbb₃*, se ha llevado a cabo el análisis de la expresión y actividad de la oxidasa

cbb₃ en condiciones limitantes de oxígeno y en ausencia de nitrato, donde únicamente la respiración microaeróbica mediada por la oxidasa *cbb₃* es inducida, o en presencia de nitrato donde tanto la respiración de nitrato como de oxígeno se expresan. Los resultados obtenidos en los experimentos de tinción de grupos hemo *c* (Fig. 3.1), espectroscopía UV/Vis (Fig. 3.2), actividad citocromo *c* oxidasa (Fig. 3.3) y expresión de una fusión traduccional *fixP*'-*lacZ* (Fig. 3.4) demuestran que en la cepa mutante *cycA* no se afectó la expresión de la *cbb₃*, así como la actividad citocromo *c* oxidasa, cuando se incubó en condiciones de limitación de oxígeno sin nitrato. Sin embargo, y coincidiendo con los resultados anteriores, la expresión de la oxidasa terminal, así como la actividad citocromo *c* oxidasa de la cepa mutante *cycA* mostraron una considerable disminución, en relación con la cepa parental, cuando se incubaron en condiciones desnitrificantes. Estos resultados sugieren que, aunque el citocromo *c₅₅₀* no está implicado en el transporte electrónico a la *cbb₃*, una mutación en el gen responsable de su síntesis afecta la expresión de dicha oxidasa en condiciones desnitrificantes. Por el contrario, en *Rhodobacter sphaeroides* (Daldal *et al.*, 2001), y *Rhodobacter capsulatus* (Swem *et al.*, 2002), se ha demostrado que citocromos homólogos al *c₅₅₀* de *B. japonicum*, citocromos *c₂* y *c_y*, están implicados en el transporte de electrones a la oxidasa terminal *cbb₃* en el proceso de respiración microaeróbica. En *Paracoccus denitrificans* el citocromo *c₅₅₀* actúa como donador de electrones a la oxidasa aeróbica *aa₃* y a la microaeróbica *cbb₃* además de ser donador de electrones a la nitrito reductasa en el proceso de desnitrificación (Otten *et al.*, 2001a).

En el segundo capítulo de esta tesis, demostramos que el citocromo *c₅₅₀* actúa como donador de electrones intermediario entre el complejo *bc₁* y la nitrito reductasa periplásmica, NirK. Es posible, que el bloqueo en la transferencia de electrones asociada al proceso de desnitrificación, resulte en la alteración del potencial redox de la célula, siendo esta alteración la responsable de la disminución en la expresión de la oxidasa terminal *cbb₃* en condiciones limitantes de oxígeno y en presencia de nitrato. Si asumimos que la alteración del potencial redox es consecuencia del bloqueo en la transferencia de electrones al citocromo *c₅₅₀*, la mutación de otro citocromo implicado en la transferencia electrónica asociada a la desnitrificación resultaría en un efecto similar sobre la expresión de la *cbb₃*. Con el objeto de confirmar esta hipótesis, se analizó la expresión del citocromo FixP,

mediante experimentos de tinción de proteínas con grupos hemo *c*, así como, mediante el análisis de la actividad β -Galactosidasa de una fusión traduccional *fixP'*-*lacZ* en una cepa alterada en el gen *napC*, el cual codifica la proteína NapC intermediaria en el transporte de electrones entre el complejo de ubiquinonas y el complejo periplásmico NapAB de la nitrato reductasa periplásmica (Delgado et al., 2003). Los resultados presentados en la figura 3.5, demuestran que la expresión de la *cbb₃* también disminuyó en la cepa mutante *napC*.

El posible efecto de variaciones en el potencial redox sobre la expresión de la *cbb₃*, también se estudió mediante el análisis de la expresión de la fusión traduccional *fixP'*-*lacZ* en células de la cepa parental cultivadas en distintas fuentes de carbono con diferentes estados de reducción. Tras 2 días de incubación, los niveles de actividad β -Galactosidasa fueron menores en las células crecidas con una fuente de carbono reducida como butirato, que la que se detectó con malato o succinato como fuentes de carbono oxidadas. Es sabido que la asimilación de sustratos de carbono reducidos, los cuales generan más equivalentes de reducción que la asimilación de fuentes de carbono oxidadas, incrementan el estado de reducción del pool de ubiquinonas. Por tanto, estos resultados nos permiten sugerir que un cambio en el estado redox del pool de ubiquinonas podría estar implicado en la regulación de la oxidasa terminal *cbb₃*.

El papel del estado de oxidación de las fuentes de carbono en la expresión génica se ha demostrado anteriormente en *Paracoccus pantotrophus* (Richardson & Ferguson, 1992, Sears et al., 2000; Ellington et al., 2002; Ellington et al., 2006) y *Paracoccus denitrificans* (Sears et al., 1997). En ambas especies, la expresión del operón *nap*, que codifica la nitrato reductasa periplásmica, es máxima en células crecidas aeróbicamente con una fuente de carbono reducida tal como butirato. La diferente respuesta a los sustratos carbonados de la expresión del operón *nap* de *Paracoccus* y *fixNOQ* de *B. japonicum* es debido al distinto papel de dichos genes. Mientras que *nap* está implicado en la disipación del exceso de poder reductor en condiciones aeróbicas, la citocromo *c* oxidasa *cbb₃* es la responsable de mantener la respiración microaeróbica en *B. japonicum*.

Considerados en conjunto, los resultados obtenidos en este capítulo sugieren que la interrupción del flujo de electrones a través de la desnitrificación por inactivación de transportadores de electrones, tales como NapC, *c*₅₅₀, o el complejo *bc*₁ puede dar lugar a un cambio en el estado redox intracelular afectando consecuentemente la expresión de la oxidasa terminal *cbb*₃. Nosotros proponemos que la alteración del potencial redox del pool de ubiquinonas puede dar lugar a la producción de señales que activen o repriman la expresión de los genes *fixNOQP* de *B. japonicum*. Apoyando esta hipótesis, en *Paracoccus denitrificans* (Otten *et al.*, 1999; Otten *et al.*, 2001b) se ha demostrado que un cambio en la distribución de electrones en la cadena respiratoria provocado por la inactivación de algunas de las oxidasas que intervienen en la misma, produce un cambio en las señales intracelulares el cual afecta la expresión de la oxidasa *cbb*₃.

En *B. japonicum* la percepción y transducción de variaciones redox intracelulares podrían ser reconocidas por una proteína reguladora capaz de controlar la expresión de *cbb*₃. El principal factor externo que controla la expresión del operón *fixNOQP* en *B. japonicum* es el oxígeno. En condiciones limitantes de oxígeno, la concentración de este es detectada por el sistema en respuesta a oxígeno FixLJ-FixK₂ el cual activa la transcripción del operón *fixNOQP* (Nellen-Anthamatten *et al.*, 1998). En el presente trabajo, proponemos que el oxígeno no es la única señal implicada en la regulación de dicho operón, sino que otras señales como el estado redox de la cadena respiratoria asociada con el proceso de desnitrificación puede afectar la expresión de la oxidasa *cbb*₃. Esas señales podrían permitir a *B. japonicum* adaptar sus redes respiratorias de tal forma que el funcionamiento sea óptimo según las condiciones de crecimiento.

En *Bradyrhizobium japonicum*, se ha identificado el sistema regulador, RegSR, que pertenece a la familia de sistemas reguladores de dos componentes de respuesta a potencial redox descritos en bacterias (Emmerich *et al.*, 2000a). RegR activa la transcripción de los genes para la fijación de nitrógeno a través de la cascada RegSR-NifA la cual es parte de una compleja cascada reguladora en respuesta a variaciones de concentraciones de oxígeno. Estudios transcriptómicos han demostrado que la expresión de casi 250 genes es dependiente de RegR, lo que demuestra la importante contribución de la proteína RegR sobre la expresión génica en respuesta a cambios en concentraciones de oxígeno o potencial

redox (Lindemann *et al.*, 2007). Se ha propuesto una secuencia de unión de RegR (GCGGC-N₅-GTCGC, RegR-box) en base a los alineamientos de los sitios de unión de las proteínas RegR y RegA (Emmerich *et al.*, 2000b) mediante experimentos de unión proteína-ADN *in vitro*. Esos mismos autores, identificaron la secuencia GCGGC-N₅-GTCGC, en la región promotora del operón *fixR-nifA* de *B. japonicum* dependiente de RegR y demostraron que dicha secuencia es esencial para la expresión de dicho operón. Inspección de la secuencia de DNA de la región promotora del operón *fixNOQP* (Mesa *et al.*, 2005) reveló la presencia de la secuencia 5'-GCGGC-N₄-GCCGC-3' en posición -108, la cual es similar a la secuencia propuesta para la unión de RegR. Sin embargo, en contraste con esta observación, la detección de las proteínas FixP y FixO en cepas mutantes en el gen *regR*, crecidas en condiciones desnitrificantes, demostraron similares niveles de expresión de la oxidasa *cbb₃* que los observados en la cepa parental (Fig. 3.4). Esos resultados sugieren que, al menos en condiciones desnitrificantes, la expresión de *cbb₃* no depende de RegSR. Actualmente, se está investigando la implicación de RegR en la expresión de la oxidasa en condiciones tales que provoquen variaciones en el potencial redox de la célula.

4. Implicación de la proteína NifA en la regulación de los genes de la desnitrificación en *Bradyrhizobium japonicum*.

En el segundo capítulo de la tesis, se demostró que la máxima expresión de los genes de la desnitrificación ocurre a los cuatro días de incubación en condiciones anaeróbicas con nitrato, cuando el oxígeno presente en el medio es consumido por la oxidasa *cbb₃*. Además, análisis del consumo de oxígeno y expresión del gen *nap* llevados a cabo en un quimiostato, revelaron que los niveles de actividad β-galactosidasa de una fusión *napE-lacZ* en células de *B. japonicum* 110*spc4* incrementan a medida que el oxígeno es consumido (Bueno *et al.* 2008). En *B. japonicum*, existen dos cascadas regulatorias de respuesta a oxígeno, el sistema FixLJ/K₂ que responde gradualmente a condiciones microaeróbicas (desde 21 a 0.5% de O₂), y el sistema RegRS/NifA que sólo responde a concentraciones inferiores a 2% de O₂ (Sciotti *et al.*, 2003). Resultados previos de nuestro grupo de investigación demostraron la implicación de la cascada FixLJ/FixK₂ en la inducción microaeróbica de los genes de la desnitrificación. Ante la sospecha de que estos genes

podieran estar sometidos a un segundo control anaeróbico mediado por la cascada RegRS/NifA, en este capítulo se ha investigado la implicación de la proteína NifA en la expresión de los genes que *nap* y *nirK*, responsables de la síntesis de las enzimas que inician el proceso de desnitrificación. Los resultados obtenidos (Figs. 4.1, 4.2, y 4.3) demostraron que la cepa mutante en el gen *nifA* manifestó menor capacidad de crecer en condiciones anaeróbicas con nitrato que la cepa parental. Así mismo, los valores de actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa, así como, los de actividad β -galactosidasa de las fusiones transcripcionales *napE-lacZ* y *nirK-lacZ*, fueron inferiores a los detectados en la cepa parental. Además se observó una disminución en la expresión de la proteína NapC (Fig. 4.4), lo que confirmaba la menor expresión de los genes *nap* en la mutante *nifA*. Además de la proteína NapC, se observó una expresión muy baja de la proteína NorC, así como de actividad β -galactosidasa de una fusión *norC-lacZ* en una mutante *nifA*. Estos resultados sugieren que, además de los genes *nap* y *nirK*, NifA podría estar implicada en la expresión de los genes *nor* que codifican la óxido nítrico reductasa. En bacterias desnitrificantes tales como *P. denitrificans* (van Spanning *et al.*, 1999) y *R. sphaeroides* (Kwiatkowski & Shapleigh, 1996), así como resultados previos obtenidos en nuestro grupo (Robles *et al.*, 2008, enviado), se ha propuesto al óxido nítrico (NO) como molécula señal para la activación de la transcripción de los genes *nor*. Por lo tanto en una mutante *nifA*, donde la expresión de *nirK* se encuentra disminuida, la baja producción de NO podría ser la causa de la no activación de los genes *nor*. Por lo tanto, no se puede excluir que el control de NifA sobre los genes *nor* sea indirecto como consecuencia del control sobre el gen *nirK*.

Estos resultados sugieren, que además de la proteína FixK₂, NifA también controla la expresión de los genes de la desnitrificación *napEDABC* y *nirK*, enfatizando el papel de NifA previamente sugerido como un activador de la inducción anaeróbica de otros genes además de los clásicos genes de la fijación de nitrógeno (Nienaber *et al.*, 2000, Hauser *et al.*, 2007).

En este capítulo, también se llevó a cabo la caracterización del promotor del gen *nirK*, lo que permitió localizar el inicio de la transcripción a 26 nucleótidos aguas arriba del inicio del gen *nirK*. Los niveles de cDNA obtenidos tras la extensión con el cebador de *nirK*

fueron significativamente menores en la mutante *nifA* comparados con los observados en la cepa parental (Fig. 4.5a). Estos resultados confirman el papel de NifA en la regulación del gen *nirK*. El análisis de la secuencia de la región promotora del gen *nirK* reveló la presencia de la secuencia 5'-TTGTT-N₄-CGCAA-3, que comparte 7 bases con la secuencia consenso 5'-TTGAT-N₄-GTCAA-3, que reconocen las proteínas activadoras de la transcripción del tipo FixK (Zumft 1997, Fischer 1994, Spiro *et al.*, 1994). Esta secuencia ha sido propuesta previamente como sitio de unión para la proteína reguladora FixK₂ (Velasco *et al.* 2001). De hecho, la ausencia de cDNA en la mutante *fixK₂* (Fig. 4.5a) confirmó la implicación de FixK₂ en la expresión de *nirK*. Solapando con esta secuencia, se encontró la secuencia 5'-TGT-N₁₀-ACA-3', similar a la secuencia propuesta como sitio de unión de NifA, la cual está presente en la mayoría pero no en todos, los promotores dependientes de NifA (Fischer, 1994). Está bien establecido que la proteína NifA activa la expresión de genes en cooperación con la RNA polimerasa que contiene el factor σ^{54} , el cual permite a la RNA polimerasa reconocer promotores del tipo -24/-12 (Buck *et al.* 1987). Sin embargo, en la región promotora del gen *nirK* no se detectó la secuencia consenso del factor σ^{54} . Esta observación es apoyada por resultados obtenidos tras la caracterización de una doble mutante *rpoN₁₂* de *B. japonicum*, responsable de la síntesis del factor σ^{54} . En estos experimentos, esta cepa mutante fue capaz de crecer y expresar los mismos niveles de actividad NiR y expresión de una fusión *nirK-lacZ* que la cepa parental cuando las células se incubaron en condiciones desnitrificantes.

Los resultados obtenidos en este capítulo, nos permiten proponer un nuevo modelo en el control por oxígeno de los genes de la desnitrificación, más concretamente de los genes *nap* y *nirK* de *B. japonicum* (Figura 6.1) en el cual estarían implicadas las dos cascadas de respuesta a oxígeno descritas en esta bacteria. En este modelo, la cascada FixLJ/FixK₂ es esencial para la inducción microaeróbica de los genes *nap*, *nirK* (Mesa *et al.*, 2004; Robles *et al.*, 2006). Además de estos genes, en condiciones microaeróbicas, FixK₂ también activaría los genes *fixNOQP* responsables de la síntesis de la oxidasa *cbb₃*. Una vez que el oxígeno es consumido por esta oxidasa, tendría lugar la máxima expresión de los genes *nirK* y *nap* en condiciones anaeróbicas la cual estaría mediada por la proteína NifA.

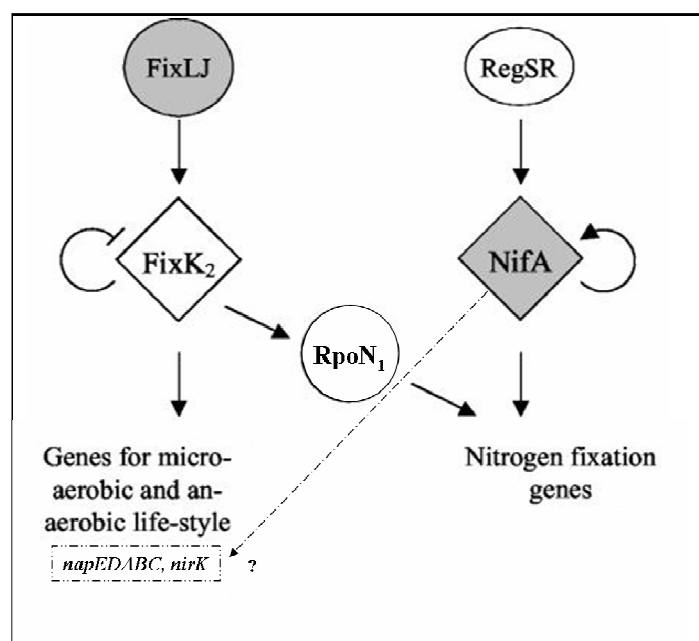


Figura 6.1. Modelo de regulación en *B. japonicum* de los genes de la desnitrificación por la cascada regulatoria en respuesta a oxígeno FixLJ-FixK₂-NnrR y RegSR-NifA (adaptado de Mesa *et al.*, 2003).

5. Activación de la transcripción *in vitro* de los genes de la desnitrificación mediada por la proteína FixK₂.

Como ya hemos comentado en los capítulos anteriores, en *Bradyrhizobium japonicum*, la proteína reguladora FixK₂ juega un papel esencial en la regulación de la transcripción de un amplio número de genes microaeróbicos, anaeróbicos o simbióticos (Nellen Anthamatten *et al.*, 1998; Mesa *et al.*, 2003). De hecho, el papel de la proteína reguladora FixK₂ en el control de los genes de la desnitrificación se ha demostrado en estudios de expresión génica *in vivo*, mediante el uso de fusiones transcripcionales, (Bedmar *et al.*, 2005), así como, en los resultados presentados en la figura 5.5 de esta tesis. Sin embargo, el control directo de esta proteína sobre la activación de estos genes no se había demostrado. Para confirmar que FixK₂ media directamente la activación de la transcripción de dichos promotores, se han llevado a cabo experimentos de síntesis de RNA mediante transcripción *in vitro* a partir de los promotores de los genes *napE*, *nirK* y *norC*. Los resultados obtenidos (Fig. 5.1)

demonstraron que, en presencia de distintas concentraciones de la proteína FixK₂ purificada, la RNA polimerasa de *B. japonicum* transcribió los promotores de *napE* y *nirK*, pero no de *norC*. Para corroborar la fidelidad de los experimentos de transcripción *in vitro*, determinamos el extremo 5' del transcrito generado en dichos experimentos mediante análisis de extensión de cebador. Sorprendentemente, el extremo 5' terminal del transcrito de *napE* sintetizado *in vitro* se localizó a 41.5 nucleótidos del sitio de unión de la proteína FixK₂, en contraste con el obtenido previamente *in vivo* por Delgado y colaboradores (2003) que se localizaba a 66.5 nucleótidos. Es posible que, en las condiciones utilizadas para los experimentos de extensión de cebador *in vivo*, el transcrito dependiente de FixK₂ detectado en este trabajo no se observara. De hecho, una observación más en profundidad de los geles de secuenciación obtenidos por Delgado y col. (2003), permitió la detección de una débil señal a 41.5 nucleótidos de la caja FixK₂ en aquellos geles en los que se cargaron concentraciones más elevadas de ARN. Estos resultados, sugiere la presencia de dos sitios de inicio de la transcripción en el promotor de *napE* (Fig. 5.2), uno dependiente de FixK₂ situado a 41.5 nucleótidos de la secuencia de unión a dicha proteína, y otro más activo *in vivo* situado a 66.5 nucleótidos. A este promotor, se unirían otras proteínas reguladoras que participarían en la expresión de los genes *napEDABC* en respuesta a otros factores como son el nitrato o algún óxido de nitrógeno derivado de su reducción.

Como se ha mencionado anteriormente, en este capítulo se ha demostrado que junto a *napE*, *nirK* es otro gen activado directamente por FixK₂. En este caso, el sitio de inicio de la transcripción detectado *in vitro* se sitúa a 41.5 bases de la caja FixK₂ y coincide con el observado en experimentos de extensión de cebador *in vivo* (Fig. 5.5).

Por el contrario, no se ha podido demostrar en este trabajo que FixK₂ transcriba directamente a los genes *nor* de *B. japonicum*. Mediante experimentos de calorimetría de titulación, se ha demostrado recientemente en nuestro grupo de investigación (Robles *et al.*, 2008, enviado) que el activador transcripcional NnrR se une al promotor de los genes *nor* en condiciones de anaerobiosis, pero no a los de los genes *napE* y *nirK*. Considerando en conjunto los resultados obtenidos en esta Tesis, y los resultados previos del grupo, proponemos la existencia en *B. japonicum* de un complejo circuito de regulación en

respuesta a condiciones limitantes de oxígeno (Figura 6.2). Por un lado, FixK₂ sería la proteína activadora de los genes *napEDABC* y *nirK* en respuesta a condiciones microaeróbicas, y NnrR, que también depende de FixK₂, sería la responsable de la transcripción de los genes *norCBQD*. De hecho, se ha demostrado que la unión de NnrR al promotor de los genes *nor* sólo requiere condiciones de anaerobiosis y es independiente de óxido nítrico (Robles et al., 2008, enviado). Es importante tener en cuenta que, además del oxígeno, otro factor que interviene en la inducción de los genes de la desnitrificación es el nitrato o un óxido de nitrógeno derivado (Bedmar et al., 2005). De hecho, se ha propuesto recientemente que el óxido nítrico estaría implicado en la activación de los genes *norCBQD* a través de NnrR y, por otro, el nitrato lo estaría en la activación de los genes *napEDABC* y *nirK*. (Robles et al., 2008, enviado). Se desconoce si la acción del óxido nítrico sobre NnrR es directa o se efectúa a través de otra proteína intermediaria. Igualmente, la identidad de la proteína responsable de la activación de los genes *nap* y *nir*, en respuesta a nitrato es desconocida. En la secuencia del genoma de *B. japonicum* (<http://www.kazusa.or.jp/rhizobase>) no se han identificado proteínas homólogas a NarXL/QP o NarR, responsables en otros desnitrificantes de la activación de los genes que codifican la enzima nitrato reductasa respiratoria.

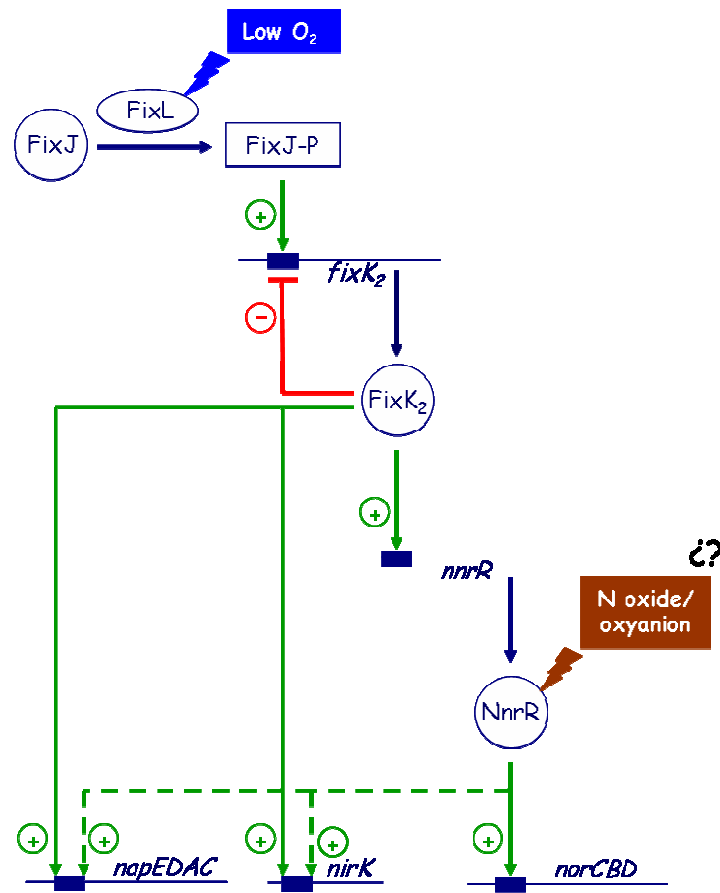


Figura 6.2. Control de los genes de la desnitrificación mediado por el sistema FixLJ-FixK2-NnrR en *B. japonicum*.

CONCLUSIONES.

The main general conclusions of this Thesis are:

1. The cytochrome *c₅₅₀* of *Bradyrhizobium japonicum* is the electron donor between the *bc₁* complex and the NirK periplasmic nitrite reductase.
2. A mutation in the *cycA* gene which encode the cytochrome *c₅₅₀*, result in a delay of *B. japonicum napEDABC* genes expresión. This delay is due to lower expresión of the cytochrome *c* oxidase *cbb₃* in the *cycA* mutant.
3. The redox state of the respiration chain asociated with the denitrification pathway may affect the expresión of the cytochrome *c* oxidase *cbb₃*.
4. The NifA protein is implicated in expresión of the *Bradyrhizobium japonicum napEDABC* and *nirK* genes
5. The FixK2 protein activate the transcription of the La proteína FixK₂ activa la *napEDABC* and *nirK* genes promoters of *Bradyrhizobium japonicum*, but not the *norCBQD* genes.
6. We propose the existence of a complex mechanism for denitrification genes regulation in response to low oxygen conditions. In this control FixK₂ is involved in the activation of *napEDABC* and *nirK* genes under microaerobic conditions and the NifA protein under anaerobic conditions. However, NnrR protein meditate the activation of *norCBQD* genes.

Las principales conclusiones generales de la presente tesis doctoral son:

1. El citocromo *c₅₅₀* de *Bradyrhizobium japonicum* es el donador de electrones intermediario entre el complejo de membrana *bc₁* y la nitrito reductasa periplásmica NirK.
2. La mutación en el gen *cycA*, responsable de la síntesis del citocromo *c₅₅₀*, da lugar a un retraso en la expresión de los genes *napEDABC* de *B. japonicum*. Este retraso es debido a una menor expresión de la oxidasa *cbb₃* en la mutante *cycA*.
3. El estado redox de la cadena respiratoria asociada con el proceso de desnitrificación puede afectar la expresión de la oxidasa *cbb₃*.
4. La proteína NifA está implicada en la expresión de los genes *napEDABC* y *nirK* de *Bradyrhizobium japonicum*.
5. La proteína FixK₂ activa la transcripción de los promotores de los genes *napEDABC* y *nirK* de *Bradyrhizobium japonicum*, pero no la de los genes *norCBQD*.
6. Proponemos la existencia en *B. japonicum* de un complejo circuito de regulación de los genes de la desnitrificación en respuesta a condiciones limitantes de oxígeno. Por un lado, FixK₂ sería la proteína activadora de los genes *napEDABC* y *nirK* en respuesta a condiciones microaeróbicas, y NifA en respuesta a condiciones anaeróbicas. En cambio, la proteína NnrR sería la responsable de la transcripción de los genes *norCBQD*.