

T 3-31

UNIVERSIDAD DE GRANADA

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 27/05/97
ENTRADA NUM. 1681

FACULTAD DE CIENCIAS

Actividad nitrato reductasa y monóxido de carbono deshidrogenasa en

Bradyrhizobium japonicum

María Josefa Lorite Ortega

TESIS DOCTORAL

1997

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA Y MONOXIDO DE CARBONO

DESHIDROGENASA EN *Bradyrhizobium japonicum*

Memoria que presenta la licenciada en Ciencias Biológicas

Dña. María Josefa Lorite Ortega, para aspirar al grado de Doctor.

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
N.º Documento 613380874
N.º Copia 15407834

Fdo.: María Josefa Lorite Ortega

VºBº

El director

Fdo.: Eulogio José Bedmar Gómez

Doctor en Ciencias Biológicas

Investigador científico del C.S.I.C.

VºBº

El director

Fdo.: Juan Sanjuan Pinilla

Doctor en Ciencias Biológicas

Colaborador científico del C.S.I.C.

UNIVERSIDAD DE GRANADA
15 MAYO 1997
COMISION DE DOCTORADO

Esta tesis doctoral ha sido realizada en la
U.E.I. de Microbiología del Suelo y Sistemas
Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidin
(C.S.I.C.) de Granada

A mis padres y
a mis hermanos

A Jose

AGRADECIMIENTOS

A los doctores Eulogio J. Bedmar y J. Sanjuan Por su apoyo, su tesón y los buenos consejos recibidos que han hecho posible la terminación de esta tesis.

A ministerio de Educación y Ciencia por la concesión de una beca que permitió mi dedicación plena a la Elaboración de este trabajo.

Al doctor Don José Olivares por las ideas aportadas.

A la doctora Carmen Lluch por su trabajo como tutora y por llevar adelante todo con el mejor humor.

A Mariangeles Delgado por su ayuda en el trabajo, por su compañía y los ánimos recibidos cuando más se necesitaron. Al resto de compañeros del departamento por el buen ambiente creado y por su amistad Leo, Socorro Mesa, María Jesús, Julio, Jose, Socorro Muñoz, Pieter, María José, Fernando, Sanae, Chan-ai, Ikrám, Inma, Pepe, Pablo, etc. etc y muy especialmente a Jose A. Herrera por aguantar todas mis disquisiciones científicas y filosóficas en este tiempo, y por todas las razones que conocéis, no sólo su apoyo científico sino también personal.

A todos los compañeros que ya no están en el departamento, pero con los que mantuve buenas relaciones, y en especial a Carmina por su buen humor y consejos.

A Javier Gonzalez por su ayuda con los problemillas informáticos.

A los compañeros de tertulia y almuerzo Nuria, Juan, Pepe, Soco, Karim, Julio y Jose por los buenos ratos pasados.

A mis padres, hermanos y a Jose por alentarme en todo momento a continuar con mis estudios e intentar que todo fuese mas fácil. Y a los que dedico este trabajo

INDICE

	Pg
INTRODUCCION	
1. La familia <i>Rhizobiaceae</i>	7
2. La enzima monóxido de carbono (CO) deshidrogenasa	7
2.1. CO deshidrogenasas de microorganismos aerobios: bacterias carboxidotrofas	8
2.2. CO deshidrogenasas de microorganismos anaerobios	
2.2.1. Anaerobios fototrofos	20
2.2. 2. Anaerobios acetogénicos	22
2.2. 3. Anaerobios acetotróficos	25
2.2.4. Productores de metano	26
2.2.5. Reductores de sulfato	28
3. Utilización de compuestos hidroxiaromáticos por <i>B. japonicum</i>	29
OBJETIVOS	31
MATERIAL Y METODOS	
1. Técnicas microbiológicas	
1.1. Cepas bacterianas y plásmidos	35
1.2. Medios de cultivo	
1.2 .1. Medios de cultivo para <i>B. japonicum</i>	37
1.2.2. Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	38
1.3. Conservación de cepas bacterianas	38
1.4. Antibióticos	39
1.5. Utilización de 4-hidroxibenzoato por <i>B. japonicum</i>	39

	Pg
1.6. Inducción de actividad nitrato reductasa en <i>B. japonicum</i>	39
1.7. Crecimiento autotrófico de <i>B. japonicum</i> con monóxido de carbono	40
1.8. Obtención de membranas y citosol de <i>B. japonicum</i>	41
2. Procedimientos analíticos	
2.1. Determinación de proteína	
2.1. 1. Método de Markwell	41
2.1.2. Método de Bradford	42
2.2. Determinación de actividad nitrato reductasa	
2.2.1. Ensayos <i>in vitro</i>	42
2.2.2. Detección de actividad nitrato reductasa en geles de poliacrilamida	43
2.3. Determinación de actividad CO deshidrogenasa	
2.3.1. Ensayos <i>in vitro</i>	
2.3.1.1. Reducción del azul de metileno	44
2.3.1.2. Reducción de cloruro de 2-(4-iodofenil)- 3-(4-nitrofenil)-2H- tetrazolio	44
2.3.1.3. Detección de actividad CO deshidrogenasa en gel de poliacrilamida	45
2.4. Detección de proteína en geles de poliacrilamida	45
3. Técnicas de Biología Molecular	
3.1. Preparación de ADN plasmídico	46
3.2. Preparación de ADN total	47
3.3. Determinación de la concentración de ADN	48
3.4. Digestión total de ADN con endonucleasas de restricción	48

	Pg
3.5. Separación e identificación de fragmentos de restricción mediante electroforesis en gel de agarosa	
3.5.1. Electroforesis de ADN	49
3.5.2. Revelado de geles y fotografía	49
3.5.3. Estimación del tamaño molecular de fragmentos de restricción	49
3.6. Purificación de fragmentos de ADN a partir del gel de agarosa	
3.6.1. Geneclean II [®]	50
3.6.2. Quiaex II [®]	50
3.7. Manipulación de los fragmentos de restricción	
3.7.1. Ligación de fragmentos de restricción en vectores de clonación	51
3.7.2. Relleno de extremos 5' de fragmentos de restricción	51
3.7.3. Eliminación de extremos 3' de fragmentos de restricción	52
3.8. Preparación y transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	52
3.9. Transformación de <i>E. coli</i> mediante electroporación	53
3.10. Experimentos de hibridación ADN-ADN	
3.10.1. Transferencia de ADN a filtros de nylon	53
3.10.2. Marcaje de sondas de ADN	54
3.10.3. Hibridación ADN-ADN con sonda no radiactiva	55
3.10.4. Hibridación en colonias	55
3.11. Preparación de clones de secuenciación	56
3.12. Purificación de ADN para secuenciación	57
3.12.1. Qiaprep Spin Plasmid	58

	Pg
3.12.2. Wizard Minipreps®	58
3.13. Secuenciación de ADN de doble cadena	
3.13.1. Secuenciación manual	59
3.13.1.1. Preparación y marcaje del ADN	59
3.13.1.2. Resolución de compresiones	60
3.13.1.3. Resolución de los oligonucleótidos generados tras las reacciones de secuenciación	60
3.13.1.4. Tratamiento del gel y exposición	60
3.13.2. Secuenciación automática	61
3.14. Análisis informático de secuencias de ADN y proteínas	61
3.15. Mutagénesis dirigida de <i>B. japonicum</i> USDA 110: Selección y caracterización de transconjugantes deficientes en la utilización microaeróbica de nitrato	62
4. Purificación de la enzima CO deshidrogenasa de <i>B. japonicum</i>	
4.1. Crecimiento celular	63
4.2. Obtención de extractos libres de células	63
4.3. Cromatografía de intercambio aniónico	64
4.4. Cromatografía de interacción hidrofóbica	64
4.5. Cromatografía de exclusión molecular	65
5. Caracterización de la enzima CO deshidrogenasa de <i>B. japonicum</i>	
5.1. Tamaño molecular relativo	65
5.2. Espectro de absorción UV-visible	65
5.3. Composición en subunidades	66
5.4. Hibridación con anticuerpos policlonales	66
5.4.1. Transferencia electroforética a membranas de polivilideno	

	Pg
5.4.2. Detección de complejos antígeno-anticuerpo	67
5.6. Contenido en metales	68
5.7. Determinación de cofactores	
5.7.1. Cuantificación de flavinas	68
5.7.2. Cuantificación de pterinas	68
5.8. Análisis parcial de las secuencias de los extremos N-terminal	69

RESULTADOS Y DISCUSION

1. Caracterización de la cepa mutante GRF3 de <i>B. japonicum</i>	
1.1. Clonación del ADN mutado en GRF3	72
1.2. Detección del ADN silvestre correspondiente al ADN mutado en GRF3	72
1.3. Estrategia de subclonación del fragmento <i>Hind</i> III del plásmido pML12	77
1.4. El plásmido pML12 contiene el ADN silvestre mutado en la cepa GRF3	80
1.5. Identificación y caracterización de los genes <i>cox</i> de <i>B. japonicum</i>	
1.5.1. Estudio de <i>coxS</i>	82
1.5.2. Estudio de <i>coxM</i>	84
1.5.3. Estudio de ORF4	87
1.5.4. Estudio de ORF5	88
1.5.5 Estudio de ORF6 y ORF7.	89
1.5.6. Estudio de ORF8	90
1.5.7. Estudio de ORF9	90
1.6. Reproducción de la mutación ocurrida en GRF3.	91
2. Identificación y caracterización de los genes <i>pca</i> de <i>B. japonicum</i>	106

	Pg
2.1. Estudio de <i>pcaB</i>	106
2.2. Estudio de <i>pcaD</i>	107
2.3. Estudio de <i>pcaC</i>	108
3. Purificación de la enzima CO deshidrogenasa de <i>B. japonicum</i>	
3.1. Cultivo autotrófico de <i>B. japonicum</i> con CO	116
3.2. Cultivo heterotrófico de <i>B. japonicum</i> con CO	116
3.2.1. Cromatografía de intercambio aniónico	118
3.2.2 Cromatografía de interacción hidrofóbica	118
3.2.3 Comatografía de exclusión molecular	121
3.3. Caracterización de la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa	
3.3.1. Tamaño molecular relativo	121
3.3.2. Espectro de absorción	121
3.3.2 Composición en subunidades	125
3.3.3 Hibridación con anticuerpos anti-CoxL	125
3.3.4. Contenido en metales	127
3.3.5. Determinación de cofactores	
A. Flavinas	127
B. Pterinas	127
3.3.6. Determinación y detección de actividad CO deshidrogenasa en <i>B. japonicum</i>	127
CONCLUSIONES	130
BIBLIOGRAFIA	133

INTRODUCCION

1. LA FAMILIA RHIZOBIACEAE

Bradyrhizobium japonicum, junto con otras especies de los géneros *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Agrobacterium* y *Phyllobacterium*, constituyen la familia *Rhizobiaceae* de la subdivisión α de las Proteobacterias (Young et al. 1992; Elkan y Bunn, 1992). En todos los casos, se trata de bacterias aerobias, Gram negativas, móviles por un flagelo polar o subpolar o bien mediante flagelos peritricos en número de dos a seis.

El género *Agrobacterium*, excepto *A. radiobacter*, incluye especies fitopatógenas que producen tumores en los tallos y raíces de diversas plantas. Todos los demás miembros de la familia *Rhizobiaceae* se caracterizan por su capacidad para establecer asociaciones mutualistas fijadoras de dinitrógeno atmosférico (N_2) con plantas leguminosas. Mientras que las especies de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Sinorhizobium* producen nódulos en las raíces de sus leguminosas hospedadoras, las de *Azorhizobium* forman nódulos tanto en las raíces como en los tallos de *Sesbania rostrata*, y las del género *Phyllobacterium* originan nódulos en las hojas de las plantas de las familias *Myrsinaceae* y *Rubiaceae*. La capacidad de estas bacterias para reducir N_2 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.

1. MONOXIDO DE CARBONO DESHIDROGENASAS

Las enzimas monóxido de carbono (CO) deshidrogenasas son clave en el metabolismo de diversos microorganismos, tanto aerobios como anaerobios, de los dominios *Bacteria* y *Archaea*. La función de estas enzimas es:

1. Oxidar CO, como ocurre en las bacterias carboxidotrofas y en las fototrofas anerobias de los géneros *Rhodocyclus* y *Rhodopseudomonas*.

2. Sintetizar acetil-CoA, como es el caso de los microorganismos anaerobios acetogénicos.

3. Producir grupos metilo y carbonilo a partir de acetil-CoA, propio de las arqueobacterias *Methanotrix* y *Methanosarcina*, así como de algunas bacterias reductoras de sulfato, y

4. Oxidar compuestos aromáticos e hidrocarburos saturados, típico de determinadas especies de microorganismos reductores de sulfato.

Las CO deshidrogenasas aparecieron muy pronto en el proceso evolutivo, incluso antes de la diversificación de los microorganismos en los dominios Bacteria y Archaea (Kandler, 1993). De hecho, se ha propuesto que el primer mecanismo celular de conservación de la energía podría haber sido la oxidación de H_2S y FeS_2 , donde los 2H^+ producidos podrían acoplarse a la reducción de CO_2 por una CO deshidrogenasa, de manera que el gradiente de protones generado se emplearía en la síntesis de ATP (Koch y Schmidt, 1991).

Las enzimas CO deshidrogenasas se dividen en dos grupos: las que contienen molibdeno, hierro, azufre y FAD en su molécula, propias de microorganismos aerobios, y aquellas que contienen hierro y níquel que son características de microorganismos anaerobios (Ferry, 1995). Estas últimas son una de las cuatro enzimas conocidas en la naturaleza que contienen Ni en su molécula, tales como la hidrogenasa, la metil-coenzima M metilreductasa y la ureasa.

2. CO DESHIDROGENASAS DE MICROORGANISMOS AEROBIOS

2.1. Bacterias carboxidotrofas

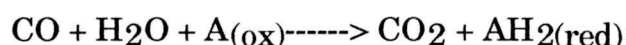
La principal fuente biológica de monóxido de carbono atmosférico la constituye la producción de metano (CH_4) que resulta del catabolismo anaerobio de los substratos orgánicos. Entre el 1% y el 1.5% del carbono que se encuentra en la atmósfera como CO_2 lo hace primero como metano, que se convierte, via CO, en CO_2 por radicales OH^- . Sin embargo, la mayoría de las 27×10^8 toneladas de CO que se originan en la Tierra cada año, procede de las actividades humanas (Khalil y Rasmussen, 1984), lo que perturba los niveles naturales de CO. Las enzimas microbianas monóxido de carbono deshidrogenasas son esenciales para mantener los niveles naturales de CO bien mediante la oxidación del mismo a CO_2 o mediante su incorporación en forma de otros compuestos carbonados y productos metabólicos finales (Conrad y Seiler, 1980). De aquí, que la utilización microbiana del CO sea de gran interés tanto por lo que supone su participación en el ciclo global del carbono en la biosfera como de modulación de la concentración del CO atmosférico en respuesta a las actividades humanas.

Las bacterias carboxidotrofas son microorganismos quimiolitotrofos aerobios que utilizan el monóxido de carbono como única fuente de carbono y energía. Hasta la fecha, se han descrito 16 especies agrupadas en 8 géneros

(Meyer et al. 1986, Ferry, 1995): *Pseudomonas carboxydovorans*, *P. carboxydohydrogena*, *P. carboxydoflava*, *P. compransoris*, *P. gazotropha*, *P. thermocarboxydovorans*, *Alcaligenes carboxydus*, *Arthrobater* sp., *Bacillus schlegelii*, *Bacillus* sp. cepa OMT2, *Azotobacter* sp., *Azomonas* sp., *Streptomyces thermoautotrophicus*, *Streptomyces* G-26, *Acinetobacter* sp., *Acinetobacter* sp. 1-1 y *Acinetobacter* sp. 2.

La especie *Pseudomonas carboxydovorans* se ha sustituido por la nueva especie *Oligotropha carboxydovorans* (Meyer et al. 1993a), por lo que se utilizará esta última denominación a lo largo de este trabajo.

La capacidad de las bacterias carboxidotrofas para utilizar CO se debe a una enzima monóxido de carbono deshidrogenasa (EC 1.2.2.4) que cataliza la reacción:

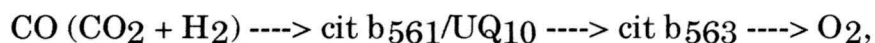


donde A es un aceptor de electrones (Meyer y Schlegel, 1977; 1979; 1980; Cypionka et al. 1980; Kim y Hageman, 1981; 1983; Meyer, 1982; Bell et al. 1985; Futo y Meyer, 1986). No obstante la presencia de monóxido de carbono deshidrogenasa en las bacterias carboxidotrofas, que son aerobias estrictas, el oxígeno no se requiere para la reacción catalizada por la enzima, sino que ésta utiliza agua como oxidante (Meyer y Schlegel, 1977; 1979; 1980, Meyer, 1982). Aunque *O. carboxydovorans* expresa actividad hidrogenasa (formación de H₂) cuando crece a expensas de CO, la hidrogenasa no está implicada en la oxidación del CO, y el hidrógeno no es intermediario ni sustrato de ninguna CO deshidrogenasa purificada hasta la fecha (Meyer y Schlegel, 1978; 1980; Meyer, 1982). Conviene indicar aquí que aunque la mayoría de las bacterias carboxidotrofas son también capaces de crecer con CO₂ e H₂ como única fuente de carbono y energía, respectivamente, el H₂ no es un intermediario fisiológico importante durante el crecimiento con CO (Ferry, 1995).

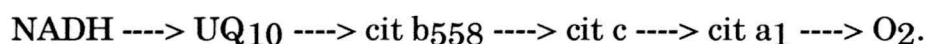
La función fisiológica de la enzima CO deshidrogenasa es proporcionar CO₂ que, utilizado como sustrato por la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa, se asimilará posteriormente via ciclo de las pentosas fosfato (Meyer y Schlegel, 1979; 1983).

El metabolismo de las bacterias carboxidotrofas es estrictamente respiratorio (Zavarzin y Nozhevnikova, 1977; Nozhevnikova y Yurganov, 1978; Meyer y Schlegel, 1978; 1979; 1980; Cypionka y Meyer, 1982). Estas bacterias contienen un sistema transportador de electrones compuesto por citocromos de tipo b, c y a (Meyer y Schlegel, 1978; Kim y Hageman, 1981; Cypionka y

Meyer, 1983). En contraste con la mayoría de las bacterias aerobias, el metabolismo de los microorganismos carboxidotrofos, con la excepción de *P. compransoris* y *A. carboxydus*, no se afecta por concentraciones de hasta el 90% de CO (Cypionka y Meyer, 1983). En las bacterias carboxidotrofas, además de un citocromo a₁ que actúa como oxidasa terminal sensible al CO, existe otra oxidasa terminal, citocromo b₅₆₃, que es insensible al CO. En *O. carboxydovorans*, los electrones procedentes de sustratos litotrofos, tales como el CO o CO₂ + H₂, se transfieren via rama insensible al CO (Cypionka y Meyer, 1983; Cypionka et al. 1985):



mientras que los procedentes de la oxidación de los nucleótidos reducidos (NADH) procedentes del metabolismo intracelular tienen preferencia por la rama sensible al CO:



Otros autores (Kim y Hegeman, 1981, 1983), por el contrario, han observado en *P. carboxydohydrogena* que la ramificación de la cadena respiratoria insensible al CO no ocurre a nivel de UQ₁₀, sino a nivel del citocromo c. Aunque se considera que el aceptor fisiológico de electrones de la CO deshidrogenasa es el citocromo b₅₆₃ (Jacobitz y Meyer, 1989), la UQ₁₀ también se reduce por la CO deshidrogenasa de *P. carboxydohydrogena* (Kim y Hegeman, 1981).

La cadena electrónica insensible al CO está presente tanto en células crecidas en presencia de CO como cuando se emplean sustratos orgánicos, por lo que puede considerarse que es de tipo constitutivo, e indica la capacidad de estas bacterias para crecer tanto en condiciones de quimiolitotrofia como de quimioheterotrofia. En *O. carboxydovorans*, el potencial medio de oxidoreducción (E₀') del citocromo b₅₆₃ es de -100 mV (Cypionka et al. 1984) y su K_m por el O₂, calculada en extractos celulares, es de 0.7 mM (Cypionka et al. 1985). Ambos factores, bajo E₀' y elevada afinidad por el O₂, hacen que el citocromo b₅₆₃ se encuentre en estado oxidado permanente. Dado que el CO se une sólo a citocromos en estado reducido, se considera que la insensibilidad de las bacterias carboxidotrofas al CO no se debe a la presencia en sí de la enzima CO deshidrogenasa, sino a la incapacidad del citocromo b₅₆₃ para unirse al

CO. El citocromo b563 es una proteína integral de membrana de peso molecular 55 kDa que forma un complejo de relación molar 2:1 con la CO deshidrogenasa (Jacobitz, 1989; Meyer et al. 1990, 1993b).

El tiempo de generación (t_g) de *O. carboxydovorans* en presencia de CO es de 20 horas, tiempo muy elevado si se compara con el t_g de estas bacterias cuando crecen en presencia de sustratos orgánicos (t_g en piruvato, malato, acetato o succinato es de 8 horas) (Meyer y Schlegel, 1978). Esto se explica teniendo en cuenta que en presencia de CO, la rama sensible al CO se bloquea, de manera que todos los electrones se canalizan por la rama insensible al CO, en donde se pierde un sitio de producción de ATP (Meyer y Schlegel, 1978). El CO, sin embargo, no afecta el crecimiento de *O. carboxydovorans* en presencia de sustratos orgánicos (Meyer y Schlegel, 1978).

Aunque el potencial medio de oxidoreducción (E_0') del par CO/CO₂ es de -540 mV (Meyer y Schlegel, 1983), sólo los aceptores artificiales de electrones con valores de E_0' iguales a cero o ligeramente positivos (ver Tabla I) se reducen por la CO deshidrogenasa de *O. carboxydovorans* (Meyer y Schlegel, 1979, 1980; Meyer, 1980) y de otras bacterias carboxidotrofas (Cypionka et al. 1980). Los aceptores fisiológicos de electrones de potencial redox negativo tales como el NAD, NADP, FAD o FMN no se reducen por las CO deshidrogenasas.

Sólo los aceptores de electrones de E_0' entre -34 y +217 mV se pueden reducir por las CO deshidrogenasas de las bacterias carboxidotrofas (Tabla 1), mientras que tales enzimas no pueden reducir los derivados del viológeno u otros aceptores de E_0' más negativo. Como una excepción a esta regla, la enzima parcialmente purificada de *Streptomyces* G26 expresó actividad considerable con metil y benzil-viológeno (Bell et al. 1985).

Aunque se ha demostrado la presencia de ubiquinonas 8 y 10 y menaquinonas en *O. carboxydovorans* (Meyer y Schlegel, 1983; Krüger y Meyer, 1984), su reducción no se lleva a cabo por CO deshidrogenasa purificada ni por extractos crudos de dicha bacteria (Meyer y Schlegel, 1979; 1980; 1986). Tampoco se ha observado la reducción de ubiquinona 10 en extractos de *Acinetobacter* sp.1 (Kim y Cho, 1986). En las bacterias carboxidotrofas parece, por tanto, que el citocromo b563 es el aceptor fisiológico de la CO deshidrogenasa.

Tabla I. Aceptores de electrones que puede reducir la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa de *O. carboxydovorans* (Meyer y Schlegel (1979).

Aceptor	E_0' (mV)	% de actividad (respecto al azul de metileno)
CO	- 540	0
Metil viológeno	- 440	0
Benzil viológeno	- 359	0
Rojo neutro	- 320	0
NADP ⁺ , NAD ⁺	- 320	0
FAD ⁺ , FMN ⁺	- 219	0
Riboflavina	- 298	0
Sulfonato Indigo	- 111	0
Vitamina K ₁	- 50	3
Vitamina K ₂	- 44	7
Piocianina	- 34	83
Azul de metileno	+ 11	100*
Tionina	+ 70	30
Fenazina metosulfato	+ 80	70
Azul de toluidina	+ 110	88
Diclorofenolindofenol	+ 217	20
Citocromo c	+ 245	0
Ferricianuro	+ 429	0
Oxígeno	+ 816	0

*La actividad monóxido de carbono deshidrogenasa con azul de metileno como aceptor de electrones fue de 124 nmol CO oxidado/(mg proteína) x min. otros autores (Kim y Hegeman, 1981a; 1981b; 1983; Hegeman, 1984) han observado reducción de la ubiquinona 10 tanto por extractos crudos como por enzima purificada de *P. carboxydohydrogena*, por lo proponen que la misma podría actuar como aceptor fisiológico de electrones de la CO deshidrogenasa.

Como se ha indicado anteriormente, si bien el potencial medio de oxidoreducción (E_0') del par CO/CO₂ es de -540 mV y, por tanto, suficientemente negativo para permitir la reducción directa del NAD (E_0' NAD/NADH = - 320 mV), tanto los extractos crudos como las CO

deshidrogenasas purificadas son incapaces de reducir NAD o NADP (Meyer y Schlegel, 1979; 1980; Cypionka et al.; 1980; Kim y Hegeman, 1981b; Bell et al. 1985; Meyer y Fiebig, 1985; Kim y Cho, 1986). Del rango de aceptores de electrones que emplea la CO deshidrogenasa de *O. carboxydovorans*, se pudo deducir que los electrones entran en el sistema transportador de electrones a un E_0' alrededor de 0 mV o ligeramente positivo (Meyer y Schlegel, 1979), lo que excluye la posibilidad de una reducción directa del NAD(P). Por otra parte, las bacterias carboxidotrofas requieren piridín nucleótidos reducidos para la asimilación del CO₂, por lo que tienen la necesidad de sobrepasar una barrera de aproximadamente 300 mV para conseguir la reducción de tales piridín nucleótidos. Los estudios realizados por Jacobitz y Meyer (1986) demostraron que la formación de NAD(P)H requiere una fuerza motora de protones. Esta fuerza se genera mediante el potencial electroquímico de membrana que se origina durante la oxidación del CO acoplado al transporte de electrones a través de la cadena respiratoria. Los electrones se utilizan, en parte, para la síntesis de ATP y, en parte, mediante su transporte inverso, para llevar a cabo la reducción de NAD(P). En el citado transporte inverso parecen estar implicados la ubiquinona 10 y la región de citocromos b, así como la enzima NADH deshidrogenasa que debe funcionar en sentido inverso, catalizando la reducción del NAD.

La enzima CO deshidrogenasa se ha aislado y purificado de diversas bacterias carboxidotrofas (Tabla II). Aunque en un principio se indicó que era una enzima soluble (Meyer y Schlegel, 1979; 1980; Cypionka et al. 1980; Kim y Hegeman, 1981a; 1983), esta localización citoplasmática no concordaba con la función de la enzima de proporcionar electrones a la cadena respiratoria insensible al CO para la generación de ATP mediante fosforilación oxidativa. Posteriores estudios, basados en técnicas inmunocitoquímicas, permitieron demostrar, en células de *O. carboxydovorans* crecidas en presencia de CO, que la localización de la enzima depende de la fase de crecimiento, pudiendo encontrarse en forma soluble o asociada a las membranas citoplasmáticas. Durante la fase de crecimiento exponencial, la mayor parte (87%) de la enzima se encuentra asociada a las membranas, mientras que en fase estacionaria se localiza al 50% entre la fracciones soluble y de membrana (Meyer y Rohde, 1984; Rohde et al. 1984; 1985). La base de este proceso de asociación-disociación de la enzima de las membranas citoplasmáticas no se conoce con exactitud. La CO deshidrogenasa de *O. carboxydovorans* puede liberarse mediante tratamiento con detergentes de tipo zwitteriónicos, como el CHAPS, o

detergentes no iónicos, como la b-dodecil-maltosida (Jacobitz, 1989). Mediante el empleo de estos detergentes se ha conseguido la liberación del complejo enzimático de las membranas citoplasmáticas y su posterior incorporación y recuperación de actividad a las mismas (Jacobitz y Meyer, 1989).

El tamaño molecular relativo (M_r) de la enzima puede variar dependiendo de los métodos empleados para su determinación. En *O. carboxydovorans* puede oscilar entre 230 kDa (centrifugación en gradiente de densidad) y 300 kDa (filtración a través de Sephadex G-150) (Meyer et al. 1986). Las CO deshidrogenasas de diferentes microorganismos carboxidotrofos están compuestas de tres subunidades de 70-88 kDa (subunidad L), 25-34 kDa (subunidad M) y 14-21 kDa (subunidad S), dispuestas en configuración $L_2M_2S_2$ (Tabla II) (Meyer et al. 1986). Sobre la base de un M_r de 400.000, una configuración de tipo $L_3M_3S_3$ se ha sugerido para la enzima de *P. carboxydohydrogena* (Kim y Hegeman, 1981b), aunque Meyer et al (1993b) han indicado que la configuración es de tipo $L_2M_2S_2$ con un M_r de 274 kDa.

Tabla II. Propiedades representativas de algunas enzimas monóxido de carbono deshidrogenasa purificadas.

Especie	M_r (kDa)	Composición subunidades	K_m (mm)
CO)			
<i>O. carboxidovorans</i>	274	(86:34:17) ₂	53
<i>P. carboxydohydrogena</i>	254	(85:28:14) ₂	63
<i>P. carboxydoflava</i>	240	(70:33:17) ₂	-
<i>P. thermocarboxydovorans</i>	230-310	(87:29:21) ₂	0.5
<i>B. schlegelii</i>	230	-	-
<i>S. thermoautotrophicus</i>	268	(87:30:17) ₂	0.35

La enzima de *O. carboxydovorans*, la mejor caracterizada entre las de las bacterias carboxidotrofas, es, como ya se ha indicado, una proteína integral de membrana (Rohde et al. 1984), compuesta por tres subunidades L (86 kDa), M (34 kDa) y S (17 kDa) dispuestas en configuración $L_2M_2S_2$ (Meyer y Rohde, 1984). La enzima contiene cofactor de molibdeno (MoCo) cuya parte orgánica está formada por bactofterina unida a un residuo aromático fosforilado (Meyer

y Schlegel, 1983; Meyer y Rajagopalan, 1984; Krüger y Meyer, 1986, Meyer et al. 1986; 1990; 1993b), complejo que se ha identificado como un dinucleótido de citosina y molibdopterina, (MCD, Johnson et al. 1990). La función del MoCo no sólo es quelar el molibdeno e integrarlo en la enzima, sino que, a semejanza de otras molibdoenzimas, representa el sitio de unión al sustrato (Meyer, 1986, Ferry, 1995). La presencia de MCD se ha establecido no sólo en *O. carboxydovorans*, sino también en las especies carboxidotrofas del género *Pseudomonas* (Bell et al. 1985; Meyer et al. 1986), así como en *B. schlegelii* (Krüger y Meyer, 1984) y *S. thermoautotrophicus* (Meyer et al. 1993b).

Las enzimas CO deshidrogenasas purificadas (Tabla II) contienen (por molécula de enzima): 2 Mo, 2 MCD, 2 FAD unidos a la enzima de forma no covalente, 8 Fe y 8 S, estos últimos agrupados en centros [2Fe-2S] de tipo I y II (Meyer, 1982; 1985; Bray et al. 1983; Meyer y Fiebig, 1985; Meyer et al. 1986; 1993b; Schübel et al. 1995). La localización de los centros redox activos entre las subunidades y la función específica de cada centro no se conoce por el momento.

Las enzimas CO deshidrogenasas purificadas de diferentes bacterias carboxidotrofas (Tabla II) son muy homólogas entre ellas. En todos los casos estudiados se trata de óxido reductasas que presentan actividad, tamaño molecular, composición en subunidades, contenido en metales, afinidad por el CO, aceptores de electrones, etc. muy similares, si no idénticos, (Meyer y Fiebig, 1985; Meyer et al. 1986, 1993b). El empleo de anticuerpos específicos obtenidos contra la CO deshidrogenasa de *P. carboxydohydrogena* (Kim et al. 1982) y de *O. carboxydovorans* (Meyer y Rohde, 1984; Rohde et al. 1984) demostró, mediante ensayos de reacción cruzada, una similitud en aminoácidos cercana al 70% entre las diversas CO deshidrogenasas empleadas (Kim et al. 1982; 1986; Hegeman, 1984; Park y Hegeman, 1984, Meyer y Rohde, 1984; Rohde et al. 1984; Kim y Lee, 1986). Excepciones a esta regla pueden considerarse la CO deshidrogenasa de *P. compransoris* (Meyer y Rohde, 1984) y *Acinetobacter* sp. (Cho et al. 1985), que no mostraron reacción cruzada con los anticuerpos utilizados.

La actividad CO deshidrogenasa de algunas preparaciones purificadas de esta enzima se activan específicamente cuando las células se incuban en presencia de selenio. En tales condiciones, la enzima purificada contiene covalentemente unidas 2 moléculas de selenio por molécula de enzima. El selenio se une a los átomos de azufre de los restos de cisteína formado trisulfuro de selenio (Cisteína-S-Se-S-Cisteína). Sin embargo, hasta la fecha no

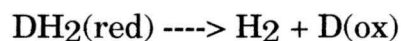
se ha demostrado que el selenio forme parte de la enzima en condiciones fisiológicas, ni que sea imprescindible para el crecimiento de las bacterias carboxidotrofas en presencia de CO (Meyer y Rajagopalan, 1984b).

Cuando *O. carboxydovorans* crece en condiciones autotróficas con CO como única fuente de carbono y energía, se ha demostrado, tanto en células intactas como en extractos libres de células, que la enzima CO deshidrogenasa, además de la capacidad de oxidar CO, también tiene actividad hidrogenasa, esto es, la capacidad de oxidar hidrógeno, catalizando la reacción:

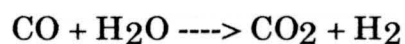


Esta actividad, calculada en distintas preparaciones, representa el 10-16% de la actividad CO deshidrogenasa de la enzima. La actividad hidrogenasa de la enzima CO deshidrogenasa no permite, sin embargo, el crecimiento de *O. carboxydovorans* en presencia de CO (Santiago y Meyer, 1991; Meyer et al. 1993b). Que la enzima CO deshidrogenasa es capaz de oxidar H₂ explica, por otra parte, por qué *A. carboxydus*, que no crece con H₂, tiene, sin embargo, actividad hidrogenasa (Meyer y Schlegel, 1983).

Se ha demostrado también, en células intactas y en extractos libres de células, que la CO deshidrogenasa de *O. carboxydovorans* expresa actividad formadora de hidrógeno, catalizando la reacción:



La capacidad de producir hidrógeno representa el 0.4% de la actividad CO deshidrogenasa de la enzima, siendo el metil viológeno el donador de electrones más efectivo (Santiago y Meyer, 1991; Meyer et al. 1993b). Recientemente, se ha demostrado en preparaciones purificadas de CO deshidrogenasa de *O. carboxydovorans* que la formación de hidrógeno por estas bacterias ocurre sólo en la fase postexponencial del período de crecimiento y que el H₂ producido es el resultado de la oxidación de CO catalizada por la enzima CO deshidrogenasa, de acuerdo a la siguiente reacción (Santiago y Meyer, 1996):



Estos mismos autores (Santiago y Meyer, 1996) comprobaron en preparaciones purificadas de CO deshidrogenasa que la enzima, además de su

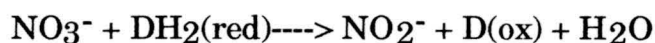
función catabólica de oxidar CO a CO₂, es capaz de llevar a cabo tanto la formación como la oxidación de hidrógeno.

Las células de *O. carboxydovorans* cuando crecen con CO₂ e H₂ contienen un sistema hidrogenasa independiente, capaz de catalizar la reducción de protones a hidrógeno:



Esta enzima hidrogenasa es una proteína integral de membrana que se ha aislado y purificado (Santiago y Meyer, 1992). Se trata de un heterodímero formado por dos subunidades de 67 y 30 kDa y que contiene Fe, S y Ni. Los extremos N-terminal de las dos subunidades de la hidrogenasa se han secuenciado, comprobándose que su composición en aminoácidos es similar a los de las hidrogenasas de *B. japonicum*, *R. leguminosarum*, *Azotobacter vinelandii*, *Rhodocyclus gelatinosus* y *Alcaligenes eutrophus* (Meyer et al. 1993b). Los electrones formados durante la reacción de esta hidrogenasa pueden entrar en la cadena respiratoria proporcionando ATP (Jacobitz et al. 1989; Jacobitz y Meyer, 1989; Meyer et al. 1990). Dicha hidrogenasa no está presente en células de *O. carboxydovorans* cuando se cultiva en condiciones de crecimiento autolitotrófico con CO (Santiago y Meyer, 1996), por lo que el hidrógeno producido por la actividad formadora de hidrógeno de la CO deshidrogenasa parece cumplir la función de detoxificar el exceso de protones producidos, previniéndose así un posible daño celular (Santiago y Meyer, 1996).

La enzima CO deshidrogenasa purificada de *P. carboxydoflava* y de *S. thermoautotrophicus* expresan actividad nitrato reductasa (Meyer et al. 1993b):



Empleando metil-viológeno y bencil-viológeno como donadores de electrones se ha calculado que la actividad nitrato reductasa representa el 2.5%-5%% de la actividad CO deshidrogenasa (Meyer et al. 1993b). Otras enzimas que contienen molibdeno en su centro activo, tales como la xantina deshidrogenasa de mamíferos o la xantina deshidrogenasa de hígado de pollo, también expresan, aunque valores muy bajos, actividad nitrato reductasa (Ketchum et al. 1970). Que el centro de molibdeno de la CO deshidrogenasa está funcionalmente implicado en la reducción de nitrato se ha deducido por la

susceptibilidad de la reacción a la inhibición por cianuro y metanol, compuestos que inhiben la actividad CO deshidrogenasa con CO como donador de electrones (Meyer et al. 1993b).

Aunque se ha indicado que el metabolismo de las bacterias carboxidotrofas es estrictamente aerobio (Meyer y Schlegel, 1983; Meyer et al. 1986; Meyer, 1989), algunas de ellas tienen la capacidad de crecer usando óxidos de nitrógeno como aceptores de electrones. Esta habilidad está muy restringida, habiéndose demostrado sólo en *P. carboxyhydrogena* cuando se cultiva anaeróbicamente con H₂ y CO₂ como fuente de electrones y de carbono, respectivamente, y nitrato como aceptor de electrones (Frunzke y Meyer, 1990). Hasta la fecha, no se ha demostrado la existencia de respiración del nitrato ni de desnitrificación en presencia de CO en condiciones de quimiolitotrofia. Empleando CO o H₂ como donadores de electrones, algunas bacterias carboxidotrofas, tales como *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *P. gazotropha*, *P. carboxyhydrogena* y *P. carboxydovorans* OM3, son capaces de reducir nitrato a nitrito, aunque este proceso no es capaz de permitir el crecimiento de las bacterias en tales condiciones, acumulándose el nitrito en el medio (Frunzke y Meyer, 1990; Meyer et al. 1990). En suspensiones de *P. carboxydoflava* crecidas heterotróficamente con nitrato se ha demostrado la formación de nitrito y N₂. La adición de 50 % (v/v) de CO a este tipo de cultivos, incrementó el tiempo de generación de 11 a 28 horas, aunque no tuvo efecto sobre el rendimiento celular (Meyer et al. 1990). El CO tampoco afectó las actividades nitrato y nitrito reductasa de otras bacterias carboxidotrofas, aunque sí actuó como inhibidor de la óxido nítrico reductasa. Consecuentemente, en condiciones de desnitrificación heterotrófica, la presencia de CO ocasionó la acumulación de N₂O en cultivos de *P. carboxydoflava*, *P. stutzeri* y *Paracoccus denitrificans* (Meyer et al. 1990).

Los genes que codifican las proteínas estructurales de la enzima CO deshidrogenasa pueden encontrarse tanto en plásmidos como en el cromosoma. En las especies y cepas descritas como bacterias carboxidotrofas es frecuente la presencia de plásmidos (Gerstenberg et al. 1982; Park et al. 1984; Kwon y Kim, 1985; Kraut y Meyer, 1988) y, en todos los casos analizados, siempre que estas bacterias contienen plásmidos, los genes responsables de la síntesis de CO deshidrogenasa se han localizado en ellos. Por tanto, se considera generalizado que en las bacterias carboxidotrofas que contienen plásmidos, tales genes son de localización extracromosómica (Kraut et al. 1989; Black et al.; 1990; Meyer et al. 1990; Hugendiek y Meyer, 1992).

El empleo de sondas heterólogas de ADN que codifican la síntesis de otras enzimas clave para el crecimiento quimiolitotrófico, tales como la ribulosa bifosfato carboxilasa, fosforibulosa quinasa e hidrogenasa de membrana ha permitido demostrar la existencia de tales genes en las bacterias carboxidotrofas analizadas (Meyer et al. 1986). En *O. carboxydovorans* OM5 se ha demostrado que tanto los genes que codifican la enzima CO deshidrogenasa, como los genes responsables de la síntesis de ribulosa bifosfato carboxilasa, fosforibulosa quinasa e hidrogenasa de membrana se localizan en el plásmido pHGC3 (Kraut y Meyer, 1988; Hugendiek y Meyer, 1992).

Como se ha indicado anteriormente la CO deshidrogenasa de *O. carboxydovorans* se ha purificado y se ha determinado la secuencia de aminoácidos de los extremos N-terminal de las subunidades M, L y S (Kraut et al. 1989; Hugendiek y Meyer, 1992; Meyer et al. 1993b). Utilizando como sondas oligonucleótidos degenerados construidos a partir de la secuencia de aminoácidos MAKAAHI de la subunidad S, y de la secuencia FDYHRI de la subunidad M, se ha podido determinar la secuencia de ADN cromosómico que codifica las subunidades L, M y S de la enzima CO deshidrogenasa de *P. thermocarboxydovorans*. Dicha secuencia se encontró en un fragmento de 4.7 kb y los genes correspondientes se designaron *cutA*, *cutB* y *cutC*, estando, probablemente, agrupados en un operón y en el orden transcripcional (Pearson et al. 1994).:

cutB ----> *cutC* ----> *cutA* ----> *orf4*

Siguiendo la misma metodología se ha llevado a cabo la caracterización molecular de los genes estructurales de la CO deshidrogenasa de *O. carboxydovorans*. A tales genes se les denominó genes *cox* y su correspondiente secuencia de nucleótidos, localizada en el plásmido pHGC3, incluía cuatro ORFs dispuestos en un operón y organizados en el orden transcripcional (Schübel et al. 1995):

coxM ----> *coxS* ----> *coxL* ----> *orf4*

Del análisis de la secuencia de nucleótidos se pudo concluir que tanto CoxL como CutA contienen la secuencia descrita como sitio de unión para el dinucleótido de molibdopterina y citosina del cofactor de molibdeno (MoCo). Cox L contiene además el sitio de unión para el FAD, secuencia que en el caso de *P. thermocarboxydovorans* se encontró en CutB. En CoxS y CutC se localizaron las secuencias consenso de unión de los centros [2Fe-2S] de los tipo I y II. CoxM carece, por el momento de secuencia típicas conocidas (Pearson et

al. 1994; Schübel et al. 1995). La función de Orf4, en ambos microorganismos carboxidotrofos, no se conoce con exactitud, aunque podría actuar como un represor de la actividad CO deshidrogenasa. De hecho, la delección de orf4 incrementa la actividad de la enzima (O. Meyer, comunicación personal).

Las secuencias aminoacídicas de las subunidades CoxL, CoxM y CoxS de la CO deshidrogenasa de *O. carboxydovorans* muestran porcentajes de homología muy elevados con las de otras hidroxilasas que contienen molibdeno en su molécula. Así, CoxL, CoxM y CoxS son un 61% (26%), 68% (21%) y 76% (35%) similares (idénticas), respectivamente, a las secuencias de aminoácidos que componen la xantina deshidrogenasa de *Drosophila melanogaster*, *D. pseudoobscura* y *Calliphora vicina*. Igualmente, Cox L, M y S, y sus equivalentes en la nicotina deshidrogenasa de *Arthrobacter nicotinovorans*, presentan similitudes de un 71% (33% identidad), 74% (32% identidad) y 74% (41% de identidad), respectivamente. La aldehído óxido reductasa de *Desulfovibrio gigas* carece de subunidad M, pero las secuencias de sus subunidades L y S son 74% similar (41% idénticas) y 64% similar (28% idénticas) a las subunidades CoxS y CoxL de *O. carboxydovorans* (Schübel et al. 1995). Dado, por una parte, que las subunidades L, M y S están presentes en todas las molibdeno-hidroxilasas examinadas (excepto la subunidad M que no está presente en la aldehído oxidoreductasa) y, por otra, la homología en la composición de aminoácidos de tales enzimas, se ha propuesto una estructura común para estas proteínas (Schübel et al. 1995). Estos autores, además, basándose en que *coxM* se inserta entre las secuencias de ADN responsables de la síntesis de las subunidades S y L de la xantina deshidrogenasa, mientras que *coxM* precede a *coxS* y a *coxL* en la CO deshidrogenasa y en la nicotina deshidrogenasa, sugieren que los genes o las secuencias nucleotídicas de las molibdeno-hidroxilasas se disponen en el orden transcripcional:

(5'')(M) ----> S ----> (M) ---->L (3')

3. CO DESHIDROGENASAS DE MICROORGANISMOS ANAEROBIOS

3.1. ANAEROBIOS FOTOTROFOS

Rhodocyclus gelatinosus y *Rhodospirillum rubrum* son bacterias fototrofas que crecen anaeróbicamente en la oscuridad con CO como única

fuente de carbono y energía (Uffen 1976; 1981). Estos microorganismos metabolizan CO de acuerdo con la reacción:



El CO₂ se asimila via ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa (Uffen, 1983). La enzima CO deshidrogenasa que cataliza esta reacción está asociada a la membrana citoplasmática (Wakim y Uffen, 1983; Ensign y Ludden, 1991). Se trata de un monómero de M_r 61.800 que contiene Ni, Fe, S y Zn (Bonam y Ludden, 1987; Bonam et al. 1984). La enzima se purifica asociada a una sulfoferro proteína de 22 kDa cuya función parece ser la de transferir electrones, probablemente a través de otros intermediarios desconocidos hasta la fecha, a una hidrogenasa de membrana (Ensign y Ludden, 1991). *R. gelatinosus* produce ATP durante la oxidación de CO a H₂ (Champine y Uffen, 1987). Aunque se supone que la síntesis de ATP se debe a la fosforilación de ADP acoplada al gradiente electroquímico de protones a través de la membrana citoplasmática, el mecanismo de formación de dicho gradiente es desconocido (Ferry, 1995).

La síntesis de CO deshidrogenasa está regulada por la luz y el CO. En *R. rubrum*, ambas enzimas, la CO deshidrogenasa y la hidrogenasa de membrana insensible al CO, se inducen cuando las células se exponen al CO. A diferencia de la CO deshidrogenasa de los microorganismos carboxidotrofos, el O₂ no solo inactiva la CO deshidrogenasa y la hidrogenasa de los fototrofos anaerobios, sino que también inhibe la síntesis de CO deshidrogenasa (Bonam et al. 1989).

La regulación de la CO deshidrogenasa es más compleja en *R. gelatinosus*, ya que este microorganismo es capaz de crecer en presencia de CO y de luz, ajustando su capacidad de oxidar CO con la de producción de bacterioclorofila, dependiendo de las concentraciones relativas de CO y de intensidad luminosa (Champine y Uffen, 1987). Cuando la concentración de CO disminuye y las células dependen de su capacidad fotosintética para crecer, ocurre una respuesta de crecimiento diáuxico, posiblemente regulada intracelularmente por los niveles de AMP cíclico (Murray y Uffen, 1988).

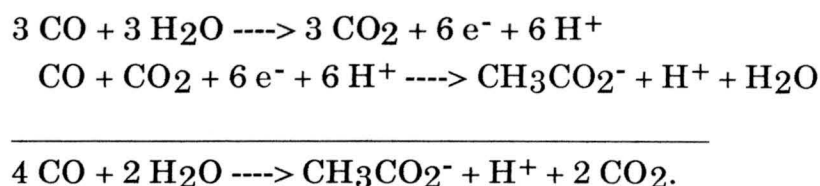
Aunque no se ha descrito una demostración definitiva de que el CO se une al Ni durante la catálisis de la CO deshidrogenasa, una serie de evidencias indican la intervención del Ni en el proceso de oxidación del CO. Así, el cianuro, que es capaz de unirse a los metales de transición, y la dimetilgloxima, un agente quelante del Ni, inactivan la enzima (Bonam et al. 1988).

La inhibición por cianuro se puede revertir por la presencia de CO, lo que indica que el cianuro y el CO se unen al mismo sitio activo. Aunque el CO acelera la disociación del cianuro, el CO puede unirse a un enzima que contiene cianuro en su sitio activo (Hyman et al. 1989). En células crecidas fotosintéticamente sin Ni en el medio de crecimiento, se puede aislar una forma inactiva de la enzima cuya actividad puede restaurarse después de la incubación de la apoenzima con NiCl₂. La incorporación del Ni no requiere ninguna proteína u otros compuestos solubles, pero es necesaria la presencia de un reductor de electrones de bajo potencial, como puede ser un centro de tipo Fe₄S₄ (Ensign et al. 1990). Esto es consistente con la implicación de un centro Fe-S reducido en la formación del centro mixto Ni-Fe. De hecho la señal de espectroscopía de Raman (EPR) característica del centro Ni-Fe no está presente en la apoCO deshidrogenasa deficiente en Ni, y la señal se recupera cuando la enzima se reconstituye con NiCl₂ (Sowers y Gunsalus, 1993). Estos resultados sugieren que el Ni interviene en la oxidación del CO y que los electrones se transfieren al centro Fe-S (Ensign et al. 1989).

Los genes que codifican la CO deshidrogenasa (*cooS*), una proteína de 22-kDa (*cooF*) y los responsables de la incorporación del Ni en la CO deshidrogenasa (*cooCTJ*) de *R. rubrum* se han clonado y secuenciado (Kerby et al. 1992). La secuencia de aminoácidos correspondiente a *cooF* contiene 4 motivos de cisteína que pueden encontrarse también en las secuencias de la formato deshidrogenasa, nitrato reductasa, dimetil sulfóxido reductasa e hidrogenasa. Mutantes alteradas en el gen *cooC* necesitan para su crecimiento concentraciones de Ni nueve veces superiores a las necesarios para las cepas que contienen el gen silvestre *cooC* (Kerby et al. 1995). El producto de otro gen, *cooA*, situado en la dirección 3' de *cooFSCTJ*, parece ser el responsable de la activación de la expresión de los genes implicados en la oxidación del CO (Shelver et al. 1995). Recientemente, se ha descrito la caracterización del gen *cooH*, que codifica la síntesis de la subunidad mayor de la hidrogenasa que se induce por CO (Fox et al. 1996). Igualmente, Ohtsuki et al (1995) han clonado y secuenciado los genes *hupS* y *hupL* que codifican la síntesis de las subunidades estructurales de la hidrogenasa de membrana, capaz de oxidar H₂, de *P. hydrogenovora*.

3. 2. ANAEROBIOS ACETOGENICOS

Los microorganismos anaerobios acetogénicos, de los que se han descrito casi 40 especies que participan en la parte anaeróbica del ciclo del carbono, llevan a cabo la degradación de productos orgánicos complejos originando acetato como producto final (Drake, 1994). *Clostridium thermoaceticum* es el microorganismo acetogénico mejor estudiado. Esta bacteria puede crecer autotróficamente a expensas de CO o CO₂ + H₂ produciendo acetato (Kerby y Zeikus, 1983):



Aunque la CO deshidrogenasa de esta bacteria puede oxidar CO de forma reversible, su función fisiológica más importante es la de sintetizar acetyl-CoA para producir acetato. En condiciones heterotróficas, a partir de un mol de glucosa, *C. thermoaceticum* produce 3 moles de acetato (Ljungdahl, 1994). Durante la oxidación de la glucosa, via fructosa bifosfato, se obtienen 2 moléculas de piruvato que se transforman en acetyl-CoA por la piruvato-ferredoxin-óxidoreductasa. Durante la actuación de la óxidoreductasa, un piruvato se oxida a acetyl-CoA y CO₂ (reacción A), mientras que el otro se convierte en acetyl-CoA sin oxidación del grupo carbonilo (reacción B). Este hecho, asumiendo la existencia de una sólo óxidoreductasa, implica que la enzima debe distinguir entre las dos actividades, de manera que es capaz de oxidar el grupo carbonilo de un piruvato, mientras que no oxida el del otro piruvato.

A partir de las dos moléculas de acetyl-CoA formadas en la reacción A se forman dos moléculas de acetato por la actuación de las enzimas fosfotransacetilasa y acetato kinasa, produciéndose ATP. Para la formación de la tercera molécula de acetato, la enzima clave en los microorganismos acetogénicos es la CO deshidrogenasa (acetyl-CoA sintasa), que lleva a cabo la síntesis de acetyl-CoA a partir de CO, un grupo metilo y CoA, en un proceso conocido como ruta de Wood-Ljungdahl. En la reacción A de la piruvato ferredoxina óxidoreductasa, el CO₂ formado por la actividad oxidativa de la enzima se reduce primero a formato por la formato deshidrogenasa, que emplea los electrones originados durante la oxidación de la glucosa a acetyl-CoA. Posteriormente, el formato da lugar a formil-tetrahidrofolato (formil-

THF), reducción que implica la participación de THF como coenzima. El formil-THF se reducirá, via metenil-FH₄ y metilén-FH₄, a metil-THF, cuyo grupo metilo se utilizará por la CO deshidrogenasa. Para ello, el grupo metilo del metil-THF se transfiere, por una metiltransferasa, a una proteína intermediaria que contiene un grupo corrinoide hierro-azufre (C/Fe-S), que donará directamente el grupo metilo a la CO deshidrogenasa. La proteína C/Fe-S es un heterodímero de tamaños moleculares 34 y 55 kDa, respectivamente, que contiene cobalto como cofactor corrinoide (5-metoxibenzimidazol-cobamida) y un centro [Fe₄-S₄]. El grupo carbonilo no oxidado del piruvato de la reacción B se cede directamente a la CO deshidrogenasa, por lo que se ha postulado una interacción directa entre la óxidoreductasa y la CO deshidrogenasa.

El tamaño molecular y estructura cuaternaria de la enzima CO deshidrogenasa de *C. thermoaceticum* es sujeto de alguna controversia. Drake et al. (1980) y Ragsdale et al. (1983) calcularon el tamaño molecular, mediante filtración en geles, en 410-436 kDa, concluyendo que se trataba de un dímero, con subunidades α y β de peso molecular 77 y 71 kDa, respectivamente, y dispuestas en configuración (ab)₂. Cada dímero ab contenía 2 Ni, 12 Fe, 14 S y 1 Zn. La enzima es sensible al oxígeno, como lo son todas las CO deshidrogenasas que contienen Ni. La ferredoxina es el aceptor de electrones que forma un complejo electrostáticamente estable con la CO deshidrogenasa (Shanmugasundaram y Wood, 1992).

De los diversos estudios realizados (Kumar et al. 1993; Anderson y Lindahl, 1994; Ferry, 1995), se ha indicado que el complejo enzimático de la CO deshidrogenasa posee tres centros activos. El centro A consistiría en un componente formado por Ni unido a un grupo Fe-S, y pudiera ser el centro activo para la síntesis de acetyl-CoA. Un segundo complejo de Ni-Fe-S, llamado centro C, estaría implicado en la oxidación del CO. El tercer centro de la enzima, centro B, contendría un grupo [Fe₄-S₄] responsable de la transferencia de electrones entre el centro C y los agentes redox externos.

Recientemente se ha demostrado que cuando la enzima purificada se trata con SDS se disocia en dos subunidades, una llamada FM-CODH, que migra más rápida que la enzima nativa en geles de poliacrilamida, de peso molecular 210 kDa y estructura $\alpha_1\beta_2$, y otra subunidad a-metálica que complementaría a la subunidad FM-CODH para formar la holoenzima (Xia et al. 1996). Estos mismos autores han propuesto que la enzima tiene un peso molecular de 300 kDa, con una estructura cuaternaria de tipo $\alpha_2\beta_2$, y peso

molecular de cada subunidad 82 y 73 kDa, respectivamente. La forma FM-CODH es capaz de oxidar CO y contiene 2 Ni y 16 Fe, localizándose en ella los centros B y C, concretamente en la subunidad b. Dado que la subunidad a-metálica no es necesaria para la oxidación de CO y que la forma FM-CODH carece de centros tipo A, se ha sugerido que el centro A se localiza en la subunidad a (Xia et al. 1996).

De acuerdo con la información disponible, basada en estudios de cinética rápida, espectroscopía y resonancia Raman y de infrarojos (Qiu et al. 1994; Kumar et al. 1995, Ragsdale y Kumar, 1996; Ferry, 1995), el mecanismo propuesto para la síntesis de acetil-CoA consistiría en: a) metilación de un centro metálico reducido de la enzima, b) carbonilación de la forma metil-metálica de la enzima, c) transferencia del metil para formar un intermediario acetil- metálico, y d) unión de CoA y rotura del enlace tiol de la forma acetil-metálica para formar acetil-COA.

Kumar et al. (1995) y Qiu et al. (1994) han demostrado la formación de complejos metil-Ni y Fe-CO, y que tales complejos podrían ser los precursores de los grupos metilo y carbonilo del acetil-CoA. Este hecho implica una reacción biológica organometálica. El descubrimiento de un complejo metil-Ni unido a la enzima constituye el primer ejemplo de una especie enzimática con alquil-Ni y revela una nueva función biológica para el Ni (Ragsdale et al. 1996).

A partir del acetil-CoA sintetizado por la CO deshidrogenasa se produce acetato como se ha indicado anteriormente, regenerándose ATP. Se ha calculado que esta ruta metabólica representa el 10% del acetato total que se produce. El acetil-CoA también puede ser utilizado para la síntesis de otros compuestos carbonados celulares. Una información más detallada sobre la fisiología y enzimología de la síntesis de acetil-CoA puede encontrarse en Ferry (1992; 1993; 1995); Ljungdahl (1994), Ragsdale (1991; 1994) y Ragsdale y Kumar (1996).

Los genes que codifican las dos subunidades de la enzima, así como los implicados en la síntesis de la metil transferasa y la proteína C/Fe-S se encuentran juntos en un fragmento de 10 kb (Roberts et al. 1989). La clonación de los genes y la expresión independiente de las dos subunidades de la CO deshidrogenasa en *E. coli* ha demostrado que un grupo [Fe₄-S₄] se localiza en la subunidad a y el centro corrinóide en la subunidad b (Lu et al. 1993).

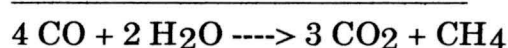
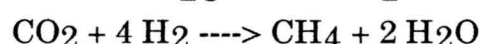
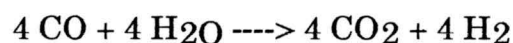
2.4. ANAEROBIOS ACETOTROFICOS

2.4.1. PRODUCTORES DE METANO

Las bacterias metanogénicas representan el último eslabón en la cadena de degradación anaeróbica de los alimentos y ocurren en estrecha asociación con las productoras de H₂. Los sustratos metanogénicos más utilizados son CO₂ + H₂, formato, metanol, metilaminas y formato (Blaut, 1994).

La producción de metano ocurre en ecosistemas tales como la tundra y zonas pantanosas, campos de arroz, sedimentos marinos y de agua dulce, estuarios, parte final del tracto digestivo de las termitas, y en el rumen de los más de 10⁹ rumiantes que existen en la tierra. En tales ambientes, los sustratos orgánicos se fermentan a acetato, CO₂ y H₂ por las bacterias acetogénicas. Estos productos secundarios serán utilizados por los microorganismos metanogénicos para producir metano. Aproximadamente, el 70% del metano que se produce en la naturaleza se origina a partir del grupo metilo del acetato, y el 30% restantes deriva de la reducción de CO₂ por los electrones que se originan en la oxidación del H₂ o del formato (Ferry, 1992, 1993, 1995).

Algunas especies metanogénicas pueden utilizar CO como fuente de carbono y energía (Daniels et al. 1977), pero su crecimiento es lento, por lo que el significado de esta actividad, en la naturaleza, es desconocido (O'Brien et al. 1984). Este proceso implica la catálisis de una CO deshidrogenasa:



Aunque la mayoría del metano que se produce en la naturaleza deriva del acetato, sólo dos géneros de arqueobacterias, *Methanosarcina* y *Methanotherix*, son capaces de fermentar el acetato a CO₂ y CH₄, siendo esta función de las bacterias metanogénicas la de mayor interés en la naturaleza. La diferencia fundamental entre ambos géneros estriba en que *Methanosarcina* puede utilizar para su crecimiento, además de acetato, metanol, metilaminas y CO₂ + H₂. *Methanotherix*, por el contrario sólo crece a expensas de acetato. La utilización del acetato se inicia con la activación del mismo a acetil-CoA, en el caso de *Methanosarcina* mediante la actuación conjunta de las enzimas acetato kinasa y fosfotransacetilasa, y en *Methanotherix* mediante una acetil-CoA

sintetasa. Unas revisiones detalladas sobre la fisiología y la bioquímica de la fermentación del acetato pueden encontrarse en Ferry (1993, 1995), Blaut (1994) y Simpson y Whitman (1993).

Cuando crecen en presencia de acetato, las células de *Methanosarcina thermophila* contienen un complejo enzimático CO deshidrogenasa capaz no sólo de oxidar CO a CO₂, sino también de romper acetyl-CoA y de sintetizar acetyl-CoA a partir de CO, metil-ioduro y CoA (Terlesky et al. 1986; Abbanat y Ferry, 1990; Raybuck et al. 1991). La CO deshidrogenasa está formado por dos componentes enzimáticos agrupados en 5 subunidades. Dos de ellas, de 89 y 19 kDa, intervienen en la formación del componente Ni/Fe-S, y otras dos, de 60 y 58 kDa, constituyen el componente C/Fe-S. La quinta subunidad, de 71 kDa, no se ha caracterizado todavía (Abbanat y Ferry, 1991).

En el mecanismo descrito de actuación, el complejo enzimático CO deshidrogenasa es capaz de romper el acetyl-CoA mediante la inversión del proceso descrito en *C. thermoaceticum* (Abbanat y Ferry, 1991; Jablonski et al. 1993; Lu et al. 1994; Ferry, 1995). De hecho, el grupo metilo se transfiere desde el componente Ni/Fe-S al componente C/Fe-S. Este componente contiene factor III [Coa-(a-5-hidroxibenzimidazol)-cobamida], cuyo átomo de Co se reduce por los electrones cedidos por el componente Ni/Fe-S, aparentemente via un centro Fe₄-S₄ también localizado en el C/Fe-S. El Co reducido es capaz de desplazar el grupo metilo unido a la enzima Ni/Fe-S del complejo CO deshidrogenasa para producir la rotura del acetyl-CoA. Posteriormente, el grupo metilo, se transfiere a través de una tetra-hidro-sarcinopterinina (H₄SPT), que actúa como cofactor, al coenzima M (HS-CoM). En el paso final, el CH₃-S-CoM se reduce a CH₄, actuando el fosfato de 7-mercaptoetanotreonina (CoB) como donador de electrones. El disulfuro CoM-S-S-CoB, que se forma como consecuencia de la reacción, se reduce a las formas sulfidrilo de los cofactores con los electrones que proceden de la oxidación de grupo carbonilo del acetato a CO₂ (Peer et al. 1994). Este mecanismo opera tanto en diversas especies de *Methanosarcina* como de *Methanotherix*.

Los genes que codifican las dos subunidades del componente Ni/Fe-S de *Methanotherix soehngenii* se han clonado y secuenciado (Eggen et al. 1991). Igualmente, se han identificado los genes que codifican el componente C/Fe-S de *Methanosarcina thermophila* (Maupin y Ferry, 1993; Maupin-Furlow y Ferry, 1996). Estos autores han demostrado que la secuencia de aminoácidos de la subunidad de 60 kDa es prácticamente idéntica a la secuencia que codifica la subunidad de 55 kDa del centro C/Fe-S de *C. thermoaceticum* (Lu et

al. 1993). La expresión, en *E. coli*, de los genes *cdhD* y *cdhE*, que codifican cada una de las subunidades del componente C/Fe-S de *Methanosarcina thermophila*, ha permitido la localización del factor III y del centro Fe₄-S₄ en la secuencia aminoacídica de las proteínas (Maupin-Furlow y Ferry, 1996).

2.4.2. REDUCTORES DE SULFATO.

28 *Desulfovibrio vulgaris* y *D. desulfuricans* pueden utilizar CO como única fuente de carbono y energía, produciendo CO₂ y H₂. El crecimiento en CO, sin embargo, es pobre, lo que sugiere que su empleo en condiciones naturales es poco probable (Lupton et al. 1984). Se ha indicado, por tanto, que la oxidación de CO funciona, sobretodo, para recuperar el potencial reductor que puede originar el CO producido por el grupo carboxilo del piruvato durante su conversión a acetil-CoA (Ferry, 1995).

En ambientes anaeróbicos ricos en sulfato, los microorganismos reductores de sulfato pueden oxidar acetato mediante el ciclo del ácido cítrico o a través de una CO deshidrogenasa (Thauer, 1988; Thauer et al. 1989). La mayoría de los reductores de sulfato acetotróficos utilizan el complejo enzimático de la CO deshidrogenasa para romper el acetil-CoA mediante un mecanismo similar al que emplean los microorganismos metanogénicos. El grupo metilo se transfiere al THF y es, posteriormente, oxidado a CO₂, proporcionando seis electrones. El grupo carbonilo también es oxidado a CO₂, originándose dos electrones. La síntesis de ATP ocurre mediante la fosforilación del ADP acoplada a la reducción de sulfato a sulfuro.

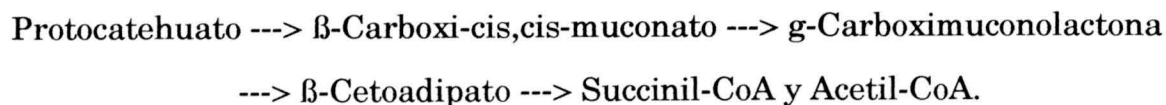
Algunos reductores de sulfato utilizan la ruta metabólica de la CO deshidrogenasa para oxidar substratos más complejos que el acetato, incluyendo compuestos aromáticos e hidrocarburos saturados. Tales compuestos se convierten primero en acetil-CoA que será, posteriormente, oxidado a 2 CO₂. (Aeckersberg et al. 1991; Rabus et al. 1993).

3. Utilización de compuestos hidroaromáticos por *B. japonicum*

La capacidad de diversas especies de la familia *Rhizobiaceae* para crecer a expensas de compuestos fenólicos e hidroaromáticos se demostró primero por Hussien et al. (1974) y, posteriormente, se comprobó por otros autores (Parker et al. 1977; Glenn y Dilworth, 1981; Muthukumar et al. 1982; Chen et al. 1984). En un amplio trabajo, que incluyó especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, pudo demostrarse que esta habilidad varía entre las especies y cepas ensayadas, y que la mayoría de esos compuestos son tóxicos para los miembros de las *Rhizobiaceae* (Parke y Ornston, 1984). Durante estos estudios, sin embargo, se puso de manifiesto que todas las cepas utilizadas, entre ellas *B. japonicum*, eran capaces de utilizar 4-hidroxibenzoato, quinato y shikimato. Dado que estos compuestos dan lugar a la formación de protocatehuato como producto intermediario común, se propuso que los mismos eran degradados, via protocatehuato y β -cetoadipato, para formar succinil-CoA y acetyl-CoA (Parke y Ornston, 1984). Posteriormente, pudo comprobarse que las enzimas que intervienen en la ruta de degradación del 4-hidroxibenzoato son constitutivas en *Bradyrhizobium*, e inducibles en las especies de *Rhizobium* (Parke y Ornston, 1986). Recientemente, se ha demostrado que *A. tumefaciens* también es capaz de metabolizar 4-hidroxibenzoato y protocatehuato (Parke, 1995).

Los compuestos hidroaromáticos quinato y shikimato en *A. calcoaceticus* se convierten primero en deshidroquinato y deshidroshikimato por la quinato/shikimato deshidrogenasa, producto de un gen que se ha denominado *quiA*. El deshidroquinato puede convertirse en deshidroshikimato mediante la deshidratación catabólica por la deshidratasa producto del gen *quiB*. Finalmente, el deshidroshikimato se transforma en protocatehuato por la deshidroshikimato deshidratasa, producto del gen *quiC*. Por otra parte, la conversión de 4-hidroxibenzoato en protocatehuato ocurre mediante la enzima 4-hidroxibenzoato monooxigenasa codificada por el gen *pobA* (para una revisión ver Parke, 1997).

En todos los microorganismos en que se ha estudiado, la secuencia de reacciones que ocurren a partir del protocatehuato es la siguiente:



A partir del protocatehuato, la enzima protocatehuato 3,4-dioxigenasa produce β -carboxi-cis,cis-muconato, cuya descarboxilación por la enzima carboximuconolactona descarboxilasa origina carboximuconolactona, que por la actuación de la enzima β -cetoadipato enol-lactona hidrolasa da lugar a la formación de β -cetoadipato. Posteriormente, el β -cetoadipato se convierte en β -cetoadipato-succinil-CoA por la enzima β -cetoadipato-succinil-CoA transferasa. Finalmente, la enzima β -cetoadipil-CoA tiolasa produce succinil-CoA y acetil-CoA.

A excepción de la enzima protocatehuato 3,4-dioxigenasa, que consta de dos subunidades, una capaz de unir sustrato, y otra que posee actividad catalítica (Zylstra et al. 1989; Hartnett et al. 1990; Frazee et al. 1993), y que está codificada por los genes *pcaHG*, las restantes enzimas implicadas en la degradación de protocatehuato están codificadas por los llamados genes *pca*. Así, las enzimas carboximuconolactona descarboxilasa, beta-cetoadipato enol-lactona hidrolasa y beta-cetoadipato enol-lactona hidrolasa están codificadas, respectivamente, por los genes *pcaB*, *pcaC* y *pcaD*. Mientras que el operón *pcaIJ* codifica la enzima β -cetoadipato-succinil-CoA transferasa, la expresión del gen *pcaF* da lugar a la enzima β -cetoadipil-CoA tiolasa (Parke, 1997).

Los genes *pca* se organizan de diferente manera dependiendo del microorganismo en que se han estudiado. En *A. calcoaceticus* se disponen en un único operón, *pcaIJFBDKCHG*, cuya expresión se induce por protocatehuato (Doten et al. 1987), que actúa en concierto con el regulador codificado por el gen *pcaU*, que se transcribe en dirección contraria a los genes estructurales (Gerischer et al. 1993). En dirección 3' de los genes *pca* se localizan, primero, el gen *pobA* y después los genes *qui* para la degradación del quinato y shikimato

(Elsemore y Ornston, 1994). En *P. putida* los genes relacionados con el metabolismo del protocatehuato se encuentran agrupados en cinco operones, *pcaHG* (Frazee et al. 1993), *pcaIJ* (Parales and Harwood, 1993), *pcaK*, *pcaF* (Romero-Steiner et al. 1994) y *pcaTBDC* (Hughes et al. 1988; Williams et al. 1992). Sólo los genes *pcaHG* se inducen por la presencia de protocatehuato, mientras que el β -ceto adipato interactúa con el producto del gen regulador *pcaR* para activar la expresión del resto de los operones (Romero-Steiner, et al. 1994; Harwood y Parales, 1996). Los genes *pcaK* y *pcaT* no codifican enzimas del metabolismo del protocatehuato; mientras que el producto de *pcaK* parece ser una proteína implicada tanto en la quimiotaxis de 4-hidroxi-benzoato y benzoato como en la asimilación de 4-hidroxi-benzoato y protocatehuato (Harwood y Parales, 1996), el gen *pcaT* parece codificar la proteína transportadora de β -ceto adipato (Buck y Houghton, 1996). La localización precisa de *pcaIJ* y *pcaHG* en relación a los genes *pcaR*, *pcaK*, *pcaF* y *pcaTBDC* aún no se conoce con exactitud en *P. putida*.

En *A. tumefaciens*, los genes estructurales *pca* se organizan en dos operones *pcaIJ* y *pcaDCHGB*, que se transcriben de forma divergente (Parke, 1995). Entre ambos operones se encuentran no sólo los genes *pobA* y su activador de la transcripción *pobR*, que también se transcriben en direcciones opuestas (DiMarco et al. 1993; Parke, 1995), sino además otros dos genes reguladores *pcaR* y *pcaQ* (Parke, 1997). Mientras que el producto de *pcaQ* pertenece al grupo de proteínas reguladoras de la familia LysR, PcaR, así como PobR y PcaU, moléculas reguladoras en *A. calcoaceticus*, son miembros de una pequeña familia de proteínas activadoras que sólo muestran homología consigo mismas y pertenecen a un grupo distinto de proteínas reguladoras bacterianas (Romero-Steiner et al. 1994; Parke, 1995; Parke, 1997). Aunque se ha indicado que los activadores codificados por los genes *pcaA*, *pcaR* y *pobR* de *A. tumefaciens* pueden representar un hecho casual ocurrido durante la evolución, su presencia puede conferir una gran especificidad en el control de procesos metabólicos

complejos que puedan inducirse por distintos tipos de compuestos (Parke, 1997).

Además de 4-hidroxibenzoato, *P. putida* puede degradar benzoato. Durante la degradación de este compuesto se origina catecol, a partir del cual se forma cis,cis-muconato y, posteriormente, β -cetoadipato. Por tanto, la utilización de benzoato y 4-hidroxibenzoato convergen en la formación de β -cetoadipato (Houghton y Shanley, 1994; Nichols y Harwood, 1995). Los genes implicados en la utilización de catecol, genes *catABC*, codifican, respectivamente, las enzimas catecol-1,2-dioxigenasa, β -carboxi-cis,cis-muconato cicloisomerasa y g-carboxi-muconolactona descarboxilasa (Aldrich et al. 1987, Aldrich y Chkrabarty, 1988; Houghton et al. 1995). Las dos últimas enzimas cumplen la misma función que sus homólogas PcaB y PcaC producto de los genes *pcaB* y *pcaC*, respectivamente. Igualmente, el gen *catD* codifica una β -cetoadipato enol-lactona hidrolasa que es isofuncional a la enzima homóloga producto del gen *pcaD*. Los genes *cat* se activan por cis,cis muconato y el producto del gen regulador *catR* (Rothmel et al. 1990; Romero-Steiner et al. 1994).

OBJETIVOS

Las bacterias del género *Bradyrhizobium*, como el resto de las especies de la familia *Rhizobiaceae*, son bien conocidas por su capacidad para infectar las células corticales de las raíces de las plantas leguminosas, formar nódulos y diferenciarse en bacteroides, células especializadas que sintetizan la enzima nitrogenasa, responsable de catalizar la reducción de dinitrógeno atmosférico (N_2) a amonio (NH_4^+). En ausencia de la planta hospedadora, esto es, en vida libre, las especies de *Bradyrhizobium* son también capaces de fijar N_2 en microaerobiosis, y la mayoría de las cepas analizadas tienen la capacidad de crecer microaeróbicamente con nitrato (NO_3^-) como única fuente de nitrógeno. Los microorganismos capaces de llevar a cabo este proceso suelen ser anaerobios facultativos que, en ausencia de oxígeno, emplean el nitrato, en sustitución del oxígeno, como aceptor final de electrones de la cadena respiratoria. La respiración del nitrato resulta en la formación de nitrito (NO_2^-), a partir del cual se inicia, en sentido estricto, el proceso de desnitrificación, que consiste en la producción de óxidos de nitrógeno, óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N_2O) e, incluso, N_2 que volvería de nuevo a la atmósfera. La reducción anaeróbica del nitrato se lleva a cabo de modo secuencial por las enzimas nitrato reductasa (NaR), nitrito reductasa (NiR), óxido nítrico reductasa (NoR) y óxido nitroso reductasa (NoS). Hay que indicar que la reducción anaeróbica del nitrato representa un proceso alternativo de conservación de la energía, ya que la participación en el mismo de enzimas quimiosmóticas, localizadas en las membranas celulares, resulta en la generación de ATP mediante la creación de un potencial electroquímico asociado a la translocación de protones a través de dichas membranas. Conviene indicar, además, que fijación de N_2 y desnitrificación son dos procesos antagónicos, ya que mientras el primero resulta en la formación de amonio, el segundo da lugar a la pérdida de nitrógeno combinado.

En la mayoría de los microorganismos capaces de utilizar nitrato en

microaerobiosis, tales como *E. coli*, *P. stutzeri*, *P. aeruginosa*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Paraccocus denitrificans*, *Haloferax denitrificans*, *Bacillus halodenitrificans*, etc., se ha descrito la existencia de una única enzima nitrato reductasa asociada a las membranas de las células y responsable de la reducción del nitrato. En *E. coli*, además de la típica nitrato reductasa respiratoria (NR A), se ha identificado una segunda enzima (NR Z) que, aunque capaz de sustituir a NR A en sus funciones, no es inducible por microaerobiosis ni por nitrato y no se reprime por oxígeno (Iobbi et al. 1987). En *Alcaligenes eutrophus* H16, un quimiolitotrofo facultativo que puede crecer anaeróbicamente con nitrato o nitrito como única fuente de nitrógeno, también se ha descrito la existencia de dos nitrato reductasas respiratorias, una codificada por genes del cromosoma y otra cuya síntesis está codificada por ADN plasmídico (Warnecke-Eberz y Friedrich, 1993).

Del trabajo de investigación que se lleva a cabo en el Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidí, CSIC, Granada, se ha demostrado la existencia en las membranas de dos enzimas, una de 160 kDa (NR_I) y otra de 200 kDa (NR_{II}), con actividad nitrato reductasa (Fernández-López et al. 1994). NR_I es inducible por microaerobiosis, mientras que NR_{II} requiere para su síntesis la exclusión de oxígeno y la presencia simultánea de nitrato. Ambas enzimas son necesarias para la respiración del nitrato, ya que mutantes, obtenidas mediante inserción del transposón Tn5, deficientes en una u otra enzima son incapaces de crecer cuando se cultivan microaeróbicamente con nitrato como única fuente de nitrógeno. Experimentos de hibridación empleando ADN genómico de las mutantes GRF3 (sólo expresa NR_{II}) y GRF110 (sólo expresa NR_I) y ADN del transposón Tn5 han permitido comprobar tanto la existencia de una sola inserción del transposón en cada cepa mutada como que los *loci* afectados son diferentes (Fernández-López et al. 1994). Sin embargo, el papel fisiológico de

cada enzima no se conoce con exactitud.

Teniendo en cuenta estos resultados previos, el objetivo fundamental del presente trabajo fue el de la la detección física, identificación y caracterización de las regiones de ADN implicadas en la síntesis de la enzima NR_I, así como la purificación y caracterización de dicha enzima.

MATERIAL Y METODOS

1. TECNICAS MICROBIOLÓGICAS

1.1. Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas de *Bradyrhizobium japonicum* y *Escherichia coli*, así como los plásmidos utilizados en este trabajo, junto con sus características más relevantes, se indican en las Tablas 1 y 2, respectivamente.

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo

Cepa	Características relevantes	Fuente o Referencia
<i>B. japonicum</i>		
USDA 110	Cepa silvestre	Maier et al. (1978)
USDA 110 <i>spc4</i>	USDA110, <i>Spc^r</i>	Regensburger y Hennecke (1983)
PJ17	USDA 122DES <i>Sm^r</i> , <i>Km^r</i>	Lepo et al. (1980)
GRF3	PJ17:: <i>Tn5</i> , <i>Sm^r</i> , <i>Km^r</i> , <i>Tc^r</i> , deficiente en NR _I	Fernández-López et al. (1994)
GRF110	PJ17:: <i>Tn5</i> , <i>Sm^r</i> , <i>Km^r</i> , <i>Tc^r</i> , deficiente en NR _{II}	Fernández-López et al. (1994)
GRL300	USDA110(<i>DcoxMorf4orf5</i>), <i>Spc^r</i> , <i>Sm^r</i>	Este trabajo
<i>E. coli</i>		
S17-1	<i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>recA</i> , <i>hsdR</i> , <i>hsdM</i> , RP4-2- <i>Tc</i> :: <i>Mu-Km</i> :: <i>Tn7</i> , <i>Tp^r</i> , <i>Sm^r</i>	Simon et al. (1983)
DH5a	<i>supE44</i> , <i>Dlac U169</i> , <i>f80</i> , <i>lacZDM</i> , <i>5hsdR171</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	B .R .L.
HB101	<i>supE44</i> , <i>hsdS20</i> , <i>rec A13</i> , <i>ara-14</i> , <i>proA2</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>rpsL20</i> , <i>xyl-5mtl1</i> .	Bolívar et al.(1979)

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo

	Características relevantes	Fuente o referencia
pUC18	Vector de clonación y secuenciación Ap ^r	Yanish-Perron et al. (1985)
pUC18-Cm	Vector de clonación y secuenciación Cm ^r	
pBSKS(+)	Vector de clonación y secuenciación Ap ^r	Short et al. (1988)
pSUP202	Vector de clonación pBR325:: <i>mob</i> Tc ^r , Cm ^r , Ap ^r	Simon et al (1983)
pJB3Tc19	Vector de clonación, Tc ^r	Blatny et al.(1997)
pGRF3	Fragmento <i>EcoRI</i> ::Tn5 de GRF3 clonado en pUC18 Ap ^r , Tc ^r	Este trabajo
pGRF110	Fragmento <i>EcoRI</i> ::Tn5 de GRF110 clonado en pUC18-Cm ^r ,Tc ^r , Cm ^r	Este trabajo
pTN3	Fragmento <i>Bam</i> HI de 7'5 kb de pGRF3 clonado en pUC18,Ap ^r	Este trabajo
pTN110	Fragmento <i>Bam</i> HI de 8'5 kb de pGRF110clonado en pUC18-Cm, Cm ^r	Este trabajo
pML1	Cósmido del banco de genes de <i>B.</i> <i>japonicum</i> USDA 110 que hibrida con la sonda <i>Hpa</i> I/ <i>Eco</i> RI de pGRF3, Tc ^r	Este trabajo
pML12	Fragmento <i>Hin</i> dIII de 9'3 kb de pML1 clonado en pUC18, Ap ^r	Este trabajo
pML13	Fragmento <i>Pst</i> I de 9 kb de pML1 clonado en pBSKS(+), Ap ^r	Este trabajo
pMLJB12	Fragmento <i>Hin</i> dIII de 9'3 kb de pML1 clonado en pJB3Tc19, Ap ^r , Tc ^r	Este trabajo
pML122	Fragmento <i>Hin</i> dIII de 9'3 kb clonado en pSUP202- <i>Eco</i> RI,Tc ^r , Ap ^r	Este trabajo
pML122W	Cassette Sm/Spc de pHP45Ω clonado en sustitución de dos fragmentos <i>Eco</i> RI del'361 y 1'657 Kb de pML122, Sm ^r Spc ^r Ap ^r	Este trabajo

pMLPH1	Fragmento <i>Pst</i> I/ <i>Hind</i> III de 3'4 kb de pML12 clonado en pBSKS(+) Ap ^r	Este trabajo
pML124	Fragmento <i>Eco</i> RI de 1'361 kb de pML12 clonado en pUC18, Ap ^r	Este trabajo
pMLBS125	Fragmento <i>Eco</i> RI de 1'657 kb de pML12 clonado en pBSKS(+), Ap ^r	Este trabajo
pML126	Fragmento <i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III de 2'3 kb de pML12 clonado en pUC18, Ap ^r	Este trabajo
pMLEX	Fragmento <i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I de 2'7 kb de pML12 clonado en pBSKS(+), Ap ^r	Este trabajo
pMLX	Fragmento <i>Xho</i> I de 0'9kb de pML12 clonado en pBSKS(+), Ap ^r	Este trabajo
pMLHE	Fragmento <i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III de 1'4 kb de pML13 clonado en pBSKS(+), Ap ^r	Este trabajo
pCDH1	Fragmento <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III de 4'86 kb con los genes <i>coxLMSorf4</i> de <i>Oligotropha carboxydovorans</i> Ap ^r	Schübel et al. (1995)
pHP45W	Plásmido portador del cassette de resistencia a Spc/Sm, Sm ^r , Spc ^r , Ap ^r	Prentki et al. (1984)

1.2. Medios de cultivo

1.2 .1. Medios de cultivo para *B. japonicum*

Para el cultivo rutinario de *B. japonicum* se han utilizado los siguientes medios completos:

Medio YEM (Vincent, 1970)

Manitol.....	5'0 g
NaCl.....	0'1 g
Extracto de levadura.....	1'0 g
K ₂ HPO ₄	0'5 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O.....	0'2 g
Agua (desionizada).....	1'0 l
Agar (para medio sólido).....	15'0 g

Medio PSY (Regensburger y Hennecke, 1983)

KH ₂ PO ₄	0'30 g
Na ₂ HPO ₄	0'30 g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0'05 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0'10 g
Extracto de levadura.....	1'00 g
Peptona	3'00 g
H ₃ BO ₃	0'0100 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	0'0010 g
CuSO ₄ .5H ₂ O.....	0'0005 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O.....	0'0001 g
FeCl ₃	0'0001 g
Biotina.....	0'0002 g
Agua desionizada.....	1000.0 ml
Agar purificado (medio sólido).....	15'0000 g

Todos los medios se prepararon ajustando el pH a 6'8-7'2, y se esterilizaron en autoclave a 115 °C durante 30 minutos.

1.2.2. Medio de cultivo para *E. coli*

Para las cepas de *E. coli* se ha utilizado como medio de cultivo rutinario el descrito por Luria-Bertani (LB, Miller, 1972):

NaCl.....	5 g
Triptona.....	10 g
Extracto de levadura.....	5 g
Agua (desionizada).....	1 l
Agar (para medio sólido).....	15 g

El medio se esterilizó en autoclave a 115 °C durante 30 min.

1.3. Conservación de cepas bacterianas

Para la conservación prolongada de las distintas cepas se han utilizado criotubos que contenían alícuotas de cultivos en fase logarítmica adicionados de glicerol estéril a una concentración final del 20%. Se mantuvieron almacenados a una temperatura de -80 °C.

1.4. Antibióticos

La adición de antibióticos a los medios de cultivo se hizo a partir de soluciones concentradas de los mismos en agua desionizada o, en caso de la tetraciclina y del cloranfenicol, en agua-etanol al 50%. La esterilización de los antibióticos se llevó a cabo mediante el empleo de unidades de filtración Minisart^R NML (Sartorius), de 0'2 μm de tamaño de poro. La concentración final de los distintos antibióticos fue la siguiente:

Antibiótico	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	
	<i>B. japonicum</i>	<i>E. coli</i>
Espectinomicina (Spc)	200	25
Sulfato de Estreptomicina (Sm)	200	25
Tetraciclina (Tc)	100	10
Sulfato de Kanamicina (Km)	180	–
Ampicilina (Ap)	–	200
Cloranfenicol (Cm)	20	50

1.5. Utilización de 4-hidroxibenzoato por *B. japonicum*

Para estudiar la utilización por *B. japonicum* USDA 110*spc4* de 4-hidroxibenzoato como única fuente de carbono se utilizó medio PSY modificado que contenía NH_4Cl (10 mM) como fuente de nitrógeno y 4-hidroxibenzoato (5 mM, Ornston y Parke, 1984) como única fuente de carbono. Como inóculo se empleó un precultivo celular crecido en medio líquido PSY, previamente lavado con medio PSY modificado.

1.6. Inducción de actividad nitrato reductasa en *B. japonicum*

La inducción de actividad nitrato reductasa en *B. japonicum* se llevó a cabo de la manera descrita por Fernández-López et al. (1994). Las cepas USDA 110 y USDA 110*spc4* se cultivaron en 2 ml de medio PSY líquido que se utilizó, a su vez, para inocular matraces que contenían 500 ml de medio PSY modificado por sustitución de la peptona y del extracto de levadura por glutamato (10 mM) como

fuelle de nitrógeno y manitol (1 g/l) como fuente de carbono. Las células se cultivaron durante 4 días, se recogieron y lavaron (8.000 rpm, 10 min) y, finalmente, se resuspendieron (2'5 ml/l de cultivo original) en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7'5). Las suspensiones celulares así obtenidas se utilizaron para inocular (2,5 ml/100 ml) frascos provistos de tapón de rosca perforable que contenían por ml: 0'65 ml de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7'5), 0'05 ml de KNO₃ 100 mM, 0'1 ml de una mezcla de glucosa 50 mM y succinato sódico 50 mM, y 0'2 ml de células (aprox. 0'3-0'5 mg de proteína). Las células se incubaron durante 36 h en condiciones microaeróbicas. La microaerobiosis se realizó gaseando la mezcla de incubación con Ar hasta que la concentración de oxígeno en el interior de los frascos fue del 1%. La concentración de oxígeno se determinó haciendo pasar el flujo procedente del interior del frasco a través de un analizador de oxígeno (Servomex 572B). Se emplearon filtros Acro 50 (Gelman) de 0'2 μ m de tamaño de poro para evitar posibles contaminaciones. Las células se recogieron y lavaron (8.000 rpm, 10 min) con Tris-HCl 50 mM (pH 7'5), hasta eliminar la presencia de nitrito en el medio.

1.7. Crecimiento autotrófico de *B. japonicum* con monóxido de carbono (CO)

El medio mineral utilizado para comprobar la capacidad de *B. japonicum* para crecer a expensas de CO como única fuente de carbono y energía fue una modificación del medio PSY, de manera que la peptona y el extracto de levadura se sustituyeron por NH₄Cl (10 mM) como fuente de nitrógeno. El contenido total de carbono de este medio, como consecuencia de la adición de biotina, fue de 0'098 μ g/ml. El medio se inoculó (dilución 1:100) con precultivos celulares de las cepas USDA 110*spc4* y GRL300 en medio PSY, previamente lavados con el medio descrito. Para el cultivo bacteriano se emplearon frascos con tapón de rosca perforable. Después de la inoculación, los frascos se gasearon con CO hasta conseguir que la atmósfera interior del frasco estuviera formada por una mezcla de aire (50%) y CO (50%). Para el gaseado y la determinación de la concentración de oxígeno se emplearon los sistemas descritos en el apartado 1.6. Los cultivos así preparados se incubaron durante 12 días a 28 °C. Durante este tiempo, a intervalos regulares (48 h) se tomaron alícuotas (1 ml) que se emplearon para determinar la densidad óptica (A₆₀₀ nm) y el número de células viables (unidades formadoras de colonias, ufc). Igualmente, se determinó la concentración inicial y final de proteína del cultivo.

1.8. Obtención de membranas y citosol de *B. japonicum*

La obtención de citosol y membranas celulares se llevó a cabo mediante rotura de las células por diferencia de presión. Se utilizó una prensa de French (Aminco) preenfriada en hielo, capaz de proporcionar una presión constante de 120 MPa. El extracto celular resultante se centrifugó (10.000 rpm, 10 min, 4 °C) para sedimentar las células que no se habían roto, y el sobrenadante se recentrifugó a 250.000 x g (1 h, 4 °C). El nuevo sobrenadante obtenido se consideró la fracción soluble (citosol). El sedimento resultante, conteniendo las membranas, se lavó 1 vez con tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7'5). Las membranas se solubilizaron mediante su resuspensión en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7'5) adicionado de Tritón X-100 al 4% (p/v) e incubación en hielo durante 15 min. El material insoluble en Tritón X-100 se eliminó mediante ultracentrifugación a 270.000 x g (20 min, 4 °C).

2. PROCEDIMIENTOS ANALITICOS

2.1. Determinación de proteína

2.1.1. Método de Markwell et al. (1978)

A alícuotas de 50 μ l de muestra se adicionan 950 μ l de NaOH 0'4 N y 3 ml de reactivo A. Se agita en vórtex y se incuba a temperatura ambiente durante 15 min. Posteriormente se adicionan 300 μ l de reactivo de Folin-Cicolteau diluído 1:1 en agua destilada; se agita en vórtex e incuba a temperatura ambiente durante 30 min. El reactivo A consta de 100 partes de reactivo B y 1 de reactivo C. El reactivo B contiene (p/v) 2% de Na₂CO₃, 0'4% de NaOH, 0'16% de tartrato sódico potásico 0'1 % de SDS 1%. El reactivo C contiene 4% (p/v) de CuSO₄ x 5H₂O. La concentración de proteína se calculó después de registrar los valores de absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 600 nm frente a un blanco que contenía 1 ml de sosa, 3 ml de reactivo A y 300 μ l de Folin-Ciculteau diluído. Este método se empleó para determinar la concentración de proteína en células enteras.

2.1.2. Método de Bradford et al. (1976)

A alícuotas de 1 μ l de muestra se adicionan 800 μ l de agua y 200 μ l de reactivo de Bradford (Biorad). Se agita en vórtex e incuba entre 2 y 60 min. La concentración de proteína se calculó después de registrar los valores de absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 595 nm frente a un blanco que contenía 800 μ l de agua y 200 μ l del reactivo. Este método se empleó para determinar proteína en extractos libres de células.

La concentración de proteína presente en las muestras, independientemente del método utilizado, se calculó por interpolación respecto a una curva patrón que se preparó con concentraciones crecientes de albúmina bovina (Sigma).

2.2. Determinación de actividad nitrato reductasa

2.2.1. Ensayos *in vitro*

La determinación de actividad nitrato reductasa en citosol y membranas se realizó empleando la mezcla de reacción descrita por Delgado et al. (1989):

0'2 ml de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7'5)

0'1 ml de KNO₃ 100 mM

0'1 ml de metil viológeno 2 mM

0'1 ml de agua destilada

0'4 ml de extracto celular (0'3-0'5 mg de proteína)

0'1 ml de ditionito sódico 46 mM en Tris/HCl 500 mM (pH 7'5)

La reacción se inició con la adición de ditionito sódico al resto de la mezcla, y se mantuvo a 30 °C durante 15-30 min. Los controles se obtuvieron agitando las mezclas de reacción vigorosamente en el momento de la adición del ditionito sódico hasta la completa desaparición del color azul producido por éste.

Para la valoración del nitrito producido se utilizó la reacción de diazotación de Griess-Yllosway que emplea la sulfanilamida y el ácido N-naftil-etilén-diamino (NNEDA) como reactivos (Hageman y Hucklesby, 1971). Para ello, a un volumen de muestra se adicionan volúmenes iguales de sulfanilamida y NNEDA. Se agita en vórtex e incuba a temperatura ambiente durante 20 min. Después se determina la absorbancia a 540 nm de longitud de onda. La curva patrón de nitrito se preparó a partir de concentraciones conocidas de KNO₂ en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7'5).

La sulfanilamida se preparó disolviendo 5 g de sulfanilamida en 100 ml de ácido clorhídrico concentrado (12 N). Posteriormente, se diluyó hasta 500 ml con agua destilada. El NNEDA se obtuvo disolviendo 100 mg de este producto en 500 ml de agua destilada. Ambos reactivos deben preservarse de la luz, manteniéndolos en frascos color topacio o envueltos en papel de aluminio.

2.2. Detección de actividad nitrato reductasa en geles de poliacrilamida

La detección de actividad nitrato reductasa en geles de poliacrilamida se realizó siguiendo el método descrito por Fernández-López et al. (1994). Los geles se prepararon en gradiente continuo del 4% al 10% de poliacrilamida, en tampón TBE (pH 8'4) suplementado con Tritón X-100 al 0'1% (p/v). Las soluciones de poliacrilamida se desgasaron mediante vacío durante 10 min y el gradiente se formó empleando un mezclador de gradientes (modelo 2117, Pharmacia). Los catalizadores TEMED (0'2 %) y persulfato amónico (10% en agua) se adicionaron a cada solución de acrilamida antes de iniciar la formación del gel. Como tampón de electroforesis se empleó TBE (pH 8'4) conteniendo Tritón X-100 al 0'1% (p/v). La electroforesis se llevó a cabo en una cubeta Miniprotean II (Biorad) que emplea como moldes para el gel placas de vidrio de 7'3 x 10,2 cm con espaciadores de 0'75 mm. La intensidad de la corriente fue de 20 mA.

Las muestras y marcadores de tamaño molecular se prepararon mezclándolas con un 25% de volumen de tampón de carga formado por tampón TBE adicionado de 50% de glicerol y 20% de azul de bromofenol. Tras la electroforesis (aprox. 90 min) el gel se sumergió en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7'5) que contenía metil viológeno (5 mM) y ditionito sódico (1 mg/ml) y se incubó, a temperatura ambiente, durante 5 min. Transcurrido este tiempo, al tampón de incubación se le adicionó KNO₃ 100 mM (1 ml/50 ml de tampón) y se incubó de nuevo hasta la aparición de las bandas correspondientes a la actividad nitrato reductasa. Siguiendo esta metodología, el gel se tiñe de azul por efecto del ditionito, excepto en aquella zona donde se oxida el reductor debido a la actividad del enzima, que aparece de color blanco. La posibilidad de que otros enzimas con actividad reductasa pudieran ser responsables de la oxidación del ditionito se eliminó, ya que la omisión de nitrato en la mezcla de incubación de los geles resultó en la ausencia de expresión de bandas de proteína con actividad NR. Después de la aparición de la(s) banda(s) de

oxidación, la decoloración del gel se detuvo mediante inmersión del mismo en una solución de cloruro de trifetil tetrazolio al 2'5% durante 20 min. Posteriormente, el gel se conservó a 4 °C en ácido acético al 7%.

2.3. Determinación de actividad monóxido de carbono deshidrogenasa

2.3.1. Ensayos *in vitro*

2.3.1.1. Reducción del azul de metileno

Se ha realizado según el método descrito por Meyer y Schlegel (1979), que emplea una mezcla de:

0'9 ml de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7'5)

0'05 ml de glucosa 2 mM

0'02 ml de azul de metileno 2 '5 mM

0'01 ml de una mezcla formada por 1 unidad de glucosa

oxidasa y 1 unidad de catalasa, preparada en tampón Tris-HCl

50 mM (pH 7'5)

0'02 ml de extracto celular (0'3-0'5 mg de proteína)

La reacción se llevó a cabo en cubetas de espectrofotómetro de 1 cm de diámetro, provistas de cierre hermético y perforable que fueron gaseadas, durante al menos 3 min, con CO. La reacción se inició por adición de la proteína. Como control se emplearon mezclas gaseadas con Ar. La actividad monóxido de carbono deshidrogenasa se determinó calculando la velocidad de reducción del azul de metileno medida espectrofotométricamente (A_{615} nm) como desaparición del color azulado del azul de metileno y considerando un coeficiente de extinción molar $e = 37.1 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ (Meyer y Schlegel, 1979).

2.3.1.2. Reducción de cloruro de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-2H-tetrazolio (INT)

Este método (Kraut et al. 1989), emplea una solución compuesta de:

250 μl de INT 9'9 mM en agua

50 μl de 1-metoxi-fenacina metosulfato (MPMS) 8'9 mM

500 μl de Tritón X-100 al 25 % (p/v)

19'2 ml de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7'5)

A 1 ml de esta solución se adiciona, en una cubeta de espectrofotómetro de 1 cm de diámetro, 10-50 μ l de extracto celular. La reacción se inicia con la adición de 200 μ l de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7'5 (o tampón fosfato-NaOH pH 7'2) saturado con CO. La actividad monóxido de carbono deshidrogenasa se calculó después de determinar espectrofotométricamente (A₄₉₆ nm) la aparición de color rojo debida a la reducción de INT a formazán.

2.3.2. Detección de actividad monóxido de carbono deshidrogenasa en gel de poliacrilamida

Para la preparación de los geles, se ha seguido el método descrito por Laemmli (1970). El gel de resolución se preparó a una concentración del 7'5% de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 40:2) en tampón Tris-HCl 0'98 M (pH 8'8), y el de empaquetado al 4'5% en tampón Tris-HCl 0'325 M (pH 6'8). Como tampón de desarrollo se utilizó: Tris 3 g/l, glicina 14.4 g/l.

Después de la electroforesis, la detección de actividad monóxido de carbono deshidrogenasa se llevó a cabo de la manera indicada por Meyer y Schlegel (1980) y Kim y Hegeman (1981). Para ello, el gel de poliacrilamida se introdujo en un frasco provisto de tapón de rosca perforable que contenía tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7'5) suplementado con fenazina metosulfato (0.1 mM) y azul de nitrotetrazolio (0'05 mM), se cerró y se gaseó con CO durante al menos 5 min. Siguiendo esta metodología, el gel se tiñe de violeta en aquel lugar donde se deposita el formazán que se origina como consecuencia de la oxidación del azul de nitrotetrazolio. Después de la aparición de la banda correspondiente a la actividad, el gel se lavó varias veces con agua y se conservó a 4 °C en ácido acético glacial al 7%.

2.4. Detección de proteína en geles de poliacrilamida

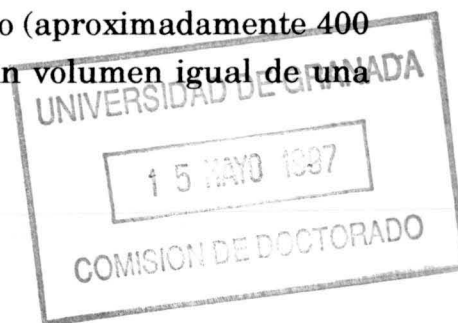
La detección de proteína después de la electroforesis en geles de poliacrilamida se realizó mediante tinción con azul Coomassie R-250. Para ello, el gel se sumergió en una solución de fijación y teñido simultáneo compuesta por etanol: ácido acético glacial:agua destilada (50:10:40) que contenía azul Coomassie R-250 al 0'2% (p/v). Después de la incubación del gel durante 30 min, en agitación suave a temperatura ambiente, se procedió a su decoloración con una solución de metanol:acético glacial:agua (5:15:80). Posteriormente, el gel se conservó a 4 °C en ácido acético al 7%.

Cuando se emplearon geles de poliacrilamida para la detección tanto de proteína como de actividad nitrato reductasa y monóxido de carbono deshidrogenasa, el tamaño molecular relativo (M_r) de las enzimas se estimó según su movilidad relativa (R_f) en los geles. El R_f se calculó mediante la fórmula: $R_f = \text{distancia de migración de la proteína desde el origen} / \text{distancia desde el origen al punto de referencia}$. Como punto de referencia se puede utilizar bien el frente de electroforesis (azul de bromofenol), el extremo del gel o la proteína patrón que más haya migrado. Como proteínas patrón de elevado tamaño molecular se han utilizado las siguientes: tiroglobulina, 669 kDa; ferritina, 440 kDa; catalasa, 232 kDa; lactato deshidrogenasa, 140 kDa y albúmina, 67 kDa (HMWD, Pharmacia). En otros casos, como se especifica en el texto, se ha empleado el Sistema de Escalera de Proteínas de 10 kb (Gibco-BRL). La preparación de las proteínas patrón para electroforesis se realizó según instrucciones del proveedor. El cálculo del M_r se basó en las rectas de calibrado construidas representando en el eje de ordenadas el logaritmo decimal del tamaño molecular de las proteínas patrón y en el eje de abscisas el valor correspondiente de R_f .

3. TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

3.1. Preparación de ADN plasmídico

La obtención de ADN plasmídico se realizó siguiendo el método de lisis alcalina (Sambrook et al. 1989). Para ello, las células de 1'5-3 ml de cultivo se recogieron por centrifugación (15.000 rpm, 2 min) en tubos de microfuga. Después de eliminar el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 100 μ l de solución I (glucosa 50 mM, EDTA Na₂ 10 mM y Tris-HCl 25 mM, pH 8'0) a la que se adicionó inmediatamente antes de usar 5 mg/ml de lisozima, y se incubaron las células durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 200 μ l de solución II (NaOH 0'2 M, SDS 1%) recién preparada, se mezclaron ambas soluciones mediante inversión, y se incubó en hielo durante 5 min. Pasado este tiempo, se adicionaron 150 μ l de solución III (60 ml de acetato potásico 5M, 11'5 ml de ácido acético glacial y 28'5 ml de agua, pH 4'5), se agitó la mezcla por inversión del tubo y, después de incubar en hielo durante 5 min, se centrifugó (15.000 rpm, 2 min). El sobrenadante obtenido (aproximadamente 400 μ l) se pasó a un nuevo microtubo, al que se adicionó un volumen igual de una



mezcla de fenol-cloroformo (1:1), y tras mezclar bien por agitación en vórtex, se separaron las dos fases por centrifugación (15.000 rpm, 5 min). La fase superior acuosa, que contiene el ADN, se transfirió a un tubo nuevo, se mezcló con 2 volúmenes de etanol absoluto preenfriado a -20 °C, se incubó a -80 °C durante 30 min (alternativamente, la mezcla se puede mantener durante 15 min en una mezcla hielo-agua) y, a continuación, se centrifugó (15.000 rpm, 15 min). El precipitado obtenido se lavó con etanol al 70% preenfriado a -20°C y se centrifugó de nuevo (15.000 rpm, 3 min). Por último, después de eliminar el sobrenadante, el precipitado se secó al vacío y se resuspendió en 25 μ l de tampón TE8 (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) .

Para eliminar el ARN, al volumen anterior se puede adicionar 1 μ l de ribonucleasa A preparada de forma concentrada (10 μ g/ml en NaCl 15 mM y Tris-HCl 10 mM, pH 7'5). De forma previa a su utilización, la solución concentrada de RNasa se calentó a 100 °C durante 15 min, se dejó enfriar lentamente a temperatura ambiente, se prepararon alícuotas y se almacenaron a -20 °C.

La mezcla fenol-cloroformo (proporción 1:1) se preparó a partir de fenol al 100% que contenía 8-hidroxiquinoleína al 0'1% en Tris-HCl 0'1 M (pH 8.0), y de una mezcla de alcohol isoamílico y cloroformo en proporción 1:24.

3.2. Preparación de ADN total

El aislamiento de ADN total se llevó a cabo a partir de 5 ml de cultivo en fase logarítmica de la cepa bacteriana elegida. Las células se centrifugaron (15.000 rpm, 2 min) en alícuotas de 1'5 ml en una microfuga, se lavaron con 0'5 ml de tampón TE8 adicionado de sarcosil (N-lauril sarcosina) al 0'1% y se resuspendieron en 0'4 ml de TE8. A la suspensión resultante se adicionaron 50 μ l de una solución de SDS al 10% y 50 μ l de una solución (5 μ g/ml) de proteinasa K o pronasa predigerida en TE8. La mezcla se incubó durante 1 hora a 37 °C, se adicionaron 100 μ l de ClNa 5M preparado en TE8 , se incubó en hielo durante 30 min y se centrifugó (15.000 rpm, 2 min). El sobrenadante se recogió en un nuevo tubo, y se le adicionó un volumen de fenol-cloroformo, procediéndose posteriormente como se indica en el apartado apartado 3.1. El último paso se puede repetir hasta que la fase superior acuosa esté limpia. A la fase acuosa se le adiciona entonces 2.5 volúmenes de etanol absoluto enfriado a -20°C, se mezcla bien y se deja durante 15 min a -80 °C. Después de centrifugar (15.000

rpm, 15 min) el precipitado se lava con 0'2 ml de etanol al 70%, se seca al vacío y se resuspende, finalmente, en 50 μ l de agua bidestilada estéril o tampón TE8.

3.3. Determinación de la concentración de ADN

Se ha seguido el método espectrofotométrico descrito en Sambrook et al. (1989). La absorbancia (A_{260} nm y A_{280} nm) de las soluciones de ADN en agua o en TE se determinaron utilizando como blanco agua o TE, respectivamente. La concentración se calcula respecto a los valores estándar de $DO_{260} = 1$ para soluciones con 50 μ g/ml de ADN de cadena doble. La relación DO_{260}/DO_{280} se usa como estimador de la pureza de la preparación, considerándose valores inferiores a 1'8 como indicadores de contaminación por proteínas o fenol. Para muestras de ADN muy impuras o de baja concentración, se empleó el método de comparación de fluorescencia en gel de agarosa bajo luz UV frente a marcadores de ADN de concentración conocida, también descrito por Sambrook et al. (1989).

3.4. Digestión total de ADN con endonucleasas de restricción

La digestión total de ADN con enzimas de restricción se llevó a cabo en las condiciones óptimas para cada enzima, siguiendo las indicaciones, en cuanto a temperatura y tampón, recomendadas por los proveedores.

Las digestiones con más de una enzima de restricción se realizaron simultáneamente cuando las enzimas requerían el mismo tampón y temperatura. En caso contrario, y siempre que fuera factible, se digirió primero con la enzima que requería el tampón de menor fuerza iónica, adicionando posteriormente el tampón y enzima para la segunda digestión. Cuando esto no fue posible, se llevó a cabo, primero, la digestión con una enzima; se limpió luego el ADN mediante tratamiento con fenol-cloroformo, se precipitó con etanol y, posteriormente, se resuspendió en agua, llevándose a cabo entonces la digestión con la segunda enzima.

3.5. Separación e identificación de fragmentos de restricción mediante electroforesis en gel de agarosa

3.5.1. Electroforesis de ADN

La separación de fragmentos de restricción se ha llevado a cabo mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa sumergidos en TBE (Tris 89 mM, EDTA-Na₂ 2'5 mM, BO₃H₂ 89 mM, pH 8'2). La concentración de agarosa ha sido del 0'7% o del 1%, según el tamaño de los fragmentos a resolver. El voltaje usual de trabajo ha sido de 120 V en cubetas de electroforesis GNA 200 (Pharmacia) y de 80 V en cubetas de electroforesis GNA 100 (Pharmacia). Como tampón de carga se ha utilizado una mezcla de sacarosa al 40% y azul de bromofenol al 0'25%, ambos preparados en agua. Se ha empleado 1 μ l de tampón de carga por cada 5 μ l de solución de ADN.

3.5.2. Revelado de geles y fotografía

Las muestras de ADN presentes en los geles de agarosa se revelaron sumergiéndolos en agua a la que previamente se adicionan unas gotas de una solución de bromuro de etidio (1 mg/ml), durante 15-20 min. Posteriormente se observaron con luz UV (260 nm) en un transiluminador.

Las fotografías de los geles se han realizado con una cámara Polaroid MP-4 provista de filtro rojo y película Polaroid 667. Alternativamente, se ha utilizado una videocámara acoplada a un sistema de impresión de imágenes (Gelprinter vm509).

3.5.3. Estimación del tamaño molecular de fragmentos de restricción

La determinación del tamaño molecular de fragmentos de restricción se ha efectuado a partir de la construcción de gráficas en las que se representa el logaritmo del tamaño molecular relativo (M_r) de moléculas patrón de ADN, frente a la movilidad relativa (R_f) de dichas moléculas en gel de agarosa, esto es, la distancia de migración de cada una en el gel dividida entre la longitud del gel. Como marcadores de tamaño molecular se han utilizado los fragmentos de restricción del ADN del fago lambda resultantes de la digestión con endonucleasa *Hind*III o *Eco*RI/*Hind*III.

3.6. Purificación de fragmentos de ADN a partir del gel de agarosa

Para la purificación de fragmentos de ADN de los geles de agarosa se han utilizado dos metodologías, GeneClean II[®] (Bio 101 Inc., La Jolla, California, USA) y Quiaex II[®] (Quiagen Inc., Chatsworth, California, USA).

3.6.1. GeneClean II[®]

Una vez identificado el fragmento de restricción que se desea purificar, se cortó el gel de agarosa alrededor del mismo con un bisturí, se colocó en un microtubo y se trocó lo más homogéneamente posible. Al tubo se adicionaron 4 volúmenes de NaI y 1/2 volumen de modificador-TBE[®] (mezcla concentrada de sales que neutraliza el efecto inhibitor del tampón TBE sobre la adhesión del ADN al glassmilk[®]; su uso es necesario, por tanto, sólo cuando la electroforesis se haya realizado en tampón TBE) y tras agitar en vórtex se incubó a 48 °C durante el tiempo necesario (aprox. 5 min) para que la agarosa se disuelva. Posteriormente, se adicionó glassmilk[®] (5 µl/5µg ADN; esta concentración debe aumentarse en 1 µl adicional por cada 0'5 µg en exceso de ADN). El glassmilk[®] consiste en una suspensión de una matriz de sílice en agua y es marca registrada de Bio 101 Inc., La Jolla, California. Después de mezclar, la suspensión se incubó en hielo, al menos 5 min, para permitir la adhesión del ADN a la sílice, agitando cada 1-2 min para prevenir la precipitación de la misma. A continuación, se centrifugó (15.000 rpm, 5 segundos) para precipitar el ADN que permanece unido a la matriz, y se lavó 3 veces con solución New Wash[®] (mezcla específica de NaCl, Tris, EDTA, etanol y agua) preenfriada a -20 °C. Tras eliminar el último sobrenadante, el ADN se separó de la matriz de sílice eluyendo con 10 µl de agua bidestilada o tampón TE y calentando a 50 °C durante 2 min. Después de centrifugar (15.000 rpm, 30 s), el sobrenadante se recogió cuidadosamente y se colocó en un nuevo tubo. El último paso se puede repetir para eluir el ADN que pueda permanecer unido a la matriz de sílice.

3.6.2. Quiaex II[®]

Una vez cortada la agarosa alrededor del fragmento deseado se colocó en un microtubo, se trocó y se adicionaron 3 volúmenes de tampón QX1[®], que contiene altas concentraciones de agentes caotrópicos. Después de agitar con vórtex, se adicionaron 5 µl/µg de ADN de resina Quiaex II[®] y se incubó a 50 °C

hasta conseguir la disolución de la agarosa (aprox. 10 min), agitando el tubo por inversión manual cada 2 minutos. A continuación se centrifugó (15.000 rpm, 30 s), se eliminó el sobrenadante, y el precipitado, que contiene el ADN adherido a la matriz, se resuspendió en 0'5 ml de tampón QX1[®]. La solución obtenida se centrifugó 30 segundos, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se lavó dos veces con 0'5 ml de tampón PE[®] adicionado de etanol para eliminar los agentes caotrópicos y se secó a temperatura ambiente. El ADN se separó de la matriz mediante resuspensión en 20 μ l de agua bidestilada o tampón TE y calentando a 50 °C durante 10 min. La resina se eliminó centrifugando (15.000 rpm, 30 s) y el sobrenadante se recogió con cuidado y se pasó a un nuevo tubo. Esta última operación se puede repetir una segunda vez para eluir el ADN restante.

3.7. Manipulación de los fragmentos de restricción

Los fragmentos de restricción, una vez aislados de los geles de agarosa y purificados pueden manipularse de distinta manera, de acuerdo con su utilización posterior.

3.7.1. Ligación de fragmentos de restricción en vectores de clonación

La ligación entre un fragmento de ADN y el vector de clonación adecuado, se efectuó usando relaciones molares vector:inserto variables, dependiendo, por una parte, del tamaño de los fragmentos y, por otra, del tipo de extremos, romos o cohesivos, del fragmento en cuestión. En ambos casos, el volumen final de mezcla de reacción fue de 10-20 μ l. Las reacciones se llevaron a cabo en presencia de la enzima DNA ligasa del fago T4 y en el tampón indicado por los proveedores, incubando 3-4 h a temperatura ambiente o, alternativamente, durante una noche a 15 °C. Cuando se trataba de una ligación de extremos romos, se adicionó polietilenglicol (PEG 8.000) a una concentración final del 20%. En este último caso la temperatura de incubación fue de 20 °C.

3.7.2. Relleno de extremos 5' de fragmentos de restricción

Para la creación de extremos romos en fragmentos de restricción con extremos 5' protuberantes, se procedió al relleno del extremo 3' de la cadena complementaria. Para ello, a 20 μ l de solución de ADN se adicionó 1 μ l de una solución 1 mM de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) y 1 unidad de enzima

Klenow/ μg de ADN. La mezcla se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y se detuvo por adición de 200 μl de tampón TE y 200 μl de fenol-cloroformo. Se recogió el sobrenadante y el ADN se precipitó con 0'1 volúmenes de acetato sódico 3 M (pH 5'2) y 2 volúmenes de etanol absoluto. Finalmente, el ADN se resuspendió en agua bidestilada estéril.

3.7.3. Eliminación de extremos 3' de fragmentos de restricción

En el caso de que la digestión de ADN produjese fragmentos con extremos 3' protuberantes, la eliminación de los mismos se efectuó adicionando a la solución de ADN (20 μl) 1 μl de una solución 2 mM de dNTPs y 1 unidad de ADN polimerasa del bacteriófago T4 por μg de ADN. La mezcla se incubó durante 15 min a 12 °C. La inactivación de la polimerasa se realizó mediante calentamiento a 70 °C durante 10 min y posterior adición de 200 μl de tampón TE y 200 μl de fenol-cloroformo. Se recogió el sobrenadante y la recuperación de ADN se llevó a cabo como se ha descrito en el apartado anterior.

3.8. Preparación y transformación de células competentes de *E. coli*

La preparación de células competentes de *E. coli* se ha realizado esencialmente según la técnica descrita por Lederberg y Cohen (1974).

A partir de un cultivo de la cepa de *E. coli* a transformar, se inoculó medio LB (1 ml cultivo/100 de medio) y se incubó en agitación a 37 °C hasta que el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ de 0'6. Tras dejar enfriar en hielo, las células se centrifugaron (10.000 rpm, 5 min, 4 °C), se resuspendieron en 1 volumen de una solución de MgCl₂ 0'1 M preenfriada a 4 °C, y se centrifugó de nuevo (5.000 rpm, 5 min, 4 °C). A continuación, las células se resuspendieron en 1/2 volumen de una solución de CaCl₂ 0'1 M preenfriada a 4 °C y, tras dejarlas en hielo un mínimo de 30 min, se centrifugaron (5.000 rpm, 5 min, 4°C) y se resuspendieron suavemente en 1/10 volumen de una solución de CaCl₂ 0'1 M y glicerol al 20% preenfriada a 4 °C. Las células así preparadas se repartieron en alícuotas de 100 μl en tubos eppendorf preenfriados a 4 °C, que se conservaron a -80 °C hasta su uso.

Para la transformación de células competentes con ADN plasmídico se siguió la técnica descrita por Rodríguez y Tait (1983), modificada como se indica a continuación. A alícuotas de 200 μl de células competentes se adicionó ADN (0'05-0'5 μg) y la mezcla, después de su incubación en hielo un mínimo de 30

min, se sometió a un choque de calor de 42 °C durante 2 min. Posteriormente, la mezcla se incubó 5 min en hielo, se le adicionó 1 ml de medio LB y se incubó a 37 °C durante 60-90 min. Transcurrido este tiempo se sembraron alícuotas de 0'1 ml en placas de medio LB suplementado con los correspondientes antibióticos.

3.9. Transformación de *E. coli* mediante electroporación

Partiendo de un cultivo de la cepa adecuada de *E. coli*, se inoculó medio LB (1 ml de cultivo/ 100 ml de medio) y se incubó a 37 °C, en agitación, hasta que el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ de 0'5-1. Tras dejar enfriar en hielo, las células se recogieron por centrifugación (5.000 rpm, 15 min, 4 °C) y se lavaron, de forma secuencial, con 1, 0'5, 0'5 y finalmente 0'2 volúmenes de agua estéril y enfriada a 4 °C. Después de la última centrifugación, las células se resuspendieron en 2-3 x 10⁻³ volúmenes de agua estéril y fría con glicerol al 10% (esterilizado por filtración). Las células así preparadas se conservaron en alícuotas de 40 µl, congeladas a -80 °C.

La electroporación se llevó a cabo en una cubeta de electroporación (2 mm de grosor) preenfriada a 4 °C donde se mezclaron 39 µl de suspensión celular y 1 µl de la suspensión de ADN (1 ng ADN/ ml de agua, TE o mezcla de ligación) con la que se quería transformar. La cubeta se colocó en el electroporador y se le aplicó una corriente de 2'45 kV. Una vez aplicada la carga eléctrica, la cubeta se extrajo del electroporador rápidamente y se le adicionaron 960 µl de medio LB, se agitó suavemente y se incubó 1 h a 37 °C. Transcurrido ese tiempo, se sembraron alícuotas de 100 µl en placas de medio LB suplementado con los correspondientes antibióticos.

La esterilización de las cubetas de electroporación se llevó a cabo mediante inmersión en etanol al 70% durante al menos 12 h y posterior secado bajo luz ultravioleta.

3.10. Experimentos de hibridación ADN-ADN

3.10.1. Transferencia de ADN a filtros de nylon

La transferencia de fragmentos de restricción de ADN a filtros de nylon se realizó según la técnica de Southern (1975). Para ello, después de la correspondiente electroforesis, el gel de agarosa se sumergió en una solución de HCl 0'25 M durante 20 min para someter el ADN a depurinación ácida. Tras

lavar varias veces con agua destilada, se procedió a desnaturalizar el ADN mediante inmersión repetida (dos veces) en una solución de NaOH 0'5 M, NaCl 1'5 M, durante 15 min. Por último, el ADN se neutralizó con una solución de Tris-HCl 0'5 M, NaCl 3 M, pH 7, mediante otros dos lavados de 15 min.

Después de lavar el gel con agua destilada, se colocó sobre una superficie plana y regular, habitualmente un cristal, cubierta con papel Whatman 3MM cuyos extremos, a modo de mecha, se sumergen en un reservorio de tampón de transferencia 10xSSC (1xSSC: NaCl 150 mM, citrato sódico 15 mM, pH 7). Sobre el gel se colocaron un filtro de nylon y tres piezas de Whatman 3MM de tamaño similar al gel (el filtro y las piezas de papel Whatman se lavaron primero con agua destilada y se saturaron después en tampón 20xSSC durante 30 min). Sobre este dispositivo se colocaron varias piezas de papel de celulosa y, sobre éstas, a su vez, un peso de aproximadamente 1 Kg para mantener el sistema ligeramente comprimido. El proceso de transferencia de ADN del gel a la membrana de nylon se realizó, normalmente, durante una noche.

Una vez finalizada la transferencia, el filtro de nylon se lavó con una solución de 2xSSC para eliminar restos de agarosa, se secó a temperatura ambiente y se expuso durante 5 min a luz ultravioleta para fijar el ADN.

3.10.2. Marcaje de sondas de ADN

El marcaje de sondas se ha realizado empleando el sistema no radiactivo comercializado por Boehringer (Mannheim, Alemania), siguiendo las recomendaciones del proveedor. Esta técnica consiste, en esencia, en la síntesis parcial de ADN a partir del ADN molde que se quiere usar como sonda. Para ello, se utiliza el ADN molde desnaturalizado por calor (100 °C, 10 min), una mezcla de hexanucleótidos, fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* y digoxigenina-dUTP como nucleótido marcado, ya que se puede detectar mediante una reacción inmunológica específica.

Los ADNs usados como sonda fueron tanto fragmentos purificados como ADN plasmídico o linearizado. Se utilizaron, habitualmente, 100-300 ng de ADN desnaturalizado en un volumen de reacción final de 20 μ l. El tiempo de incubación fue siempre superior a 6 h a una temperatura de 37 °C.

3.10.3. Hibridación ADN-ADN con sonda no radiactiva

El filtro de nylon al que se había transferido el ADN se colocó en un rodillo de hibridación al que se adicionaron 20-40 ml de solución de hibridación (5x SSC, N-lauril sarcosina 0'1%, SDS 0'02%, formamida 50% y agente bloqueante al 2%) y se incubó a 42 °C, al menos durante 3 h, en horno de hibridación (Amersham). Después de eliminar la primera solución, se adicionó de nuevo solución de hibridación suplementada con el ADN sonda desnaturalizado (100 °C, 10 min) y se incubó a la misma temperatura durante un tiempo mínimo de 6 h. Cuando la homología de los ADNs a hibridar se presumió baja, la temperatura de prehibridación e hibridación se disminuyó hasta 37 °C.

Terminado el proceso de hibridación, el filtro se lavó primero 2 veces con una solución 2x SSC y SDS al 0.1% (v/v) durante 5 min, y después, otras 2 veces con una solución 0.1x SSC y SDS al 0.1% (p/v) a 68 °C durante 15 min. Una vez lavado el filtro, se procedió a la detección inmunológica del ADN hibridado usando anticuerpos específicos contra la digoxigenina. Estos anticuerpos están conjugados con fosfatasa alcalina que, en presencia de 3-(2'-spiroadamantano)-4-metoxi-4-(3''-fosforiloxi)-fenil-1,2-dioxietano (AMPPD), produce un compuesto inestable que, a su vez, se descompone formando el anión metil-meta-oxibenzoato, el cual emite luz a una longitud de onda de 477 nm. La emisión de luz se detectó poniendo en contacto el filtro con una película autoradiográfica Kodak X-Omat. El tiempo de exposición (5 min a 3 h) para la detección de las bandas de hibridación depende de la cantidad de ADN, del grado de homología de la sonda y de la eficiencia del marcaje de la sonda.

Para el revelado de la película se usó revelador Neutol Liquid NE (Agfa) y fijador N FIX 172 (Negra) a las diluciones y tiempos recomendados por las casas comerciales.

3.10.4. Hibridación en colonias

Se ha seguido la metodología descrita por Sambrook et al. (1989). Diluciones seriadas de cada vial del banco de genes se sembraron en placas de medio LB de manera que pudieran obtenerse colonias aisladas. Cuando las colonias estuvieron crecidas se posaron sobre ellas filtros de nylon del mismo tamaño, de forma que las colonias quedasen impregnadas en el filtro. Los filtros de nylon se colocaron sobre nuevas placas de medio LB y se incubaron a 37 °C hasta observar crecimiento celular sobre los mismos.

Los filtros con las colonias crecidas se colocaron, uno tras otro, sobre 4-5 piezas de papel Whatman 3MM saturadas con una solución de SDS al 10 % durante 3 min. Posteriormente, cada filtro se pasó a un segundo grupo de piezas de papel saturadas con una solución de desnaturalización compuesta por NaOH 0'5 N y NaCl 1'5 M, durante 5 min. A continuación, cada filtro se pasó, durante otros 5 min al tercer grupo de piezas de papel que estaba saturado con una solución de neutralización compuesta por NaCl 1'5 M, y TrisCl 1'5 M pH 7'4. Finalmente, cada filtro se colocó, otros 5 min, sobre un cuarto grupo de piezas de papel saturadas en este caso con 2 x SSC. Finalmente, cada filtro se secó sobre papel Whatman 3MM y, colocado entre dos piezas de papel de filtro, se coció, en vacío, a 120 °C durante 1 h. Los filtros quedan así preparados para ser sometidos a hibridación con la sonda adecuada y posterior revelado de la forma que se ha descrito en el apartado 13.3.

3.11. Preparación de clones de secuenciación

Para la obtención de clones de secuenciación se siguieron distintas estrategias. Siempre que fue posible, y una vez construidos mapas de restricción de los fragmentos originales de ADN, se prepararon clones de secuenciación mediante subclonación de los mismos en vectores como pUC18 o pBSKS(+). Alternativamente, los clones de secuenciación se obtuvieron a partir del fragmento original de ADN mediante la generación de deleciones unidireccionales seriadas, originalmente descrita por Hennikoff (1984), técnica basada en el empleo coordinado de exonucleasa III y nucleasa S1. Para ello se empleó el sistema comercial Erase-a-Base System (Promega) siguiendo las recomendaciones de los proveedores.

En esencia, los fragmentos de ADN (5-10 μ g) se sometieron a digestión con dos restrictasas, de manera que una de ellas deje extremos 5' cohesivos susceptibles de ser atacados por la exonucleasa III, y la otra enzima de restricción deja extremos 3' que sirvieron de extremo para proteger de la actuación de la exonucleasa III .

Los ADNs así digeridos se trataron con fenol-cloroformo, se precipitaron mediante adición de 0'1 volumen de NaCl 2 M y 2 volúmenes de etanol absoluto, se secaron al vacío y, finalmente, se resuspendieron en un volumen apropiado de tampón específico de exonucleasa III. La reacción de deleción se llevó a cabo a 30 °C y se inició con la adición de 3 μ l (aprox. 525 unidades) de exonucleasa III, condiciones tales en las que la exonucleasa es capaz de deleccionar aprox. 200

nucleótidos/min. Después de agitar suavemente se empezó a contar el tiempo, tomándose alícuotas de 2'5 μ l cada 1 min, dejando pasar 1 min hasta recoger la primera muestra. Las alícuotas se recogieron en microtubos preenfriados en hielo que contenían 7'5 μ l de mezcla de nucleasa S1 (172 μ l de H₂O, 27 μ l de tampón S1 7'4x y 60 unidades de nucleasa S1). Una vez tomadas las alícuotas, cuyo número varió según el tamaño del fragmento a delecionar, los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min, transcurrido el cual se inactivó la nucleasa mediante la adición a cada tubo de 1 μ l de una solución que contiene Tris 0'3 M, EDTANa₂ 0'05 M, e incubando a 70 °C durante 10 min.

Para comprobar el correcto avance de las delecciones, se preparó un gel de agarosa al 0'7%, se tomó una alícuota de cada tiempo y, después de la electroforesis correspondiente, se observó la disminución progresiva del tamaño molecular del ADN original. Realizada la comprobación, a cada tubo se adicionó 1 μ l de mezcla Klenow (3-5 unidades de enzima en 30 μ l de tampón específico) y se incubó a 37 °C durante 3 min. Posteriormente, a cada tubo se adicionó 1 μ l de mezcla de dNTPs (0'125 mM de cada dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y se incubó 5 min a 37 °C. Finalmente, cada tubo se suplementó con 40 μ l de mezcla de ligación (790 μ l de agua desionizada, 100 μ l de tampón de ligación 10x, 100 μ l de PEG al 50%, 10 μ l de DTT 100 mM y 5 unidades de ADN ligasa del fago T4), se mezcló y se incubó, al menos, 1 hora a temperatura ambiente.

La mezcla obtenida se empleó para transformar 200 μ l de células competentes de *E. coli* DH5a como se indica en el apartado 3.8 de Material y Métodos, excepto que sólo se adicionaron 200 μ l de medio LB. La selección de transformantes se efectuó sembrando toda la mezcla de transformación sobre placas conteniendo medio LB adicionadas de los antibióticos adecuados. De cada uno de los tiempos de delección se eligieron al azar, al menos, 5 clones en los que se comprobó el tamaño de la delección producida, mediante digestión con las endonucleasas adecuadas.

3.12. Purificación de ADN para secuenciación

Se realizó utilizando los productos comerciales Wizard Minipreps^R (Promega) y Quiaprep Spin Plasmid (Quiagen Inc.) de la manera que se indica a continuación.

3.12.1. Qiaprep Spin Plasmid

A partir de un cultivo líquido de 1-5 ml de *E. coli*, las células se precipitaron, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 250 μ l del denominado tampón P1 previamente adicionado de RNasa A. Posteriormente, se adicionaron 250 μ l del tampón P2, mezclando suavemente mediante inversión del tubo. P2 es un tampón de lisis, y se recomienda mantener la reacción 5 min como máximo. A la mezcla anterior se adicionó 350 μ l de tampón N3, se mezcló por inversión y se centrifugó (12.000 rpm) hasta la formación de un precipitado compacto (aprox. 10 min). Se recogió el sobrenadante y se aplicó a una columna Qiaprep que se centrifugó durante 1 min para retener el ADN plasmídico. A la columna se adicionaron 750 μ l de tampón PE y se centrifugó 1 min a 12.000 rpm, repitiéndose de nuevo esta operación para eliminar el exceso de tampón. Finalmente, la columna se colocó en un tubo de 1'5 ml, se le adicionaron 50 μ l de agua bidestilada estéril, y pasado 1 min se centrifugó (12.000 rpm, 1 min) para recuperar el ADN (aproximadamente 25 μ g).

3.12.2. Wizard Minipreps®

El precipitado obtenido de la centrifugación de 1-3 ml de cultivo líquido de *E. coli* se resuspendió en 200 μ l de tampón de resuspensión mediante agitación con vórtex y se le adicionaron otros 200 μ l de solución de lisis compuesta por NaOH 0'8% y SDS 1%. La mezcla se agitó por inversión manual del tubo, se adicionaron 200 μ l de solución de neutralización y se agitó de nuevo por inversión. El lisado obtenido se centrifugó (12.000 rpm, 5 min) y el sobrenadante obtenido se recogió en un tubo nuevo al que se le adicionó 1 ml de resina, mezclando bien por inversión. Esta mezcla se cargó en el barril de una jeringa de 3 ml que había sido previamente acoplada a una minicolumna por la que, lentamente, se hizo pasar la mezcla mediante presión con el émbolo de la jeringa. Posteriormente, se lavó la minicolumna con una solución de lavado adicionada de etanol (50%). El líquido residual que pudiese quedar en la columna se extrajo mediante centrifugación (12.000 rpm, 1 min). A la columna se adicionaron 50 μ l de agua bidestilada estéril, permitiendo que la resina se empapase durante 1 min. Finalmente, se eluyó el ADN mediante centrifugación (12.000 rpm, 1 min). Con este procedimiento se puede obtener aproximadamente 25 μ g de ADN.

3.13. Secuenciación de ADN de doble cadena

3.13.1. Secuenciación manual

3.13.1.1. Preparación y marcaje del ADN

La secuenciación de ADN se llevó a cabo por el método de terminación de cadena con dideoxinucleótidos (Sanger et al., 1977), siguiendo básicamente la técnica descrita por Hattori y Sakaki (1986) para la secuenciación de plásmidos. Se utilizó la versión 2.0 del producto comercial Sequenasa^R (USB), que emplea ADN polimerasa del bacteriófago T7 manipulada, que carece de actividad 3'-5' exonucleasa (Tabor y Richardson 1987).

El ADN plasmídico se sometió primero a desnaturalización alcalina. Para ello, a 18 μ l de solución de ADN (aprox. 2 μ g) se le adicionaron 2 μ l de NaOH 2 N y, después de mezclar, se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente se adicionaron 2 μ l de acetato amónico 5 M, pH 4.5 y 66 μ l de etanol absoluto (-80 °C, 10 min), se centrifugó (12.000 rpm, 15 min) y el precipitado se lavó con etanol al 70%. Después de centrifugar y eliminar el sobrenadante, el ADN se secó al vacío.

Para la reacción de unión al cebador, el ADN desnaturalizado y seco se resuspendió en una mezcla compuesta por 2 μ l de tampón de secuenciación 5x, 1 μ l de cebador (0.5 pmol/1 μ l) y 7 μ l de agua bidestilada, se incubó a 65 °C durante 2 min y se enfrió a 35 °C.

El marcaje se efectuó añadiendo a la mezcla anterior 1 μ l de DTT (0.1 M), 2 μ l de mezcla de marcado diluída (dGTP, dCTP, dTTP, 0.75 mM), 0.5 μ l de ³⁵S-dATP (5 mCi, >1.000 Ci/mmol) (Amersham) y 2 μ l de una mezcla que contiene tampón específico para la sequenasa (6.5 μ l), sequenasa (1 μ l, 13 unidades/ μ l) e incubando a 20 °C durante 5 min. La reacción de terminación se llevó a cabo tomando alícuotas de 3.5 μ l de las reacciones de marcaje que se adicionaron, cada una, a 4 tubos precalentados a 37 °C, que contenían 2.5 μ l de cada una de las mezclas de terminación (A, C, G y T), y continuando la incubación 5 min a 37 °C. Por último, a cada tubo se adicionó 4 μ l de una solución (solución de parada) compuesta por formamida 95%, azul de bromofenol 0.1%, y xilenocianol 0.1%.

3.13.1.2. Resolución de compresiones

Para los casos en donde aparecieron zonas confusas o comprimidas debido a la conformación secundaria del ADN, se emplearon modificaciones del método general descrito consistentes en el empleo de dITP o dGTP como mezcla de marcaje o dNTP. Cuando los métodos anteriores no dieron resultado, se empleó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el ADN a secuenciar. En este caso, la desnaturalización por sosa se sustituyó por desnaturalización a 95° C, seguida de ciclos de unión de cebador y elongación, para lo cual se sustituyó la ADN polimerasa del bacteriófago T7 por Taq-polimerasa que no pierde su funcionalidad a altas temperaturas. Se y según indicaciones del kit de Fentomol^R (Promega).

3.13.1.3. Resolución de los oligonucleótidos generados tras las reacciones de secuenciación

Las muestras obtenidas tras las reacciones de secuenciación se analizaron mediante electroforesis en geles verticales de poliacrilamida. Los geles se preparan sobre placas (21 x 40 cm o 38 x 52,5 cm; separadores de 0'4 o 0'2 mm Sequi-Gen (Biorad). Una de las placas se trató, cada 3-4 veces de uso, con PLOT concentrate (Serva) diluído en acetona, para facilitar la posterior separación del gel. Los geles se prepararon al 6% de acrilamida (acrilamida:bisacrilamida, 19:1) en tampón TBE conteniendo urea 7 M. La acrilamida se filtró a través de unidades tipo SCN (Nalgene), y se polimerizó con persulfato amónico (10% en agua bidestilada) y N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED) 6 mM. El borde superior del gel se definió introduciendo un peine de diente de tiburón. 2 μ l de las muestras desnaturalizadas por calor (95 °C, 3 min), se cargaron entre los espacios definidos por dos dientes consecutivos. La electroforesis se llevó a cabo sobre geles precalentados a 50 °C en un aparato Sequi-gen (Biorad), durante 1 h 30 min a 1.700 V (gel de 21 x 40 cm) y 2 h 15 min a 1.900 V (gel de 38 x 52,5 cm). El tampón de electroforesis fue siempre TBE.

3.13.1.4. Tratamiento del gel y exposición

Terminada la electroforesis, el gel se lavó con una solución de H₂O:metanol:ácido acético (80:15:5) durante varios minutos, se colocó sobre un papel Whatman 3MM, se cubrió con papel celofán y se secó al vacío a 80 °C

durante 1 h. Para visualizar los resultados, el gel se puso en contacto, a temperatura ambiente, con película de autorradiografía (HyperfilmTM b-Max, Amersham) entre dos días y una semana. Para el revelado de las películas autorradigráficas se procedió como se indica en el apartado 3.5.2

3.13.2. Secuenciación automática

Se llevó a cabo en un secuenciador automático Applied Biosystem (Perkin Elmer), modelo 373 Stretch, con la asistencia de A. Lario (Servicio de Secuenciación del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC, Granada). Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo mediante en un termociclador Perkin Elmer 9.600, utilizando el producto comercial Abi Prism (Perkin-Elmer) y la polimerasa Amplitaq FS. La determinación de la secuencia se realizó mediante el sistema de terminadores marcados con fluorocromos. Al ADN a secuenciar (0'6-1 μ g) se le adicionó el primer específico y agua bidestilada hasta un volumen final de 12 μ l.

En todos los casos se han secuenciado las dos cadenas de ADN. Los cebadores empleados han sido los denominados cebador universal y reverso, correspondientes a las secuencias del fago M13 (-40) 5'-GTTTCCAGTCACGAC-3', y (-20) 5'-AACAGCTATGAC-CATG-3', respectivamente, presentes en los vectores pUC18 y pBSKS(+).

Tanto en caso de encontrarse inespecificidades en la secuencia como en ausencia de solapamiento entre el ADN de clones consecutivos de secuenciación, se diseñaron cebadores específicos para cubrir las discontinuidades en la secuencia. Se empleó el programa Oligo 4-s para comprobar la calidad del oligonucleótido diseñado. Los oligonucleótidos, en concentración 50 μ M, se sintetizaron mediante el método químico que emplea b-cianoetil N,N-diisopropil fosforamidita en un aparato OLigo 1000 DNA Synthesizer (Beckman). La síntesis de oligonucleótidos la ha llevado a cabo A. Mérida (Servicio de Síntesis de Oligonucleótidos, Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC, Granada).

3.14. Análisis informático de secuencias de ADN y proteínas

Los análisis previos de las secuencias de ADN obtenidas, búsqueda de sitios de restricción, localización de posibles marcos abiertos de lectura (ORFs), etc., se realizaron con las versiones 3.0 y 4.0 de los programas Genepro (Riverside

Scientific, Washington, Seattle, USA), DNA Strider y GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, USA). También se utilizaron determinados programas del paquete GCG, tales como Fasta (Pearson y Lipman, 1988) y Blast (Altschul et al. 1990), para la búsqueda de homologías en las secuencias de ADN y proteínas; Bestfit (Smith and Waterman, 1981) que predice el mejor alineamiento entre dos secuencias, su similitud y su homología; Pileup, que produce alineamientos entre más de dos secuencias; Clustal V, que, además de producir los alineamientos entre varias secuencias, muestra las zonas de homología y de similitud; Motifs, que busca la presencia de determinados motivos del diccionario Prosite presentes en una secuencia de proteína; Repeat y Stemloop, que localizan la presencia de repeticiones directas o invertidas, respectivamente, y Peptidestructure, que indica diversos aspectos de la estructura de secuencias polipeptídicas; Fetch, que permite obtener secuencias de las bases de datos. Los bancos de datos consultados fueron EMBL, Genbank, Swisprot y Pir.

3.15. Mutagénesis dirigida de *Bradyrhizobium japonicum* USDA110: Selección y caracterización de transconjugantes deficientes en la utilización microaeróbica de nitrato

La mutagénesis se llevó a cabo por transferencia, mediante conjugación simple, del plásmido pML122W, portador del gen de resistencia a Spc/Sm, desde la cepa donadora *E. coli* S17.1 a la receptora *B. japonicum* USDA 110. Para ello, a partir de cultivos de la cepa donadora en fase logarítmica de crecimiento y de la cepa receptora en fase exponencial tardía, donador y receptor se centrifugaron en un tubo de microfuga (12.000 rpm, 2 min), se eliminó el sobrenadante, y el sedimento se resuspendió en 100 ml de PSY. Las mezclas se depositaron sobre filtros Millipore estériles de 0'45 μ m de poro y 25 mm de diámetro, previamente colocados sobre placas que contenían medio PSY. Tras incubación durante 48 h a 28 °C, las mezclas de conjugación se resuspendieron en 200 μ l de medio PSY que se sembraron en placas con medio PSY modificado, en donde la peptona y el extracto de levadura se sustituyeron por glutamato (10 mM) como fuente de nitrógeno y manitol (1 g/l), como fuente de carbono. Los transconjugantes se seleccionaron en base a su resistencia a Sm y Spc y sensibilidad a Tc.

De los transconjugantes obtenidos se realizaron dos réplicas, mediante el sistema de picadura, en placas con medio PSY modificado que contenía manitol

(1 g/l) como fuente de carbono y KNO_3 (10 mM) como única fuente de nitrógeno y energía. Una de la réplicas se cultivó en condiciones aeróbicas, mientras que la segunda se incubó en condiciones anaeróbicas durante 30 días. Para ello, las placas se colocaron en campanas de microaerobiosis de cierre hermético (GasPak, BBL) provistas de un paquete de anaerocult A (Merck), que adicionado de 10 ml de agua produce un ambiente anaerobio de CO_2 . La anaerobiosis se detectó mediante tiras indicadoras de anaerobiosis (Anaerotest, Merck) dispuestas en el interior de las campanas que viran de azul a blanco.

Se seleccionaron aquellos transconjugantes capaces de crecer en condiciones aeróbicas e incapaces de crecer en condiciones microaeróbicas con KNO_3 como única fuente de nitrógeno. La presencia de la mutación correspondiente a estos transconjugantes se confirmó mediante hibridación con las sondas apropiadas.

4. PURIFICACION DE LA ENZIMA MONOXIDO DE CARBONO DESHIDROGENASA DE *B. JAPONICUM*

4.1. Crecimiento celular

Las células se cultivaron en un fermentador Biostat U50 (Braun Diessel Biotech) herméticamente cerrado que contenía 50 l de medio PSY (pH 7'0). El medio se gaseó de forma continua con una mezcla de 85% aire, 5% CO_2 y 10% CO , y las células se incubaron a 30 °C, en agitación (200 rpm). La inoculación del fermentador se llevó a cabo con 1 l de cultivo en fase logarítmica tardía de *B. japonicum* USDA 110*spc4* cultivado en medio PSY. El cultivo se mantuvo hasta alcanzar la fase de crecimiento estacionario, tomándose alícuotas a intervalos regulares de tiempo.

4.2. Obtención de extractos libres de células

Las células se recogieron mediante centrifugación (8.000 rpm, 10 min, 4 °C), se resuspendieron en 150 ml de tampón KH_2PO_4 -NaOH (pH 7'2) adicionado de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, 0'2 mM) y algunos cristales de DNAasa y se rompieron en un homogeneizador de alta presión (Rannie AS) funcionando a una presión constante de 700 bares. Después de centrifugar (8.000 rpm, 30 min, 4 °C), a partir del sobrenadante se separaron citosol y membranas mediante

ultracentrifugación (250.000 x g, 1 h, 4 °C). Del citosol obtenido (aproximadamente 200 ml) se eliminó el ADN mediante adición, gota a gota y en continua agitación, de una solución de sulfato de protamina (5 mg/g de células). Posteriormente, se ajustó el pH a 7'2 y se dejó en agitación durante al menos 15 min. Finalmente, se centrifugó (5000 rpm, 30 min, 4 °C) para recuperar el sobrenadante.

4.3. Cromatografía de intercambio aniónico

Se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC, Knauer), utilizando una columna Accell QHA (Pharmacia). La columna se lavó con dos volúmenes (400 ml) de tampón KH_2PO_4 50 mM, pH 7'2, ajustado con NaOH (tampón KH_2PO_4 -NaOH). La elución de las proteínas retenidas en la columna se llevó a cabo haciendo pasar a su través 200 ml de un gradiente de KCl (50-1000 mM) preparado en tampón H_2PO_4 -NaOH. Se recogieron fracciones de 20 ml a un flujo de 20 ml/min. En cada fracción se registró el espectro UV-visible (350-700 nm) y se determinó la concentración de proteína mediante la medida de absorbancia a 280 nm.

4.4. Cromatografía de interacción hidrofóbica

Las fracciones obtenidas que presentaban un espectro característico de molibdohidrolasa se mezclaron (350-400 ml) y se concentraron mediante ultrafiltración a través de membranas PM10 (Amicon) hasta un volumen de 50 ml, al que se adicionó, gota a gota y en agitación continua, 21'4 ml de una solución 4 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ preparada en tampón H_2PO_4 -NaOH, pH 7'2. De esta manera, la concentración final de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ es de 1'2 M. Después de mantener la agitación durante 15 min, se centrifugó (8.000 rpm, 10 min, 4 °C) a baja velocidad para eliminar posibles precipitados.

La muestra de proteína así preparada se aplicó a una columna de cristal (9 cm x 5 cm, Pharmacia) rellena con 50 ml de 15ISO (Pharmacia) que había sido lavada abundantemente con tampón H_2PO_4 -NaOH (pH 7'2) y, finalmente, equilibrada con tampón H_2PO_4 -NaOH (pH 7'2), suplementado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1'2 M. Después de aplicar la muestra, la proteína se eluyó aplicando un gradiente de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1'2 M a 0 M) preparado en tampón H_2PO_4 -NaOH pH 7'2, a un flujo de 3 ml/min. En las fracciones recogidas (3 ml/tubo) se analizó la concentración de proteína y se registró el espectro de absorción UV-visible

(350-700 nm), seleccionándose aquellas que presentaban el espectro de absorción típico de molibdohidrolasas.

Las muestras seleccionadas (30 ml) se concentraron mediante ultrafiltración (2'5 ml) y se pasaron a través de una columna PD10 (Sephadex G25M, Pharmacia) previamente equilibrada con tampón Hepes 50 mM, NaCl 150 mM, pH7'2. La proteína retenida se eluyó con 3'5 ml de este nuevo tampón.

4.5. Cromatografía de exclusión molecular

Se empleó una columna de vidrio (2'6 cm x 100 cm, Pharmacia) rellena de Sephacryl HR-S300 y equilibrada con tampón Hepes 50 mM/NaCl 150 mM, (pH 7'2). Después de aplicar la muestra (3'5 ml), la elución de la proteína se llevó a cabo haciendo pasar 2 volúmenes del tampón indicado a un flujo de 1 ml/min. Se recogieron fracciones de 2'5 ml que, seleccionadas en base a su concentración de proteína (A₂₈₀) y espectro de absorción UV-visible (350-700 nm) característico de molibdohidrolasas, se mezclaron (25 ml) y se concentraron mediante ultrafiltración hasta un volumen final de aproximadamente 10 ml (3'2 mg de proteína/ml). La enzima se conservó a -20 °C después de congelada, gota a gota, en nitrógeno líquido.

5. CARACTERIZACION DE LA ENZIMA MONOXIDO DE CARBONO ODESHIDROGENASA DE *B. JAPONICUM*

5.1. Tamaño molecular relativo

Durante el proceso de purificación de la enzima CODH, su grado de purificación se comprobó, de forma rutinaria, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida empleando el sistema de Laemmli (1970) (Apartado 2.4). El tamaño molecular relativo (Mr) de la enzima purificada se determinó según su movilidad relativa (Rf) en dichos geles después de la electroforesis y revelado de la proteína, como se indica en los Apartados 2.3.2 y 2.4.

5.2. Espectro de absorción UV-visible

Durante todo el proceso de purificación, el registro de los espectros de absorción UV-visible de la enzima CODH se llevó a cabo a temperatura

ambiente en un espectrofotómetro Konitron provisto de ordenador para el registro, manejo y archivo de datos. Se utilizaron cubetas de cuarzo de 1 cm de diámetro y se empleó, como referencia, el tampón en que, en cada caso, estaba resuspendida la enzima. La longitud de onda varió entre 220 y 700 nm.

5.3. Composición en subunidades

La determinación de los posibles polipéptidos componentes de la enzima CODH se realizó sometiendo la enzima purificada a electroforesis desnaturalizante (Laemmli, 1970). La concentración de acrilamida fue del 12% para el gel de resolución y del 7.5% para el gel de empaquetado, ambos adicionados de SDS al 2.5% (p/v), pH 8.8. Como tampón de desarrollo se empleó Tris-glicina que contenía SDS al 0.1%. Las muestras se prepararon adicionándoles un 25% de su volumen de tampón de carga (Tris-HCl 125 mM, SDS al 0.6% (p/v), sacarosa al 10% (p/v), DTT al 5% (v/v) y azul de bromofenol al 0.02% (p/v), pH 6.8. Las muestras así preparadas se sumergieron en agua hirviendo durante 5 min para conseguir la desnaturalización de las proteínas. Como proteínas patrón de Mr conocido se emplearon los marcadores LMWD (Pharmacia): fosforilasa b, 94 kDa; albúmina, 7 kDa; ovoalbúmina, 43 kDa; anhidrasa carbónica, 30 kDa; inhibidor de tripsina, 20.1 kDa y lactoalbúmina, 14.4 kDa. La preparación de las proteínas patrón para electroforesis se realizó según instrucciones del proveedor. El cálculo del Mr se basó en las rectas de calibrado construidas representando en el eje de ordenadas el logaritmo decimal del Mr de las proteínas patrón y, en el eje de abscisas, el valor correspondiente de Rf.

5.5. Hibridación de la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa con anticuerpos policlonales

Se ha determinado la posible reacción cruzada entre las subunidades que componen la enzima CODH y los anticuerpos desarrollados contra la proteína CoxL (subunidad estructural de mayor tamaño) de *O. carboxydovorans* OM5 (amablemente proporcionados por O. Meyer, Departamento de Microbiología, Universidad de Bayreuth, Alemania), como se describe a continuación.

5.5.1. Trasferencia electroforética de las subunidades de la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa a membranas de polivinilideno

La transferencia de las subunidades, previamente separadas mediante electroforesis en geles desnaturalizantes, a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF, Biorad), se realizó según la técnica de Westermeier et al. (1988). Antes de su uso, la membrana se sumergió en metanol unos segundos, y se lavó durante 5 min en agua destilada. Seguidamente, tanto el gel como la membrana se sumergieron en tampón de ánodo II (25 mM Tris, 20% metanol) durante 10 min. A continuación, se formó una unidad de transferencia compuesta por 6 capas de papel de filtro empapadas en tampón de ánodo I (300 mM Tris, 20% metanol), la membrana, el gel de poliacrilamida y otras 12 capas de papel de filtro empapadas en tampón de cátodo (ácido e-caprónico 40 mM, SDS 0'01%, metanol 20%). La unidad de transferencia se colocó sobre una cubeta horizontal (Multiphor II, Pharmacia) equipada con dos placas de grafito (NovaBlot, Pharmacia). La transferencia se llevó a cabo durante 90 min aplicando una corriente de 0'8 mA/cm² de gel.

5.5.2. Detección de complejos antígeno-anticuerpo

Se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Jacobitz et al. (1989). Después de la electroforesis y transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF, la misma se saturó en tampón AP-T (100mM Tris/ClH, 100 mM NaCl, 25mM MgCl₂, pH7'4) mediante inmersión durante 1-2 h. Pasado este tiempo, la membrana se incubó durante otras 2 h en una dilución 1:1000 de suero anti-CoxL de *O. carboxydovorans* en tampón AP-T (pH 7'4). Posteriormente, la membrana se lavó 4 veces durante cinco minutos con AP-T (pH 7'4) y se incubó durante 1 h con anti-inmunoglobulina de conejo conjugada a peroxidasa y diluida 1:1000. La membrana se lavó de nuevo otras 4 veces, durante 5 min, con tampón AP-T (pH 7'4) y, finalmente, se equilibró en tampón AP-T (pH 9'5).

La presencia de complejos antígeno-anticuerpo se detectó incubando la membrana en una solución formada por tampón AP-T (pH 9'5) adicionada de 270 μ l de mezcla NBT (22'5 mg de azul de nitro tetrazolio, 210 ml de dimetilformamida al 70%, 90 ml de AP-T, pH 9'5) y 210 μ l de mezcla BCIP (12'5 mg de 5-bromo-4-cloro-indolil fosfato en 250 ml de dimetilformamida)

hasta la aparición de señales de reacción cruzada con los anticuerpos. La reacción se detuvo sumergiendo la membrana en agua destilada.

5.6. Contenido en metales

El análisis del contenido en metales, Mo, Fe y W, se llevó a cabo mediante espectrometría de emisión de plasma (ICP-MS) empleando 0'628 mg de proteína purificada en 10 ml de tampón HEPES 20 mM (pH 7'0). Como control se empleó sólo tampón HEPES 20 mM (pH 7'0). El cálculo del contenido en metales de la enzima se realizó en base a la composición y configuración de las subunidades componentes de la enzima después de su electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida.

5.7. Determinación de cofactores

5.7.1. Cuantificación de flavinas

La extracción y cuantificación de flavinas se llevó a cabo de la forma descrita por Meyer (1982). Para ello, se mezclaron 0'5 ml de proteína purificada (1'6 mg) con 0'5 ml de ácido tricloroacético al 10% en agua. Las dos soluciones se mezclaron en vórtex y se incubaron en hielo, durante 20 min, protegiéndolas de la luz. Pasado este tiempo se adicionaron 0'5 ml de una solución 2'4 M de K_2HPO_4 y se centrifugó (13.000 rpm, 10 min). La proteína degradada queda en el precipitado mientras que en el sobrenadante, de color amarillo, se encuentran las flavinas. El espectro de absorción de luz visible (A_{450}) de las flavinas liberadas se registró antes y después de la adición de ditionito sódico, y su cuantificación se determinó mediante la sustracción de los valores de absorción a 450 nm de la forma oxidada y de la forma reducida, considerando un coeficiente de extinción $\epsilon = 10^5 \text{ cm}^{-1}/\mu\text{mol}$ (Waud et al. 1975).

5.7.2. Cuantificación de pterinas

Para la extracción y determinación de pterina se siguió el protocolo descrito por Mayer (1982). La proteína purificada (2'5 ml, 6 mg) se desnaturizó mediante ebullición hasta la aparición de color amarillo (1 min como máximo) en presencia de de iodoacetamida (54 mM, p/v), 300 μl de SDS al 10% y 300 μl de ditionito sódico 55 mM. La preparación y mezcla de los

productos utilizados se llevó a cabo en estricta microaerobiosis. Posteriormente, la solución se incubó en oscuridad durante, al menos, 10 h. Pasado este tiempo, a la mezcla se adicionó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 40% hasta un volumen final de 18 ml, se recogieron fracciones de 1'5 ml y se centrifugaron (12.000 rpm, 5 min) para precipitar la proteína. El sobrenadante obtenido se pasó a través de una columna para retener las pterinas. A continuación se eluyeron de la columna adicionando 10 ml de agua destilada, se desecaron mediante rotoevaporación y, finalmente, se resuspendieron en un volumen final de 2 ml de agua bidestilada.

La determinación de pterinas se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Se emplearon alícuotas de 200 μl que se inyectaron en una columna de fase reversa (ET 25014 Nucleosil 120-7 C₁₈) y se eluyeron con tampón acetato amónico 100 mM (pH 4'5) a un flujo de 1 ml/min. La fracción que contenía las pterinas se determinó tanto en base al tiempo de elución característico de las mismas (tiempo) como mediante el registro del espectro de absorción correspondiente. Puesto que los índices de extinción y espectros de absorción típicos de cada tipo de pterina están referidos a pH 7, la fracción conteniendo las pterinas se ajustó a ese pH adicionando NaOH 0'1 M. Durante este proceso debe tenerse en cuenta que un pH superior al neutro en dos décimas destruye las pterinas.

5.7.3. Análisis parcial de las secuencias de aminoácidos del extremo N-terminal de las subunidades de la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa

Para la secuenciación de aminoácidos del extremo N-terminal de los polipéptidos componentes de la enzima CODH, los pasos previos de electroforesis de la proteína en geles desnaturalizantes y transferencia de las subunidades protéicas a filtros de PVDF se realizaron de la forma descrita en los Apartados 5.3 y 5.5.1, respectivamente, con la única excepción de que el tampón de electroforesis se suplementó con ácido tioglicólico 0'1 mM para eliminar los posibles radicales que puedan permanecer libres.

La proteína presente en la membrana se tiñó mediante inmersión durante 2 min en una solución de negro amido 10B al 0'1% en metanol:ácido acético:agua (45:10:45). La membrana se lavó repetidas veces con metanol/ácido acético/agua (45:10:45), hasta quedar libre de fondo. Cuando fue

necesario, la membrana se mantuvo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una bolsa de plástico gaseada con nitrógeno.

Las bandas teñidas se cortaron de la membrana y se introdujeron en un secuenciador Applied Biosystem modelo 473A. La secuenciación se llevó a cabo por el método de degradación de Edman y Begg (1967), identificándose los derivados de feniltiohidantoína mediante un equipo de cromatografía asociado al secuenciador de la manera descrita por Löw et al. (1993). La secuenciación ha sido realizada por el Dr. H.G. Faulhammer (Departamento de Bioquímica, Universidad de Bayreuth, Alemania).

RESULTADOS Y DISCUSION

1. CARACTERIZACION DE LA CEPA MUTANTE GRF3 DE *B. JAPONICUM*

1.1. Clonación del ADN mutado de GRF3.

Bradyrhizobium japonicum GRF3 es una cepa derivada de PJ17 obtenida mediante inserción del transposón Tn5. GRF3 se caracteriza por su incapacidad para crecer microaeróbicamente con nitrato como única fuente de nitrógeno y presenta una banda única de hibridación con Tn5 correspondiente a un fragmento *Eco* RI de aproximadamente 15 kb (Fernández-López et al. 1994).

El fragmento *Eco* RI de 15 kb de GRF3 se clonó en el sitio correspondiente *Eco* RI del vector pUC18, dando lugar al plásmido pGRF3 (Figura 1.1). La digestión de pGRF3 con distintas enzimas de restricción permitió elaborar su mapa de restricción (Figura 1.1), en el que se puede observar la presencia del vector pJQ18 y la existencia de un único extremo *Eco* RI correspondiente a ADN de *B. japonicum*. La integración del vector (que posee un sitio *Eco* RI) junto con el transposón Tn5 implica la formación de un fragmento *Eco* RI en el que un extremo corresponde a secuencia de *B. japonicum*, mientras que el otro sitio *Eco* RI correspondería al vector pJQ18. Aunque la cointegración del transposón y de su vector en el genoma de la cepa que se desea mutar no es un fenómeno frecuente, tal fenómeno ocurrió en el caso de la cepa GRF3.

1.2. Detección del ADN silvestre correspondiente al ADN mutado en la cepa mutante GRF3

Para identificar el ADN homólogo al ADN mutado en la cepa GRF3, el fragmento *Eco* RI/*Hpa* I de 1'9 kb (Figura 1.1) se empleó como sonda para llevar a cabo la búsqueda, mediante hibridación en colonia, de posibles cósmidos recombinantes en un banco de genes de *B. japonicum* USDA 110. El banco de genes utilizado está construido a partir de la digestión con *Sau* 3A del ADN genómico de *B. japonicum* USDA110, posterior clonación en el sitio *Bam* HI del vector pLAFR3 y transfección de *Escherichia coli* HB101 (amablemente proporcionado por G. Stacey, Department of , University of Tennessee, USA).

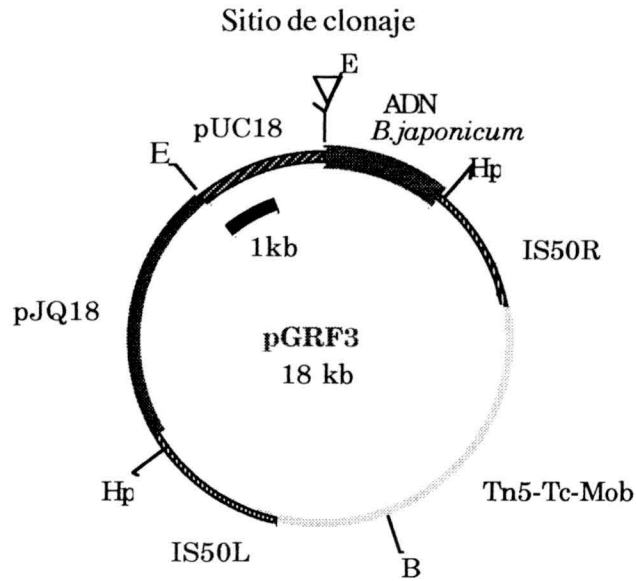


Figura 1.1. Esquema representativo del plásmido pGRF3

El plásmido pGRF3 (18 kb) está formado por el vector de clonación pUC18, y el fragmento Eco RI de 15 kb que hibrida con Tn5. De estas 15 kb sólo unas 1'7 kb corresponden a ADN de *B. japonicum*. E, *Eco* RI; B, *Bam* HI; Hp, *Hpa* I.

Para comprobar que la sonda contenía ADN de *B. japonicum* se realizó una hibridación de la misma con ADN total de *B. japonicum* PJ17 digerido con *Eco* RI. Se detectó una única señal de hibridación en la cepa parental de alrededor de 1'7 kb (Figura 1.2). Sin embargo, se observaron dos bandas en la cepa GRF3, una debida a la presencia de ADN homólogo y otra correspondiente a Tn5, ya que la sonda contiene 187 pb de Tn5, concretamente, desde el sitio *Hpa* I hasta el final de la secuencia de inserción IS50R (Figura 1.1).

El empleo del fragmento *Eco* RI/*Hpa* I (Figura 1.1) como sonda de hibridación permitió la identificación de una única colonia que presentó señal de hibridación con la sonda. De dicha colonia se aisló un único cósmido de 40 kb de tamaño, que se denominó pML1. La hibridación del ADN del cósmido pML1 con la sonda *Hpa* I/*Eco* RI se muestra en la figura 1.3.

La digestión de pML1 con diferentes endonucleasas de restricción, y la hibridación de los fragmentos resultantes con la sonda *Eco* RI/*Hpa* I permitió identificar un fragmento *Hind* III de 9'3 kb con una única señal de hibridación (Figura 1.4). La clonación de este fragmento *Hind* III en el vector de clonación pUC18 dió lugar al plásmido pML12 (Figura 1.5). El tratamiento, a su vez, de pML12 con distintas enzimas de restricción e hibridación con la sonda *Hpa* I

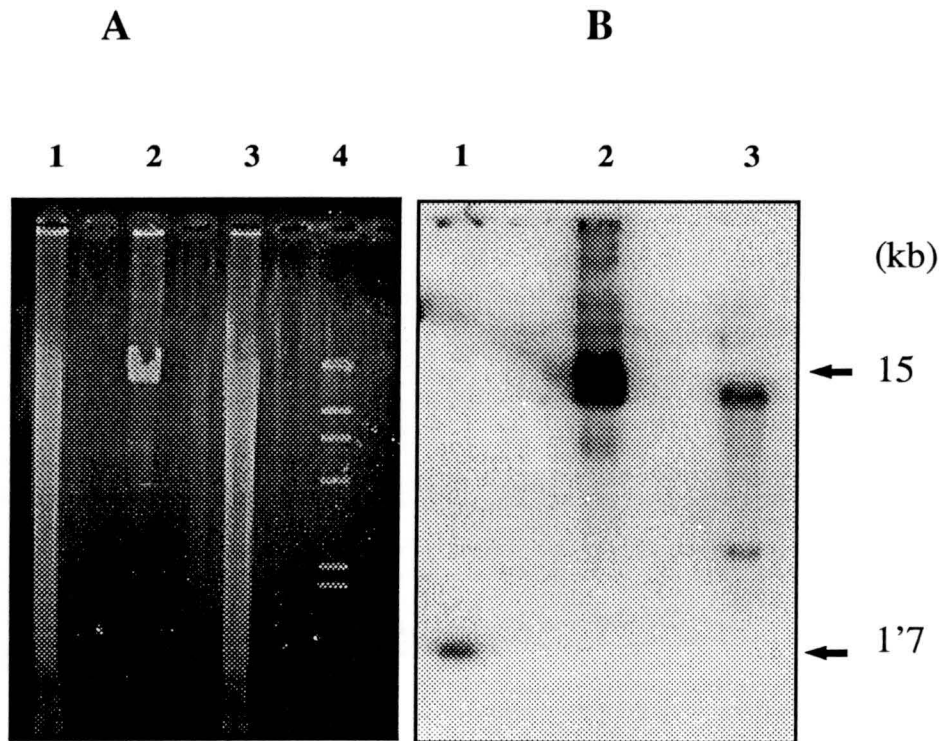


Figura 1.2. Hibridación del ADN genómico de *B. japonicum* con la sonda Hpa I/ Eco RI.
A. Electroforesis en gel de agarosa de ADN de PJ17 (carril 1), y GRF3 (carril 3) digerido con *Eco* RI, y pJQ18 digerido con *Eco* RI (carril 2), ADN del fago λ digerido con *Hind* III (carril 4).
B. Resultado después de la hibridación con la sonda Hpa I/ Eco RI de 1'7 kb de pGRF3.

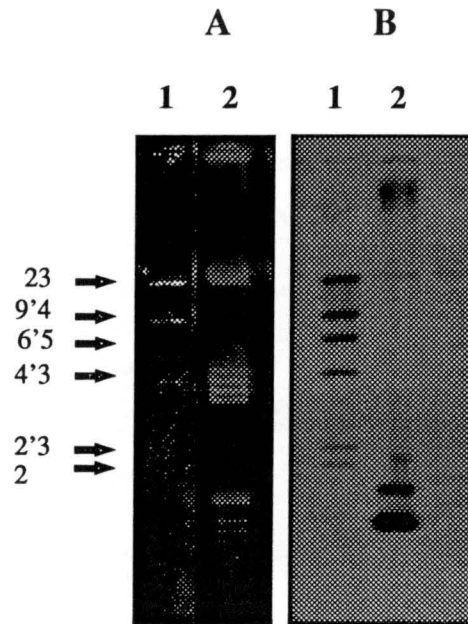


Figura 1.3. Identificación del cósmido portador del ADN silvestre correspondiente al ADN mutado en la cepa GRL300.

A. Electroforesis en gel de agarosa del cósmido pML1 digerido con *Eco* RI.

B. Resultado de la hibridación con la sonda *Eco* RI/*Hpa* I del plásmido pGRF3.

Carril 1. Marcador de peso molecular λ *Hind* III, marcado con digoxigenina.

Carril 2. Cósmido pML1.

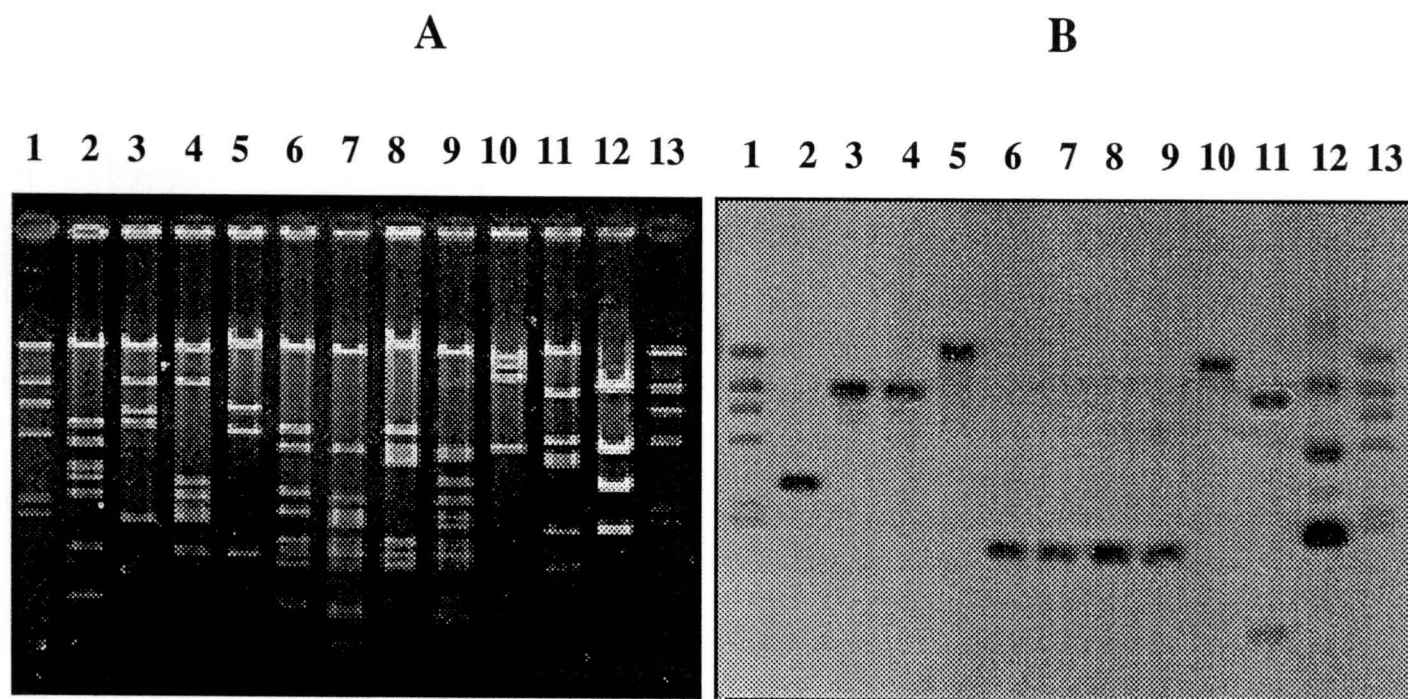


Figura 1.4. Detección de señales de hibridación en el plásmido pML1.

A. Electroforesis en gel de agarosa del cósmido pML1 digerido con distintas enzimas de restricción.

B. Resultado de la hibridación con la sonda *Hpa I/Eco RI* de pGRF3.

Carriles: 1. marcador de peso molecular marcado con digoxigenina λ *Hind III*; 2. *Xho I*; 3. *Hind III*; 4. *Hind III/Bam HI*; 5. *Bam HI*; 6. *Bam HI/Eco RI*; 7. *Bam HI/Hind III/Eco RI*; 8. *Eco RI*; 9. *Eco RI/Hind III*; 10. *Eco RV*; 11. *Pst I*; 12. pGRF3 digerido con *Eco RI/Hpa I*; 13. Marcado de peso molecular λ *Hind III* marcado con digoxigenina.

Eco RI, permitió la detección de un fragmento *Eco* RI de 1'6 kb, que fue el de menor tamaño que mostró homología con la sonda (Figura 1.6). El mapa parcial de restricción del plásmido pML12, con indicación del fragmento *Eco* RI de 1'6 kb, se presenta en la Fig. 1.5.

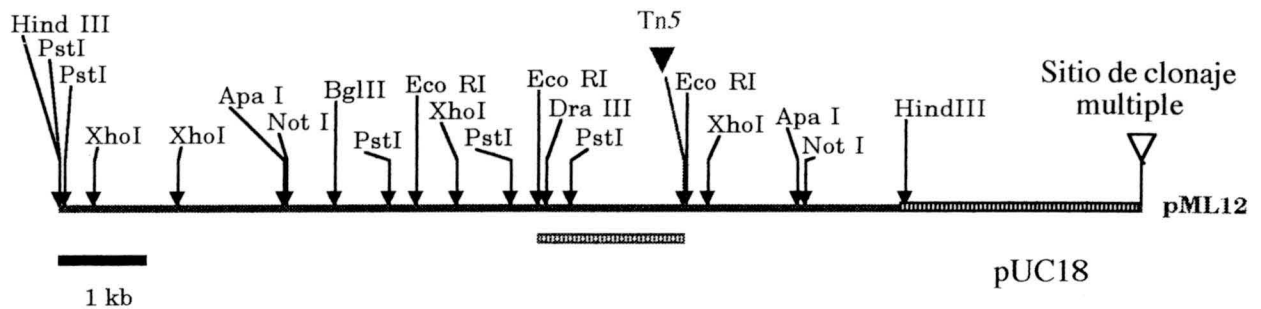


Figura 1.5. Mapa parcial de restricción del plásmido pML12

El ADN del plásmido pML12 se sometió a digestión simple o múltiple con distintas enzimas de restricción, elaborándose el mapa correspondiente a partir de los fragmentos obtenidos. Los sitios *Hind* III y *Pst* I situados a la izquierda de la Figura pertenecen al sitio de clonaje múltiple de pLAFR3, en el que está construida la librería genómica de *B. japonicum* USDA 110. Estos dos puntos de corte, junto con el sitio *Pst* I adyacente a los anteriores, se determinaron después de la secuenciación de pML12, al igual que el lugar de inserción del transposón Tn5. El fragmento de ADN de menor tamaño que presenta homología con la sonda *Eco* RI/ *Hpa* I se muestra con una barra punteada. El vector de clonación empleado fue pUC18.

1.3. Estrategia de subclonación del fragmento *Hind* III del plásmido pML12

La digestión de pML12 con distintas enzimas de restricción permitió la obtención de los fragmentos de restricción *Xho* I (0'9 kb), *Xho* I/*Eco* RI (3 kb), *Eco* RI (1'4 kb), *Eco* RI (1'6 kb) y *Eco* RI/*Hind* III (2'4 kb) (Figura 1.7). Excepto el tercer fragmento que se clonó en pUC18, los restantes fragmentos fueron clonados en pBSKS(+), dando lugar a los plásmidos pMLX1, pMLEX1, pML124, pML125 y pML126 respectivamente (Figura 1.7). El empleo de uno u otro vector se debió a las posibilidades de manejo que presentaban para obtener clones de secuenciación.

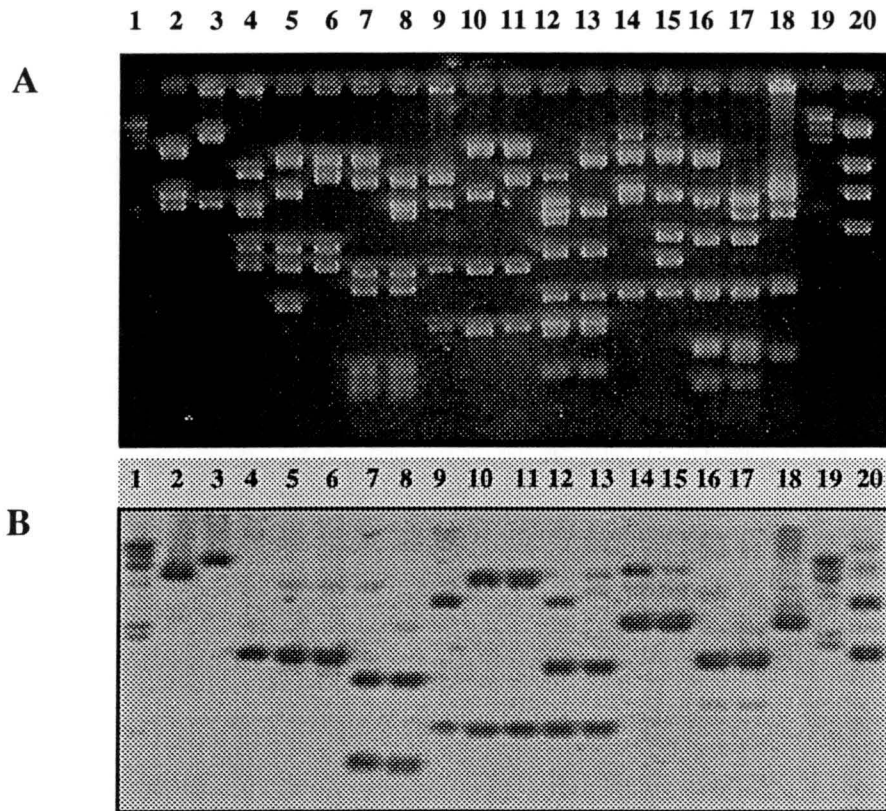


Figura 1.6. Detección del fragmento de menor tamaño de pML12 que presenta homología con la sonda *Hpa I/ Eco RI* de pGRF3.

A. Electroforesis en gel de agarosa de digestiones del p smido pML12 con distintas enzimas de restricción.

Carriles: 1. Marcador de peso molecular (λ *Hind III*); 2. *Hind III/Bgl II*; 3. *Hind III*; 4. *Eco RI/Hind III*; 5. *Eco RI/Bgl II*; 6. *Eco RI*; 7. *Eco RI/Pst I*; 8. *Eco RI/Pst I/Hind III*; 9. *Hind III/Pst I*; 10. *Pst I/Bgl II*; 11. *Pst I*; 12. *Hind III/Xho I/Pst I*; 13. *Xho I/Pst I*; 14. *Xho I*; 15. *Xho I/Bgl II*; 16. *Xho I/Eco RI*; 17. *Xho I/Eco RI/Hind III*; 18. *Xho I/Hind III*; 19. Marcador de peso molecular; 20. pGRF3 digerido con *Eco RI/Hpa I*.

B. Resultados después de la hibridación con la sonda *Eco RI/Hpa I* de pGRF3.

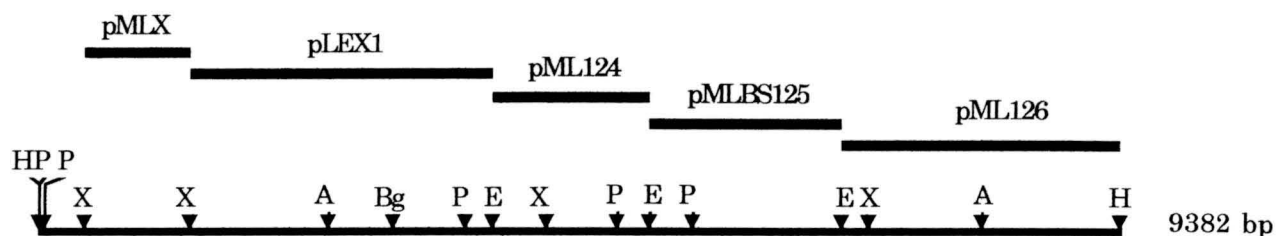


Figura 1.7. Estrategia de subclonación de pML12

Los clones pMLX1, pMLEX1, pML124, pML125 y pML126 se obtuvieron a partir del fragmento *Hind* III de 9'3 kb de pML12 mediante subclonación en pUC18 o pBSKS(+). Cada clon contiene, respectivamente, las regiones de ADN correspondientes a la digestión de dicho fragmento con las enzimas *Xho* I (pMLX1, 0'9 kb), *Xho* I/*Eco* RI (pMLEX1, 3 kb), *Eco* RI (pML124, 1'4 kb), *Eco* RI (pML125, 1'6 kb) y *Eco* RI/*Hind* III (pML126, 2'4 kb).

A partir de cada uno de los plásmidos pMLX1, pMLEX1, pML124, pML125 y pML126 se obtuvieron clones de delección para llevar a cabo la secuenciación del ADN correspondiente (Figura 1.8). En aquellos casos donde no hubo solapamiento de la secuencia de ADN entre dos clones sucesivos de secuenciación, se diseñaron oligonucleótidos específicos para establecer la continuidad de la secuencia. En todos los casos se han secuenciado las dos cadenas, ya que el ADN de los plásmidos pMLX1, pMLEX1, pML124, pML125 y pML126 se clonó en ambas direcciones.

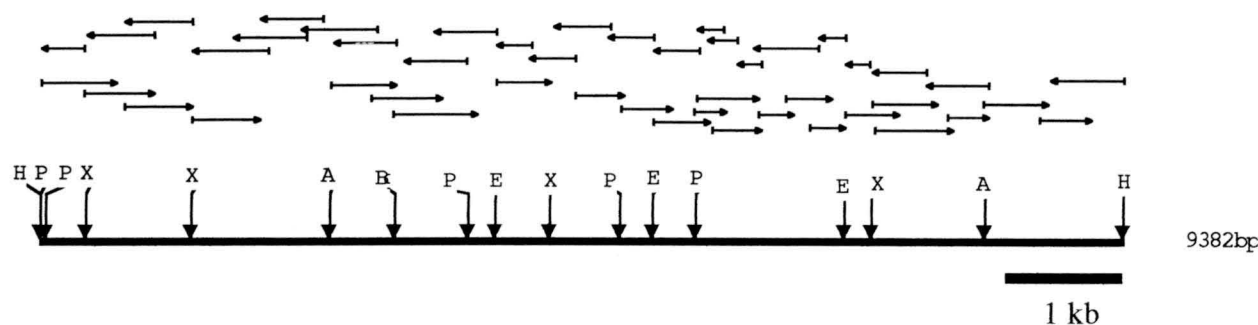


Figura 1.8. Estrategia de secuenciación de pML12

Los clones de delección obtenidos a partir de los subclones pMLX1, pMLEX1, pML124, pML125 y pML126 se representan como flechas. La longitud de cada flecha indica el tamaño del fragmento secuenciado y la punta de la flecha marca la dirección de secuenciación. Las flechas con un círculo sólido representan zonas de ADN para cuya secuenciación fue necesario el empleo de oligonucleótidos sintéticos debido a la falta de solapamiento entre los clones de delección. Se presenta igualmente el mapa de restricción de los sitios más representativos de pML12. H, *Hind* III; P, *Pst* I; X, *Xho* I; A, *Apa* I; Bg, *Bgl* II; E, *Eco* RI.

1.4. El plásmido pML12 contiene el ADN silvestre correspondiente al ADN mutado en la cepa GRF3

Dado que el plásmido pML125 contiene la región de ADN de menor tamaño (Figs. 1.5 y 1.6) que presenta homología con la sonda *Hpa* I/*Eco* RI, era probable que ambos plásmidos pudieran contener ADN idéntico. Este hecho indicaría, además, que el ADN que se pretendía secuenciar correspondía, en realidad, al ADN mutado en la cepa GRF3. Por esta razón, el primer ADN que se secuenció fue el del plásmido pML125 (Fig. 1.10).

Para comprobar la identidad del ADN de pML12, el ADN del plásmido pGRF3 se sometió a restricción con la enzima *Bam* HI que corta el transposón Tn5 (Figura 1.1). Se obtuvo así un fragmento de restricción que contiene el ADN de *B. japonicum* y una única secuencia de inserción (IS50R) del transposón. La clonación de ese ADN en el sitio de restricción *Bam* HI de pUC18 dió lugar al plásmido pTN3. Para la secuenciación del ADN de pTN3 se utilizó como cebador el oligonucleótido sintético 3'-CGCAGGACTTGCCTTGAAA-5', que es específico de las secuencias de

inserción de Tn5. La secuencia de nucleótidos de pTN3 se indica en la Figura 1.9.

Conocida ya la secuencia de nucleótidos del plásmido pML125, el alineamiento de las secuencias de nucleótidos correspondientes a pML125 y pTN3 demostró que ambos ADN presentan un 98'5 % de identidad sobre los 239 nucleótidos analizados en pTN3 (Fig. 1.9). Este elevado porcentaje de identidad entre ambos ADN permitió establecer que el ADN del plásmido pML12 que se pretendía secuenciar correspondía al ADN mutado en la cepa GRF3.

Por otra parte, del análisis comparativo de ambas secuencias de nucleótidos se pudo establecer que la inserción de Tn5 en el cromosoma de la cepa GRF3 ocurrió 35 nucleótidos antes del tercer sitio de restricción *Eco* RI de pML12 (Figura 1.5).

```

ADN de pML125          1 GCCTTGGCCTCGAAGCCGCCGAAGCGCAGCAGCGGGTTGAGCCAGATCAG 50
ADN de pGRF3 CTTGIGTATAAGATCAG-GCCTTGGCCTCGAAGCCGCCGAAGCGCAA CAGCGGGTTGAGCCAGATCAG 50

                    51 CCGCCGGCAGGAGCGGTGCAGCCGGTCCATCTCGAAGGCGAGCCTGGAAT 100
                    51 CCGCCGGCAGGAGCGGTGCAGCCGGTCCATCTCGAAGGCGAGCCTGGAAT 100

                    101 CGGCCTCCCGCTCCAGCCCGTCCGAGATCAGGAGCACGATGGCGCCCTGG 150
                    101 CGGCCTCCCGCTCCAGCCCGTCCGAGATCAGGAGCACGATGGCGCCCTGG 150

                    151 CTCAGGACGCGGCGGCCACAATTTGTTGAAGTTGTGCAGCGAGGCCGA 200
                    151 CTCAGGACC CGGCGGCCACAATTTGTTGAAGTTGTGCAGCGAGGCCGA 200

                    201 GATCCGCGTGCCGCCGCCCAATCCTC 228
                    201 GATCCGCGTACCGGCCGCCCAATCCTC 228

```

Figura 1.9. Alineamiento parcial de las secuencias de nucleótidos de los plásmidos pTN3 y pML125.

La secuencia subrayada en pGRF3 corresponde a ADN del transposón Tn5. Las letras en negrita corresponden a las bases divergentes entre las dos secuencias de ADN.

1.5. IDENTIFICACION DE LOS GENES *cox* DE *B. JAPONICUM*

Como se ha indicado anteriormente, el ADN del plásmido pML125 fue el primero en secuenciar por contener el fragmento de ADN de menor tamaño que mostraba homología con la sonda *Eco* RI/*Hpa* I (Figuras 1.5 y 1.6). La búsqueda en las Bases de Datos de secuencias de proteínas homólogas a las codificadas por el ADN de pML125 indicó que dicho ADN estaba implicado en la síntesis de enzimas monóxido de carbono deshidrogenasa (CODH) típicas de bacterias

carboxidotrofas. La extensión de la secuencia de ADN, a izquierda y derecha del plásmido pML125, mediante la secuenciación de los plásmidos pML124, pMLEX1, pML124 y pML126 permitió identificar la región de ADN implicada en la síntesis de la enzima CODH de *B. japonicum*.

A los genes que codifican la enzima CODH de *O. carboxidovorans* se les ha denominado genes *cox* (Shübel et al. 1995), mientras que a los responsables de la síntesis de la CODH de *P. carboxidotropha* se les llamó genes *cut* (Pearson et al. 1994). Teniendo en cuenta la utilización preferencial de codones descrita para *B. japonicum* (Ramsier y Göttfert, 1991), el análisis de la secuencia de nucleótidos indicó la existencia de 8 ORFs cuya disposición y tamaño se indican en la Figura 1.10. Dicha secuencia se extiende desde el sitio de restricción *Bgl* II de pMLEX1 hasta el sitio *Hind* III de pML126, e incluye un total de 6.325 nucleótidos (Figura 1.11). Los 4 primeros ORFs parecen formar parte de un mismo operon que, dada su elevada homología con los genes *cox* de *O. carboxidovorans*, se denominaron de igual manera, esto es *coxSMorf4orf5*. Los ORFS 6, 7, 8 y 9 podrían formar parte del operón *cox*, aunque su función, aparentemente, no parece estar relacionada con la descrita para los genes *cox*. El marco de lectura de ORF9 permanece abierto (Figuras 1.10 y 1.11).

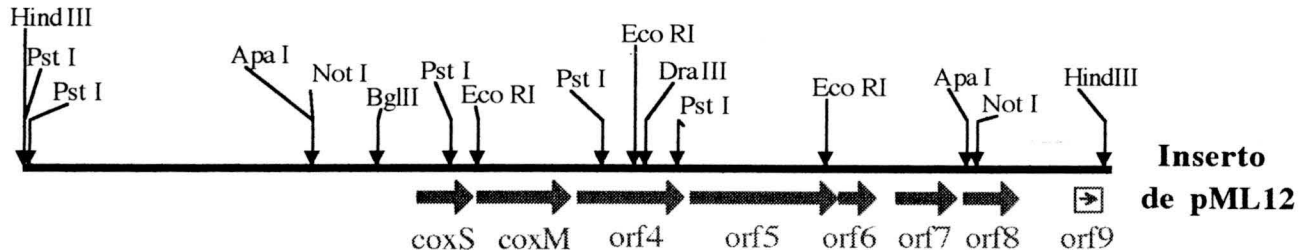


Figura 1.10. Mapa genético y de restricción parcial de la región *cox* de *B. japonicum*

En el mapa se representan, en dirección 5'-3', los 8 ORFs incluidos en la secuencia de nucleótidos de la región *cox* de *B. japonicum*. Las flechas indican la longitud y dirección de cada uno de los ORFs. El ORF9 permanece abierto.

1.5. 1. Estudio de *coxS*.

Este ORF presenta dos inicios posibles de traducción, uno de ellos se localiza a 354 nucleótidos de distancia del sitio *Bgl* II, utiliza el codón de iniciación ATG y podría utilizar la secuencia AGAGAGA, a 5 nucleótidos del codón de iniciación, como posible sitio de unión al ribosoma (Figura 1.11). Aunque existe otro posible codón de iniciación, GTG, que se encuentra a 348

nucleótidos de distancia del sitio *Bgl* II, carece de secuencia Shine-Dalgarno (Figura 1.11).

Si se considera como iniciador el codon ATG, *coxS* está compuesto por 483 nucleótidos que codificarían una proteína de 161 aminoácidos de tamaño molecular 17.148. El codón de terminación es TAA (Fig. 1.11).

Como puede deducirse del alineamiento de las secuencias de aminoácidos (Figura 1.12), la proteína CoxS de *B. japonicum* presenta elevados porcentajes de identidad y homología con la subunidad de menor tamaño (subunidad S) tanto de las enzimas CODH de *O. carboxidovorans* y *P. thermocarboxidovorans*, como con las de diferentes tipos de molibdohidrolasas de otros procariotas, entre las que cabe destacar la 4-O-hidroxi-benzoil-CoA reductasa de *Rhodospseudomonas palustris* (Gibson et al. 1997), la nicotina deshidrogenasa de *Arthrobacter nicotinovorans* (Grether-Beck et al. 1994), la isoquinolina 2-oxidoreductasa de *P. putida* (Bläse et al. 1996) y la isoquinolina 1-oxidoreductasa *B. diminuta* (Lhemann et al. 1995) (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje de identidad y de homología de CoxS de *B. japonicum* con la subunidad de menor tamaño (S) de diferentes molibdohidrolasas.

	<u>% Identidad</u>	<u>% Homología</u>
<i>P. thermocarboxidovorans</i> CutC	56	76
<i>O. carboxydovorans</i> CoxS	52	70
<i>R. palustris</i> HbaB	50	59
<i>A. nicotinovorans</i> NdhA	49	59
<i>P. putida</i> QorS	46	58
<i>B. diminuta</i> IorA	42	48

CutC, subunidad S de la enzima CODH de *P. thermocarboxidovorans* (Pearson et al. 1994); CoxS, subunidad S de la enzima CODH de *O. carboxydovorans* (Shübel et al. 1995); HbaB, subunidad S de la enzima 4-OHbenzoil-CoA reductasa de *R. palustris* (Gibson et al. 1997); NdhA, subunidad S de la enzima nicotina deshidrogenasa de *A. nicotinovorans* (Grether-Beck et al. 1994); QorS, subunidad S de la enzima isoquinolina 2-oxidoreductasa de *P. putida* (Bläse et al. 1996); IorA, subunidad S de la enzima isoquinolina 1-oxidoreductasa de *B. diminuta* (Lhemann et al. 1995).

CoxS presenta también homología, aunque en menor grado, con deshidrogenasas de procariotas tales como la aldehído deshidrogenasa de *D. gigas* (Thoenes et al. 1994) y la succinato deshidrogenasa de *Bacillus subtilis* (número de acceso P0866). Con el número de acceso U28375 se puede localizar en las Bases de Datos un gen de *E. coli* que codifica una proteína de función desconocida con la que CoxS presenta un 60% de identidad y un 41% de homología. Igualmente, CoxS es homóloga a otras molibdohidrolasa típicas de eucariotas, tales como la xantina deshidrogenasa de *Drosophila melanogaster*, *Drosophila pseudoobscura*, *Calliphora vicina*, *Homo sapiens*, *Gallus gallus*, *Bombyx mori*, *Rattus norvegicus*, *Emericella nidulans* y *Mus musculus*.

CoxS posee en su secuencia de aminoácidos dos motivos típicos de unión a las agrupaciones de tipo [Fe-S]. El primero lo constituye la secuencia C-X₄-C-X₂-C-X_n-C, conjunto de cisteínas en las posiciones 40, 45, 48 y 60, respectivamente (Fig. 7b), que es equivalente al motivo C-X₄-C-X₂-C-X_n-C caracterizado en diversos tipos de ferredoxinas (Harayama et al. 1991) y otras proteínas que contienen Fe y S en agrupamientos de tipo I [2Fe-2S], tales como la XDH de *D. melanogaster* (Lee et al. 1987; Hughes 1992a,b), la aldehído oxidoreductasa de *Desulfovibrio gigas* (Thoenes et al. 1994) y la succinato ubiquinona oxidoreductasa mitocondrial de hígado humano (Kita et al. 1990). El segundo motivo está representado por la secuencia HGLQCGFC-X₃₂-CRC que corresponde a la histidina 96 y a las cisteínas 100, 103, 136 y 138 de la secuencia aminoacídica de CoxS (Figura 6b). Esta secuencia es equivalente a H-X₃-C-X₂-C-X_n-C-X-C, capaz de unirse a agrupamientos del tipo II [2Fe-2S] descritos, entre otras, en la XDH de *D. melanogaster* (Lee et al. 1987; Hughes 1992a,b) y *Calliphora vicina* (Houde et al. 1989) y en la aldehído oxidoreductasa de *D. gigas* (Thoenes et al. 1994). Estas consideraciones indican que CoxS es la subunidad de la enzima CODH de *B. japonicum* que contiene Fe y S, posiblemente agrupados en centros de tipo [2Fe-2S], necesarios para la actividad de la proteína.

1.5.2. Estudio de *coxM*.

Este ORF presenta como sitio de inicio de la traducción el codón ATG situado a 877 nucleótidos de distancia del sitio *Bgl* II y la secuencia AGGA, a 6 nucleótidos del codón de iniciación, como posible secuencia Shine-Dalgarno. El gen *coxM* incluye 804 nucleótidos que podrían codificar una proteína de 268

aminoácidos de tamaño molecular 28.489. El codón de terminación es TGA. *coxM* está separado de *coxS* por 36 nucleótidos (Fig. 1.11).

coxM podría codificar una proteína homóloga a las subunidades de tamaño intermedio (subunidad M) de las enzimas CODH de *O. carboxidovorans* (Schübel et al. 1995) y *P. thermocarboxidovorans* (Pearson et al. 1994). Al igual que se ha descrito para CoxS, el alineamiento de las secuencia aminoacídica de CoxM con las de otras subunidades M de diferentes molibdohidrolasas de procariotas (Figura 1.12) indicó la existencia de elevados porcentajes de homología e identidad entre ellas, sobre todo con las secuencias de las subunidades M de las enzimas CODH de *O. carboxidovorans* (Schübel et al. 1995) y *P. thermocarboxidovorans* (Pearson et al. 1994) (Tabla 2). Igualmente, CoxM es homóloga a la aldehído deshidrogenasa de *Bos taurus* (número de acceso X87251), la proteína de función desconocida codificada en *E. coli* (número de acceso U28375) y la enzima xantina deshidrogenasa de diversos eucariotas, tales como *Drosophila melanogaster* (S07244), *Drosophila pseudoobscura* (P22811), *Calliphora vicina* (M30316), *Homo sapiens* (P47989), *Gallus gallus* (D13221), *Bombyx mori* (D43965), *Rattus norvegicus* (J05579), *Emericella nidulans* (X 82827) y *Mus musculus* (S22419).

Tabla 2. Porcentaje de identidad y de homología de CoxM de *B. japonicum* con la subunidad de tamaño intermedio (M) de diferentes molibdohidrolasas.

	<u>% Identidad</u>	<u>% Homología</u>
<i>O. carboxidovorans</i> CoxM	38	56
<i>A. nicotinovorans</i> NdhB	39	50
<i>P. thermocarboxidovorans</i> CutB	31	57
<i>P. putida</i> QorM	34	46
<i>R. palustris</i> HbaD	19	39

CoxM, subunidad M de la enzima CODH de *O. carboxidovorans* (Schübel et al. 1995); NdhB, subunidad M de la nicotina deshidrogenasa *A. nicotinovorans* (Grether-Beck et al. 1994); CutB, subunidad M de la CODH de *P. thermocarboxidovorans* (Pearson et al. 1994); QorM, subunidad M de la enzima isoquinolina 2-oxidoreductasa *P. putida* (Bläse et al. 1996); HbaD, subunidad M de la enzima 4-OHbenzoil-CoA reductasa de *R. palustris* (Gibson et al. 1997).

Las secuencias G-X-G-X₂-G/A se han implicado en la unión a los dinucleótidos de tipo NAD y FAD (Möller y Amons, 1985; Wierenga et al. 1985). El análisis de la secuencia de aminoácidos de CoxM ha demostrado la existencia de dos agrupaciones de glicinas, una dispuesta en el motivo G-I-G-D-P-A, correspondiente a las glicinas 97 y 99, y a la alanina 102 (Figura 1.10), y la segunda al agrupamiento G-A-G-S-E-G de las glicinas en las posiciones 203, 205 y 208 de la secuencia de CoxM (Figura 1.10).

Los motivos de unión a dinucleótidos no son fácilmente identificables en la mayoría de la molibdohirolasas analizadas (Hille y Nishino, 1995). De hecho, los motivos típicos G-X-G-X₂-G/A no se han encontrado en las secuencias de las subunidades respectivas (M) de las enzimas CODH de *O. carboxidovorans* y *P. thermocarboxidovorans*. En *O. carboxidovorans*, sin embargo, se ha descrito la secuencia G-L-G-T-Y G como posible sitio de unión de FAD, aunque tal secuencia no pertenece a la subunidad M sino a la de mayor tamaño (subunidad L) de la enzima CODH (Schübel et al. 1995). Una serie de hechos experimentales sugieren que, a pesar de la ausencia de estas secuencias, los sitios de unión a dinucleótidos se localizarían en la subunidad M de las distintas molibdohirolasas. Así, la aldehído oxidoreductasa de *D. gigas* carece de sitios de unión de dinucleótidos, y la enzima no tiene subunidad M (Thoenes et al. 1994). Por otra parte, mutaciones puntuales que afectan a los aminoácidos en las posiciones 348 y 357 de la subunidad M (40 kDa) de la xantina deshidrogenasa de *D. melanogaster* producen una enzima incapaz de unirse a FAD (Hughes et al. 1992). Además, en las subunidades M de las molibdohidrolasas cuyo alineamiento se indica en la Figura 1.12 existen numerosos restos de glicina conservados en todos los casos. Cabe la posibilidad, por tanto, de que CoxM de *B. japonicum* esté implicado en la unión a dinucleótidos de tipo FAD/NAD.

En CoxM, la secuencia aminoacídica D₂₄-A₂₅-I₂₈-A₂₉-G₃₀-G₃₁-H₃₂-T₃₃-L₃₄ es equivalente a la secuencia D/T/E-L/I/V/M/T/A-X₂-L/I/V/M-L/I/V/M/S/T/A/G-S/A/G-L/I/V/M/S/T/A/G-H-S/T/A-L/I/V/M/F/Y, que se considera un motivo típico de peroxidasa (Kimura, 1988; Henrissat et al. 1990). Esta secuencia está conservada en las enzimas CODH de *B. japonicum*, *O. carboxidovorans* y *P. thermocarboxidovorans*, y no se localiza en el resto de molibdohidrolasas (Figura 8b). Se desconoce si este motivo es funcional en las enzimas purificadas.

1.5.3. Estudio de ORF4.

Se encuentra separado de *coxM* por 62 nucleótidos. Este ORF utiliza como inicio de la traducción el codón ATG localizado a 1.746 nucleótidos de distancia del sitio *Bgl* II, y el tetranucleótido AAGA, a 10 nucleótidos del codón de iniciación, como posible secuencia Shine-Dalgarno. El codon de terminación es TGA. El *orf4* está compuesto por 906 nucleótidos y parece codificar una proteína de 302 aminoácidos con un tamaño molecular calculado de 33.433 (Figura 1.11).

Como puede observarse en los alineamientos correspondientes (Figura 1.13), la proteína Orf4 de *B. japonicum* presenta homología con proteasas dependientes de ATP, tales como MoxR, implicada en la regulación de la formación de metanol deshidrogenasa activa en *M. tuberculosis* (Van Spanning et al. 1991), LonD, esencial para el desarrollo de *M. xanthus* (Tojo et al. 1993) y GvpN, que interviene en la formación de vesículas de *Haloferas mediterranei* (Englert et al., 1992)), así como con otras proteínas de función desconocida (Tabla 3). En todos los casos, las proteínas analizadas tiene en común la presencia de un motivo de unión a mononucleótidos del tipo ATP/GTP, caracterizado por las secuencias A/G-X₄-G-K-S/T (Möller y Amons, 1985). En la proteína Orf4 de *B. japonicum*, el motivo indicado corresponde a la secuencia G46-G53-K54-T55 (Figura 1.10). Los porcentajes de mayor identidad y homología de la proteína codificada por *orf4* de *B. japonicum*, como se indica en la Tabla 3, corresponden a la proteína codificada por el *orf4* de *O. carboxidovorans* (Schübel et al. 1995). En esta bacteria, el *orf4* podría estar implicado en la regulación negativa de los genes que codifican la enzima CODH, de manera que la mutación en ese *orf* incrementa la actividad de la enzima (O. Meyer, comunicación personal). Dada la homología con el *orf4* de *O. carboxidovorans*, podría asignarse al *orf4* de *B. japonicum* una función de control negativo sobre la actividad CODH.

Tabla 3. Porcentaje de identidad y de homología de Orf4 de *B. japonicum* con diferentes proteasas y otras proteínas de función desconocida.

	% Identidad	% Homología
<i>O. carboxydovorans</i> Orf4	50	69
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> OrfA*	46	58
<i>Rhodococcus</i> sp NI86/21 Orf1*	43	63
<i>Synechocistis</i> sp MoxR	28	51
<i>Myxococcus xanthus</i> LonD	24	47
<i>Haloferax mediterranei</i> GvpN	22	50

Orf4, región 3' de los genes estructurales de la enzima CODH de *O. carboxydovorans* (Shübel et al. 1995); OrfA, proteína codificada por *orfA* de *M. tuberculosis* (Número de acceso Z81451); Orf1, región 3' del gen *tchE* de *Rhodococcus* sp. (Nagy et al. 1995); MoxR, proteína reguladora de la enzima metanol deshidrogenasa de *M. tuberculosis* (Van Spanning et al. 1991); LonD, proteasa dependiente de ATP esencial para el desarrollo de *M. xanthus* (Tojo et al. 1993); GvpN, genes implicados en la formación de vesículas de *H. mediterranei* (Englert et al., 1992); *, función desconocida.

1.5.4. Estudio de ORF5

Este ORF se encuentra separado del ORF4 por 76 nucleótidos. Presenta el inicio de la traducción a 2.731 nucleótidos de distancia del sitio *Bgl* II, utiliza como inicio de la transcripción el codón ATG, la secuencia Shine-Dalgarno posible es AGAG, localizada a 7 nucleótidos del codón de iniciación, y su codon de terminación es TGA (Figura 1.11). El ORF5 está compuesto por 1.266 nucleótidos y codificaría una proteína de 422 aminoácidos con un tamaño molecular calculado de 47.700.

El ORF5 de *B. japonicum* es homólogo a un ORF presente en *O. carboxydovorans* adyacente, en la dirección 3', al *orf4* de esa bacteria (O. Meyer, comunicación personal). La función de la proteína codificada por *orf5*, tanto de *B. japonicum* como de *O. carboxydovorans* es desconocida. Igualmente, la proteína Orf5 de *B. japonicum* muestra, a lo largo de toda la secuencia, un 20% de identidad (31% de homología) con un Orf de función desconocida de *M. tuberculosis*, y un 31% de identidad (41% de homología) si se considera solamente la zona carboxi-terminal (Figura 1.15). Este *orf* de *M. tuberculosis* se encuentra en la dirección 3' del *orfA*, homólogo al *orf4* de *B. japonicum*, descrito en el

apartado anterior (Tabla 3). También se ha encontrado homología entre Orf5 de *B. japonicum* y un Orf de *Rhodococcus sp* NI86/21, igualmente de función desconocida, y del que sólo se ha descrito su secuencia amino-terminal (Nagy et al. 1995). Este ORF se localiza en la misma región de ADN que *orf1* de ésta misma bacteria, descrito en el apartado anterior, como homólogo a *orf4* de *B. japonicum* (Tabla 3), aunque se traduce en dirección opuesta al anterior.

Orf5 de *B. japonicum* presenta un alto porcentaje de argininas (12%) y posee, en su extremo carboxi-terminal, un motivo típico de "cremallera de leucinas" (L-X₆-L-X₆-L-X₆-L) correspondiente a las leucinas en las posiciones 347, 354, 361 y 368 (Figura 8c), estructura que se ha implicado como propiedad característica de una nueva clase de proteínas capaces de unirse a ADN (Landschulz et al. 1988; O'Shea et al. 1989). Que la proteína codificada por el ORF5 de *B. japonicum* sea capaz de unirse a secuencias específicas de ADN es desconocida.

Del análisis comparativo de la secuencia de nucleótidos correspondientes al plásmido pTN3 (Figura 1.9) y al ORF5 de *B japonicum*, (Figura 1.11) se puede concluir que la inserción del transposón Tn5 se produjo en el ORF5 de la cepa GRF3, concretamente entre la lisina 376 y la alanina 377, a 3.772 nucleótidos del sitio *Bgl* II de la secuencia aminoacídica (Figura 1.11).

Puesto que no ha sido posible adscribir una función determinada al ORF5 de *B. japonicum*, no se puede establecer, de forma directa, la relación causal entre la mutación ocurrida en la cepa GRF3 y la pérdida de su capacidad para reducir nitrato en condiciones de microaerobiosis.

1.5.6. Estudio de ORF6 y ORF7

El ORF6 se encuentra separado del ORF5 por 11 nucleótidos, presenta el inicio de la traducción a 4.011 nucleótidos de distancia del sitio *Bgl* II, utiliza como inicio de la traducción el codón ATG y la secuencia GAGAGG, localizada a 7 nucleótidos del codón de iniciación, como posible sitio de unión al ribosoma. El codón de terminación es TAG (Figura 1.11). Está compuesto por 324 nucleótidos, y codificaría una proteína de 107 aminoácidos con un tamaño molecular calculado de 11.135.

Separado de ORF6 por 174 nucleótidos se encuentra ORF7, que presenta el inicio de la transcripción a 4.509 nucleótidos de distancia del sitio *Bgl* II. Este ORF utiliza como inicio de la transcripción el codon ATG, el pentanucleótido AAGAG, a 5 nucleótidos del codon de iniciación, como posible secuencia Shine-

Dalgarno y su codón de terminación es TAG (Figura 1.11). El ORF7 está compuesto por 531 nucleótidos y codificaría una proteína de 175 aminoácidos con un tamaño molecular calculado de 18.683.

Las proteínas codificadas por ORF y ORF7 presentan homología con la proteína A de *E. coli* de función desconocida (número de acceso U28375). La proteína Orf6 de *B. japonicum* es homóloga al polipéptido correspondiente al extremo N-terminal de la proteína A de *E. coli* (Figura 1.16), y Orf7 homóloga al extremo C-terminal de dicha proteína (Figura 1.16). De hecho, la suma de las dos proteínas codificadas por ORF6 y ORF7 representa el tamaño molecular calculado para la proteína de *E. coli*. La razón por la que en *B. japonicum* la secuencia de nucleótidos se haya interrumpida, mientras que en *E. coli* es continua, no puede deducirse de los resultados obtenidos.

1.5.6. Estudio de ORF8

Este ORF presenta como posible inicio de la traducción el codon GTG, situado a 5183 nucleótidos del sitio *Bgl* II y la secuencia AAGGA, localizada a 7 nucleótidos del codon GTG, podría corresponder a una posible secuencia Shine-Dalgarno (Figura 1.11). El ORF8 parece codificar una proteína de 131 aminoácidos con un tamaño molecular de 14.028. (Figura 1.11). No se han encontrado en los Bancos de Datos otras proteínas homólogas a ARF8.

1.5.7. Estudio de ORF9

El ORF9 mantiene abierto su marco de lectura, por lo que sólo se presenta su secuencia parcial (Figura 1.11). Su posible codon de iniciación es GTC, a 6.051 nucleótidos del sitio *Bgl* II, y su sitio de unión al ribosoma podría ser la secuencia GAGGG, que aparece a 10 nucleótidos del codon de iniciación (Figura 1.11). Este ORF, del que sólo se conocen 91 aminoácidos del extremo N-terminal presenta homologías con las proteínas MobA de *E. coli* (número de acceso P32173) y *Haemophilus influenzae* (número de acceso P44899) necesarias para la activación del dinucleótido de molibdopterina y guanina (MGD) (citas). También aparecen homologías con la proteína MoeA de *Methanococcus jannaschii* (número de acceso U67554), también implicada en la biosíntesis de molibdopterina.

La mayoría de las enzimas CODH de las bacterias carboxidotrofas están formadas por tres subunidades (S, M y L) codificadas por los genes estructurales respectivos, tales como *coxS*, *coxM* y *coxL* en *O. carboxidovorans* (Schübel et al. 1995), y *cutA*, *cutB* y *cutC* en *P. thermocarboxidovorans* (Pearson et al. 1994). En *B. japonicum* no se ha localizado el gen *coxL* después de la extensión de la secuencia a izquierda y derecha de los sitios de restricción *Bgl* II y *Hind* III del plásmido pML12 (Figuras 1.5 y 1.11) por lo que se puede afirmar que *coxL* no se haya en la misma región génica que el resto de genes *cox*.

Para tratar de localizar el gen *coxL* se realizaron hibridaciones del ADN genómico de *B. japonicum* con un fragmento *Cla* I de 1'8 kb del plásmido pHCG3 que contiene el gen *coxL* de *O. carboxidovorans* (Kraut et al. 1989; Kraut y Meyer, 1988). Los repetidos intentos fueron infructuosos y, en ningún caso, pudo detectarse señal positiva de hibridación. Este hecho podría explicarse si se considera que la homología ADN-ADN entre *coxMSorf4* de *O. carboxidovorans* y *coxMSorf4* de *B. japonicum* se encuentra dispersa a lo largo de toda la secuencia (no se muestran los resultados). Además, el contenido en G+C del plásmido pHCG3 es de un 56-57% (O. Meyer, comunicación personal) mientras que es de un 65% en el ADN secuenciado de *B. japonicum*. Estos hechos, unido a que no existen mutantes *coxL* en otros organismos hace que, por el momento, no sea posible la localización de *coxL* en *B. japonicum*, lo que no implica que no se encuentre en el genoma de esta bacteria.

Hay que indicar también que el empleo como sondas de los genes *coxS* y *coxM* de *O. carboxidovorans* en experimentos de hibridación con ADN total de *B. japonicum* también dieron resultado negativo, y ello, a pesar de la elevada homología (Tablas 1 y 2) existente entre las secuencias aminoacídicas de las proteínas codificadas por los genes mencionados.

1.6. Reproducción de la mutación ocurrida en GRF3

Para reproducir en *B. japonicum* USDA 110 la mutación ocurrida como consecuencia de la inserción de Tn5 en la cepa GRF3, el fragmento *Hind* III de 9'3 kb de pML12 (Figura 1.5) se clonó en el sitio de restricción *Eco* RI del plásmido pSUP202, construcción que dió lugar al plásmido pML122. La delección de los dos fragmentos *Eco* RI de 1'4 y 1'6 kb de pML122 y posterior sustitución de los mismos por el gen de resistencia a los antibióticos Sm y Spc contenidos en el plásmido pHP45W originó el plásmido pML122W, cuyo mapa de restricción se

indica en la Figura 1.16. Conocida la secuencia de los dos fragmentos *Eco* RI eliminados, la cepa mutante debía de carecer de *coxM*, *orf4* y *orf5*.

La transferencia mediante conjugación triparental a *B japonicum* USDA 110 del plásmido pML122W y la posterior selección de trasconjugantes incapaces de crecer microaeróbicamente con nitrato como única fuente de nitrógeno, que fueran además resistentes a Sm y Spc y sensibles a Tc, permitió la selección de un mutante al que se le denominó GRL300.

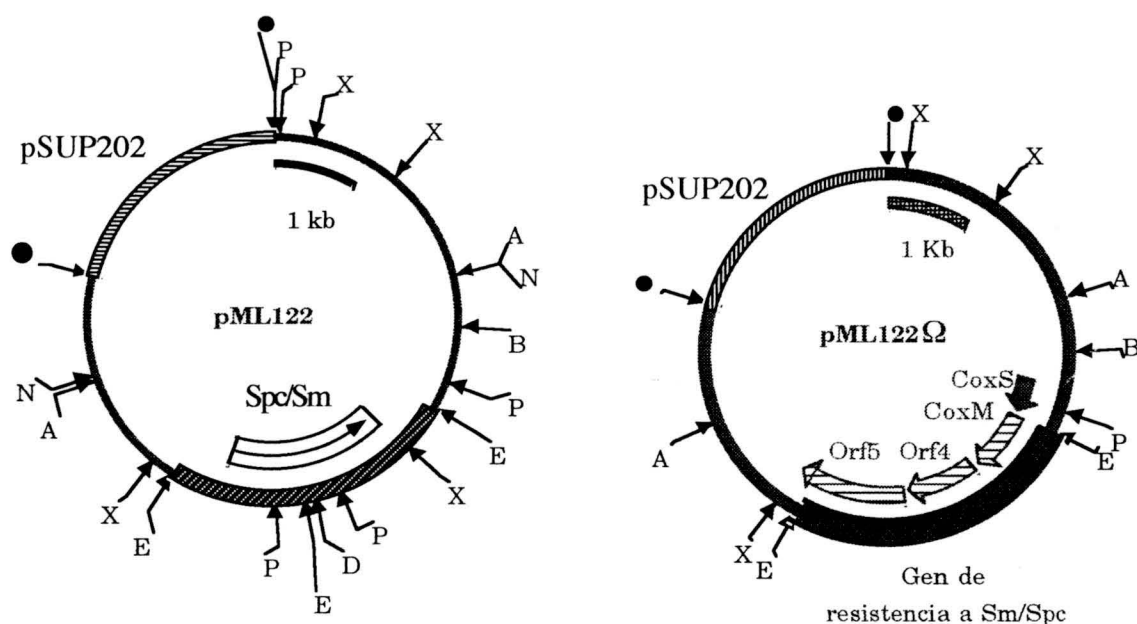


Figura 1.16. Esquema representativo la obtención del plásmido pML122Ω.

El plásmido pML122 es el resultado de la clonación en el sitio *Eco* RI del plásmido suicida pSP202 del fragmento *Hind*III de 9'3 kb del plásmido pML12 (Figura 1.5). La sustitución de los fragmentos *Eco* RI de 1'4 y 1'6 kb del plásmido pML12 por el gen de resistencia a los antibióticos Sm y Spc contenidos en el plásmido pHP45Ω dió lugar al plásmido pML122Ω. H, *Hind* III; X, *Xho* I; A, *Apa* I; B, *Bgl* II; N, *Not*I; P, *Pst* I; D, *Dra* III y E, *Eco* RI. Los lugares de clonación del vector pSUP202 se marcan con un rombo sólido. Los tres ORFs deletados se indican con flechas rayadas. Como una flecha sólida se presenta el gen *coxS* que no se afectó por la mutación. Los tamaños no están representados a escala.

Para comprobar la ausencia de *coxM*, *orf4* y *orf5* en la cepa GRL300, a partir de los fragmentos *Eco* RI de 1'6 y 1'3 kb de pML12 (Figura 1.5) se prepararon dos sondas que se emplearon conjuntamente para hibridar con el ADN genómico de dicha cepa digerido con *Eco* RI. Después de la hibridación se pudo observar que el ADN de la cepa parental USDA 110 presentaba dos bandas de hibridación de xx y xx kb, mientras que en el ADN de GRL300 no se

detectó hibridación con ninguno de los dos fragmentos *Eco* RI utilizados como sondas (Figura 1.17). Tanto en la cepa mutante como en la parental se detectó, además, una banda de hibridación de aproximadamente 1 kb (Figura 1.17), lo que indicó que tanto la cepa parental como la mutante poseían repetido ADN homólogo a una de las sondas empleadas. Para discernir a qué fragmento *Eco* RI podía deberse la señal de hibridación, cada sonda se empleó, de forma individual, para hibridar con ADN de USDA 110 y GRL300. No se detectó hibridación cuando se utilizó exclusivamente la sonda preparada a partir del fragmento *Eco* RI de 1'6 kb, mientras que al hidridar con la sonda *Eco* RI de 1'3 kb se observó de nuevo la aparición de la banda de hibridación de 1 kb (Figura 1.17). De estos resultados puede deducirse que el genoma de *B.japonicum* USDA 110 presenta repeticiones bien de *orf4*, de *coxM*, o de los dos, ya que la sonda de 1'3 kb contiene ADN de ambos ORFs (Figuras 1.5 y 1.16).

Se comprobó, además, que la mutante GRL300 portaba el gen de resistencia a Sm y Spc, puesto que al hibridar con una sonda realizada a partir del ADN de dicho gen apareció una señal de hibridación en la cepa mutante, señal que no se detectó en la cepa parental (Figura 1.18)

Al igual que *B. japonicum* GRF3, la cepa GRL300 es incapaz de crecer en microaerobiosis con nitrato como unica fuente de nitrógeno y sólo presenta en sus membranas la banda de actividad nitrato reductasa correspondiente a NRII, la misma que se observa en las membranas de GRF3 (Figura 1.19). Consecuentemene, en la cepa GRL300 se ha reproducido la mutación ocurrida en GRF3 mediante la inserción del transposón Tn5 (Fernández-López et al. 1994).

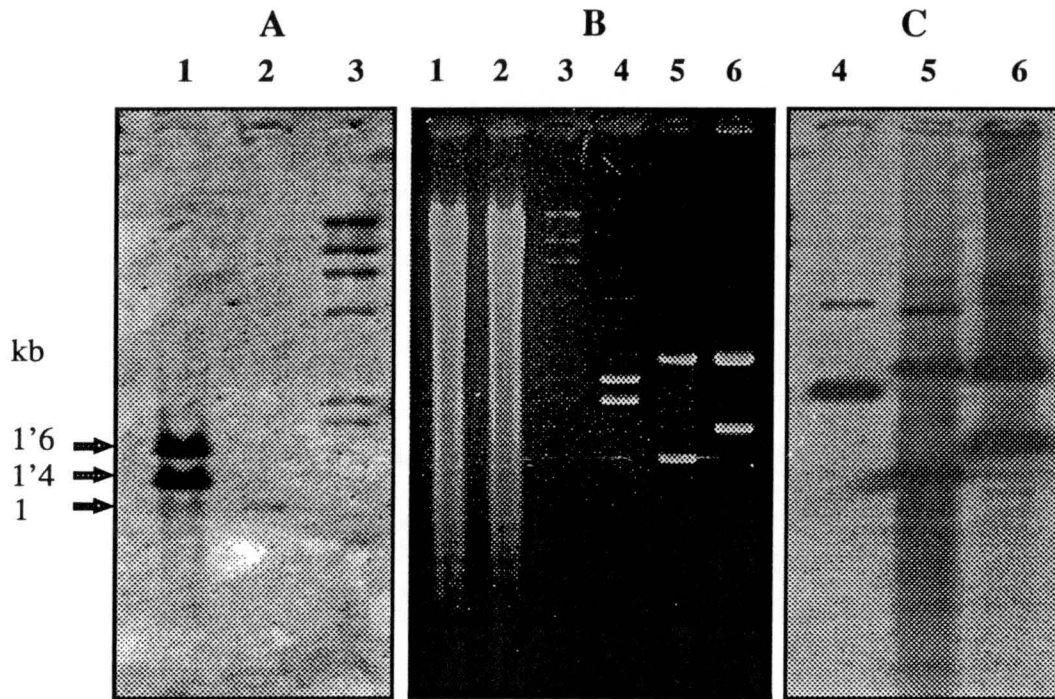


Figura 1.17. Sustitución de los dos fragmentos Eco RI de GRL300 por los genes de resistencia a Sm y Spc. Aparición de genes reiterados en el ADN genómico de *B. japonicum* USDA 110.

A. Resultado después de hibridar con las sondas Eco RI de 1'6 y 1'4 kb el ADN total de parental y mutante.

B. Electroforesis en gel de agarosa.

Carril 1. ADN genómico de USDA110 digerido con Eco RI.

Carril 2. ADN genómico de USDA110 digerido con Eco RI.

Carril 3. Marcador de peso molecular λ Hind III.

Carril 4. pHP45 Ω digerido con Eco RI.

Carril 5. pML124 digerido con Eco RI.

Carril 6. pML125 digerido con Eco RI

C. Resultado después de hibridar con las sondas contra los controles positivos.

Las flechas indican presencia de los fragmentos deletionados en la cepa parental y la ausencia de dichos fragmentos en la cepa mutada, así como la aparición de una señal positiva adicional en ambas cepas.

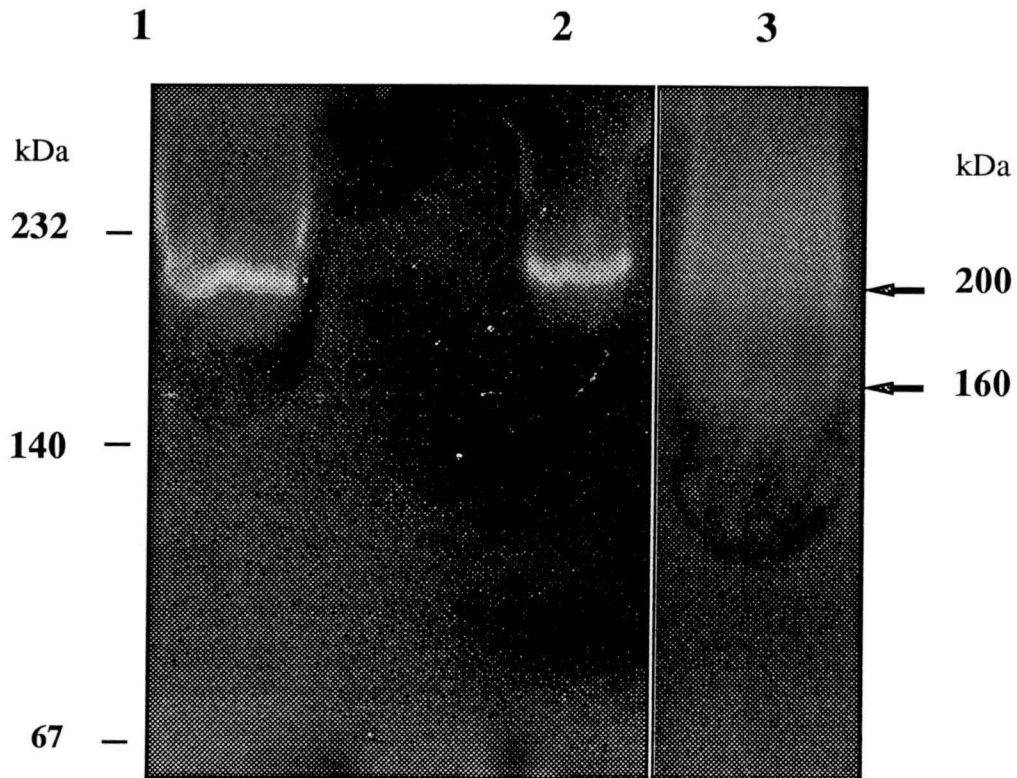


Figura 1.18. Detección de actividad nitrato reductasa en membranas de *B. japonicum*.

Carril 1. *B. japonicum* GRL300 (200 μ g deproteína).

Carril 2. *B. japonicum* GRL300 (100 μ g deproteína).

Carril 3. *B. japonicum* USDA110 (200 μ g deproteína).

Las flechas marcan el tamaño molecular de las dos enzimas nitrato reductasa de membranas de *B. japonicum*. Las líneas marcan la localización en el gel de las proteínas del marcador de peso molecular.

1 AGATCTCCGGCGAAGGCGAAGGGCGGGGTGGCGGGCTTTGCCAAGGGCGGCGCCGTGGTC 60
 61 AAGCTGGCGGAGAAGGACGGCGGCACGCTGCTCTCCTACGACGTCGAGGGCGCAGATCGGC 120
 121 GGCAAGTTGGCGCAGCTCGGACAACGCCTCATCAACgGCGCCGCCAAGAAGCTGGCCGAC 180
 181 GAGTTTTTTCGCGAAcTTCGCCAAGGCGGTACAGGGCTGAAGGCTATCGCCTTTCGGCATG 240
 241 GCGCCTTTCGCTCCGGGGTGATGTTGCCCGGGGCATAATGGCCCATATGATGGGTTGGAA 300
 301 TAATTATAAGAACCCTTCGACGGGACCCGTCGGGGCGCTGATAGAGAGTGTCTATGGCG 360

M A

CoxS ->

361 AAAATCTCCCTCATCGTGAACGGCAATCCTGTGACGGCCAACGTCGATCCCCGCACGCTT 420
 K I S L I V N G N P V T A N V D P R T L
 421 CTGGTGCAGTTCCCTGCGCGAGAATCTGCGGCTGACCGGCACACATGTCGGCTGCGACACC 480
 L V Q F L R E N L R L T G T H V G C D T
 481 TCGCAGTGCGGCGCCTGCGTTCGTCATCTCGACGGCAAGGCCGTGAAGTCCTGCACCACG 540
 S Q C G A C V V H L D G K A V K S C T T
 541 CTTGCCGTGATGGCTGACGGCCACGAGGTCAAGACGATCGAGGGGCTGGCTGCCGACGGC 600
 L A V M A D G H E V K T I E G L A A D G
 601 GCGCCGCTGCATCCGATGCAGGAAGCCTTCCGCGAGCACCATGGCCTGCAGTGCGGCTTC 660
 A P L H P M Q E A F R E H H G L Q C G F
 661 TGCACGCCCCGCATGATCATGACCGCGATCGACATCGTCCATCGCAAGGGGCACGAGGTC 720
C T P G M I M T A I D I V H R K G H E V
 721 GACGACCACACCATCCGCGAGGAGCTGGAAGGCAATCTCTGCCGCTGCACCGGTTACCAG 780
 D D H T I R E E L E G N L C R C T G Y Q
 781 AACATCGTCGCCTCGATCTCCGCCGGCGCCAAGGCGATGGCGAAATCCGACCTCGCCTAA 840
 N I V A S I S A G A K A M A K S D L A *
 841 ATCGACACGCGCATCCCGCGATCAGGACATTCAGATGTACGAATTCAAATATCATCGC 900

M Y E F K Y H R

CoxM ->

901 CCCGGGACCGTTCGGCAGGCCGCCAACCTCCTGGTGAAGAACGAAGACGCCAAGGTGATC 960
 P G T V R Q A A N L L V K N E D A K V I
 961 GCCGGCGGCCACACGCTGATTCCGGTCATGAAGCAGCGCCTCGCGAGCCCCCGCATCTG 1020
A G G H T L I P V M K Q R L A S P P H L
 1021 GTCGACCTCTCCACATCGAGGGGCTCAACGCGATCGAGATGAAGGGCCGCTCGGTGGTG 1080
 V D L S H I E G L N A I E M K G R S V V
 1081 ATCGGCGCCACCGCCAAGCAGCTGAGGTGCGGACCTCCGCCGTCGTCGGCGAAGCGATC 1140
 I G A T A K H A E V A T S A V V G E A I

1141 CCGGCGCTCGCGAGCCTTGCCGGCGGAATCGGCGATCCCGCCGTGCGCCACAAGGGCAGC 1200
P A L A S L A G **G I G D P A** V R H K G T

1201 ATCGGCGGCTCGCTCGCCAACAACGATCCGACCGCGGACTATCCGGCCGCGGTGCTTGCG 1260
I G G S L A N N D P T A D Y P A A V L A

1261 CTCGGGGCGACCATCGTCACCAACAAGCGCCGCTCAAGGCCGAGGAGTATTTGCAGGGC 1320
L G A T I V T N K R R L K A E E Y L Q G

1321 CTGTTACAGGACGGCGCTCGAGGCCGACGAGATCATCCAAGGTGATGTTCCCCTGCCG 1380
L F R T A L E A D E I I T K V M F P L P

1381 AAGAAGCCGCTACATCAAGTTCGCAACCAGGCCCTCGCGTTACGCACTGGTCGGCGTG 1440
K K A A Y I K F R N Q A S R Y A L V G V

1441 TTCGTGGCGCGCGCCGTCGACGTCGCGGTTGCCGTCACCGCGCCGCTCCGAGGGC 1500
F V A R R P S D V R V A V T **G A G S E G**

1501 GTGTTCCGCGTCACCGGTTTCGAGGAAGCCCTGAAGAAGCGCTTCTCGGCGAAAGCCCT 1560
V F R V T A F E E A L K K R F S A K A L

1561 GATGGCATCGAGGTGCCGGCCGAGGGTCTAACAGCGACATCCACGGCAGTGCCGAATAC 1620
D G I E V P A E G L N S D I H G S A E Y

1621 CGCGCGCACCTCATCGGGTGCTGACGCGGGCCGTCGACGCCCAATGCCAAGGAA 1680
R A H L I G V L T R R A V D A A N A K E

1681 TGATGGGCCTCACCAACTGGCCCAACGACTTGCCCCGGTGAGGGCGTAACCAAGACTGGC 1740
*

1741 CTTTCATGACTTCAGCCGCCCTGCCGGCATCGGTTGATGCGATGCTCGAACTCCTGACGT 1800
M T S A A L P A S V D A M L E L L T S

Orf4 ->

1801 CGCGCGGCTATCTCGCCGAGCGGTGCTGGCGACGGTGACGTATCTGTGCTGCGCATGG 1860
R G Y L A E R S L A T V T Y L S L R M G

1861 GCCGGCCGCTGTTTCTCGAAGGCGAGGCCGGCGTCGGCAAGACCGAGATCGAAAAGTGC 1920
R P L F L E **G E A G V G K T** E I A K V L

1921 TGTCGGCGGCGCTGGGGCGGAAGCTGATCCGCCTGCAGTGCTACGAAGCCCTCGACGTCT 1980
S A A L G R K L I R L Q C Y E G L D V S

1981 CCTCGGCCGTGTACGAGTGGAATAGCGCCGCGCAGATGATCGCGATCCGGATGGCGGAAG 2040
S A V Y E W N S A A Q M I A I R M A E A

2041 CCGCCGGCGACACCGATCGCGATCAACTGTGAGCGACATCTTCGCCGACCGCTACATGA 2100
A G D T D R D Q L S S D I F A D R Y M I

2101 TCAAGCGACCGCTGCTCCAGGCGCTGGAGCCTGACGTCGCCGGTCCGCCGGTGCTCCTGA 2160
K R P L L Q A L E P D V A G P P V L L I

2161 TCGACGAACTCGACCGCGCCGACGAGGCGTTTGAAGCCTATCTCCTGGAAATCCTCAGTG 2220
D E L D R A D E A F E A Y L L E I L S D

2221	ACTTCCAGGTGACCATCCCCGAATTCGGCACCGTGAAGGCGCCGTATCCGCCGATCGTCA	2280
	F Q V T I P E F G T V K A P Y P P I V I	
2281	TCATCACCTCCAACCGCACCCGCGAGATCCACGACGCGCTGAAGCGGCGCTGCCTCTATC	2340
	I T S N R T R E I H D A L K R R C L Y H	
2341	ACTGGGTGGATTATCCCGCCGCCGAGCGGAGCTCGCGATCGTCAAGACGCGCGTGCCCG	2400
	W V D Y P A A E R E L A I V K T R V P G	
2401	GCATCTCGACAAAGCTGTTCGCGAGCAGGTGGTGCCTTTGTCCAGGCGTTGCGCAACCAGG	2460
	I S T K L S Q Q V V R F V Q A L R N Q D	
2461	ACTTCTACAAGTCGCCGGGCGTCCGCCGAGACCATCGACTGGGCCACCGCGCTGTCCGAGC	2520
	F Y K S P G V A E T I D W A T A L S E L	
2521	TCGACGCCCCGCTCGCTGACCCCGCAGGTGGTCCGGCGACACGCTGGGCGCGCTGCTCAAGT	2580
	D A R S L T P Q V V G D T L G A L L K Y	
2581	ATCAGGACGACATCACCCGGATGCAGGGCGACACCCCTGCAGAAGGTGCTGAAGGAAGCGA	2640
	Q D D I T R M Q G D T L Q K V L K E A T	
2641	CGAGCGAGGATTGATCTTGCCTCAAATTCGCCCGCTCATTCGGGGCGCGCTAGCGAAC	2700
	S E D *	
2701	CCGGAATCCATCGGGCCGCAGAGTTCGTGGATGAATGGATTCCGGGGCTCGCGCCAAAGAG	2760
	M N G F R A R A K E	
	Orf5 ->	
2761	GCGCGCCCCGGAATGACGAGGGGATGGATACGACCCATGGCCATCAACCACCTAGCGCCC	2820
	A R P G M T R G W I R P M A I N H L A P	
2821	GAGCAGACCGAGCAGTTCCGCCACAACATCGTCCGGCTTCGCCCGCGCTTGCCTCTGCG	2880
	E Q T E Q F A D N I V G F A R A L R S A	
2881	GGCATGCCGGTCCGGCCGGGCGGGTGCATGCATGCCATGAGCGCGCTCCAGGTGATCGAC	2940
	G M P V G P G A V I D A M S A L Q V I D	
2941	ATCGGCAACCGCGCCGATGTCTTTGCCACGCTGGAGGCGATCTTCGTCAAGCGCCACGAG	3000
	I G N R A D V F A T L E A I F V K R H E	
3001	CATGCGCTGATCTTCAAGCAGGCCTTCAACCTGTTCTTCCGCGCCTCGGAGGAGTGAAG	3060
	H A L I F K Q A F N L F F R A S E E W K	
3061	CACATGCTGGATTCCGGTGCCGCTGCCGGAGCAGGCCAAGAAGAAGCCGAGGCCGGTGC	3120
	H M L D S V P L P E Q A K K K P Q A G A	
3121	CGCCGCGTGCAGGAAGCGATGTTCGCGAGCCGCGCATGACGGAGACGCCGAGCGCCAGGAG	3180
	R R V Q E A M S Q P R M T E T P Q R Q E	
3181	CAGGATCTGCGCCTGTCCGGTCTCCGACAAGGAAATCCTTCAGAAGAAGGATTTGCCAG	3240
	Q D L R L S V S D K E I L Q K K D F A Q	
3241	ATGAGCGCGGCGGAGATCAGCGAGGCCCTGCGCGCCGTGAGCGGATGCGGCTGCCGAG	3300
	M S A A E I S E A L R A V E R M R L P Q	

3301 GCCGAGCTCTTGACGCGCCGGCACCGGCCGATTCCTCGTGGCCTGCGCCTCGATCTGCGC 3360
 A E L L T R R H R P D S R G L R L D L R
 3361 CGCACGCTGCGTGCATTCATTGCGCACCGGCGGCGACATCATCGACATTCATCGCCTGGGG 3420
 R T L R A S L R T G G D I I D I H R L G
 3421 CGGATCGAGAAACCGGCGCCGATCGTGGCGCTGCTCGACATCTCGGGTTCGATGAACGAG 3480
 R I E K P A P I V A L L D I S G S M N E
 3481 TACACGCGCCTGTTCTGCATTTCTCCATGCCATCGGCGATGCGCGCAAGCGCGTCTCG 3540
 Y T R L F L H F L H A I G D A R K R V S
 3541 GTGTTCTGTTTCGGCACCCGCTCACCAACGTCACCCGCGCGCTGCGCCAGCGCGATCCC 3600
 V F L F G T R L T N V T R A L R Q R D P
 3601 GACGAGGCGCTGGCGAGCTGCTCGGCCTCGGTGAGGATTGGGCCGGCGGCACGCGGATC 3660
 D E A L A S C S A S V E D W A G G T R I
 3661 TCGGCCTCGCTGCACAACTTCAACAAATTGTGGGCGCGCCGCTCCTGAGCCAGGGCGCC 3720
 S A S L H N F N K L W A R R V L S Q G A
 3721 ATCGTGCTCCTGATCTCCGACGGGCTGGAGCGGAGGCCGATTCAGGCTCGCCTTCGAG 3780
 I V L L I S D G L E R E A D S R L A F E
 3781 ATGGACCGGCTGCACCCGCTCCTGCCGGCGGCTGATCTGGCTCAACCCGCTGCTGCGCTTC 3840
M D R L H R S C R R L I W L N P L L R F

Inserción de Tn5

3841 GGC[▽]CGCTTCGAGGCCAAGGCGCAGGGCATCAAAAATGATGCTGCCGCACGTTGACGAATTC 3900
 G G F E A K A Q G I K M M L P H V D E F
 3901 CGCCCGGTACATAATTTGAGTTCGATCCAGGAGCTGATCACGACGCTCTCCCGGCCGCTG 3960
 R P V H N L S S I Q E L I T T L S R P L
 3961 CCGCCGCATCACCGCAGCCTGATCCGCTCCGCAGCTTGAGAGGTTACCCCATGCTCGATC 4020
 P P H H R S L I R S A A * M L D R

Orf6 ->

4021 GCGACGAGGACATTCTGAGGGCGGCGGAGGACTGGCAGAAGGCCCGCCGCTGGCGTCGCGC 4080
 D E D I L R A A E D W Q K A G R G V A L
 4081 TCGCCACAGTCGTCGAGACCTGGGGCTCGGCGCCGCGCCCGGGGCTCGAGCCTCGTCA 4140
 A T V V E T W G S A P R P A G S S L V I
 4141 TCAACGACGAGGGCACGTTCTTAGGCTCGGTCTCCGGCGGCTGCGTCGAGGGCGCCGTTGG 4200
 N D E G T F L G S V S G G C V E G A V V
 4201 TCACCGAGGCCATGGACGTGATCGAGAGCGGCAAGCCCAAGATGCTGGAGTTCGGCGTCCG 4260
 T E A M D V I E S G K P K M L E F G V A
 4261 CCGACGAGACCGCCTGGAATGTGGGCTGTCTGCGGCGGCACCATCCGTGTCTTCGTCCG 4320
 D E T A W N V G L S C G G T I R V F V E

4321	AGAAGGTCGGCTAGCCGTGAAGCTCGCGATTTTGCACGAACTCAATGCCGAGCGCGCCGC	4380
	K V G *	
4381	GCGCCGCCCGGCGATCTTGGTGACGGACACCGAGAGCGGCGAGCAGCGCCTGGTCAAGGC	4440
4441	GCAGGATTTTCGCGAAAGACCCGCTGCGCGTTCGAGCTCGAAAGACAGCTTCGCATGGGC <u>AA</u>	4500
4501	<u>GAG</u> CGCCAATGTCGAGGTCGGCGGCAAGAAGCTGTTTCCTCAACGTCTACGCGCCGACCGC	4560
	M S R S A A R S C S S T S T R R P Q	
	Orf7 ->	
4561	AAAGCTCGTCATCGTCGGCGCGGTCCATATGCAGTCAGGCGCTGGCGCCGTTGGCGCGCT	4620
	S S S S S A R S I C S Q A L A P L A R S	
4621	CGCTCGGCTACGACGTCACGTGTGGTCGATCCGCGCACGGCCTTTGCAAGCGCAGAGCGCT	4680
	L G Y D V T V V D P R T A F A S A E R F	
4681	TCCCCGACATTCGCGTGGTGGCCGAATGGCCCGACACCGCGCTGCCGCCGCTCAACGTCG	4740
	P D I P L V A E W P D T A L P P L N V D	
4741	ATGCCTACACGGCTTTTCGTCGCGGTACGCACGATCCCAAGATCGACGATCCTGCGCTGC	4800
	A Y T A F V A V T H D P K I D D P A L L	
4801	TGCACGCTTTTCGAGCGCGGCTGCTTCTATATCGGCGCGCTGGGCTCGCGGAAGACCCATG	4860
	H A F E R G C F Y I G A L G S R K T H A	
4861	CCAAGCGCGGCGACCGGCTGCGGGCGCAGGGCGCCAAGGACAGCGACATCGCGCGCATCC	4920
	K R G D R L R A Q G A K D S D I A R I H	
4921	ACGCGCCCATTGGCCTTTCGATCGGCGCCGCTCTCGCCGTCGGAGATCGCGGTGTGCATCA	4980
	A P I G L A I G A V S P S E I A V S I M	
4981	TGGCCGAGATCACGGCGGTGCTTCGGCTGCCACCCAAAAGAAAAAGAAGCGGCATGAA	5040
	A E I T A V L R L P P K E K E E A A *	
5041	ATTTCGGCCCGGCGAGCCCCAAGGATGCGATCGGCGGGGTGACCGTCCACACCCTGCGCCA	5100
5101	GGGACCGCTGGTGTGAAGAAGGGCACGACGATCGGGCCCCCGATCGAGGCGCTGGAGC	5160
5161	GCGCCGGCATCA <u>AAGGA</u> CGTTCGTCGGTTCGCGGATGGAGGAGGGCGACGCTCTCCGAGGACG	5220
	V V R M E E G D V S E D V	
	Orf8 ->	
5221	TGCGGCGCCAGCATCGCGCTTTCGGTTCGGCGGCGAGGGCATCCATGTCGAGCGCGCCT	5280
	A A A S I A L A V G G E G I H V E R A F	
5281	TCACCGCCCGCCAATCTGTTTCGCGGCGCGCCCGGGCGTGTGGTGATCGACCGCGCCG	5340
	T G R A N L F A A R P G V L V I D R A A	
5341	CGGTGGATCGCATCAACAATATCGACGAGGCCATCACCTTTGCGACGCTCACCGCCTACA	5400
	V D R I N N I D E A I T F A T L T A Y K	
5401	AGCCGGTGGTTCGAGGGGAGATGGTTCGGCACGGTCAAGATCATCCCCTTCGGCGTTCGAGG	5460
	P V V E G E M V G T V K I I P F G V E G	
5461	GCGCTTTGCGCGACGCCGCGGTGAAgGCGGCCCGGGACGTCCTGAAGATCGCGCCCT	5520
	A L R D A A V K A A G R D V L K I A P Y	

5521	ACGCGATCAAGCGCGTCGTGTGGTTTCGACGCTGCTGCCGGCCTGTCTCCAAGGTGAT	5580
	A I K R V V W F R R C C R A C P P R *	
5581	CGACAAGACGCTGCGCGTCACCGCCGAGCGGCTGGCGCCTTCCGGCGCCGGCATCATCGC	5640
5641	GGAACGACGGGTCCAGCACGACGAACACGCGCTGTCGGCCGCGATCAAGGAATTGCTAGC	5700
5701	GCTCGGCGCGGAGCTCGTCATCGTGTTCGGGGCGTCCGCGATCGCGGATCGCCGCGACGT	5760
5761	GATCCCGGCGGCCGTACCGGGATCGGCGGCGAGATCGAGCATTTCGGCATGCCGGTCGA	5820
5821	TCCCGGCAATCTGCTGCTGATCGCCCGCGCCGAGGGCGTGCCGGTGTGGGCGCGCCGGG	5880
5881	CTGCGCGCGCTCGCCGGTCGAGAACGGGTTTGACTGGGTGCTGATGCGTCTGCTCGCCGG	5940
5941	CATCAAGGTGACCCGCGCCGAGCTGATGGGCATGGGCGTCGGCGGGCTCCTGATGGAGAT	6000
6001	CGTCACGCGTCCGCAGCCGCGCGAGCCCGAGATCGAGGGCAACAGCCAGGTGCGCCGCC	6060
	V A A	
	Orf9 ->	
6061	ATCGTGCTCGCGGCAGGGCGCTCGACCCGCATGGGTGGGCCGAACAAGCTGCTCGCCGAG	6120
	I V L A A G R S T R M G G P N K L L A E	
6121	CTCGACGGCAAGAAGCTGGTGCAGATCGCGACCGAGCAGGCGCTGGCCTCCAAGGCATCC	6180
	L D G K K L V R I A T E Q A L A S K A S	
6181	GAGGTGATCGTCGTACCGGCCATCAGACCGAACTGGTCGAGCAGGCGCTGCAAGGCTTG	6240
	E V I V V T G H Q T E L V E Q A L Q G L	
6241	AAGGTGAAATTGCCCCGAATCCGGATTTGCGCGGCGGCATCGCAAGCTCGGTCAAGGCC	6300
	K V K F A R N P D F A G G I A S S V K A	
6301	GGCATCGCGGCCGTGCCCCGAAGCTT 6325	
	G I A A V P E A	

Figura 1.11. Secuencia de nucleótidos del fragmento *Bgl* II-*Hind* III de *B. japonicum* que contiene los genes *cox*

La secuencia está numerada desde el sitio *Bgl* II hasta el sitio *Hind* III. Se indica también la secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de nucleótidos. Los codones iniciadores de la transcripción se indican en **negrita** y los terminadores con un asterisco. Las posibles secuencias Shine-Dalgarno aparecen subrayadas. Los rombos indican aminoácidos implicados en la constitución de motivos específico.

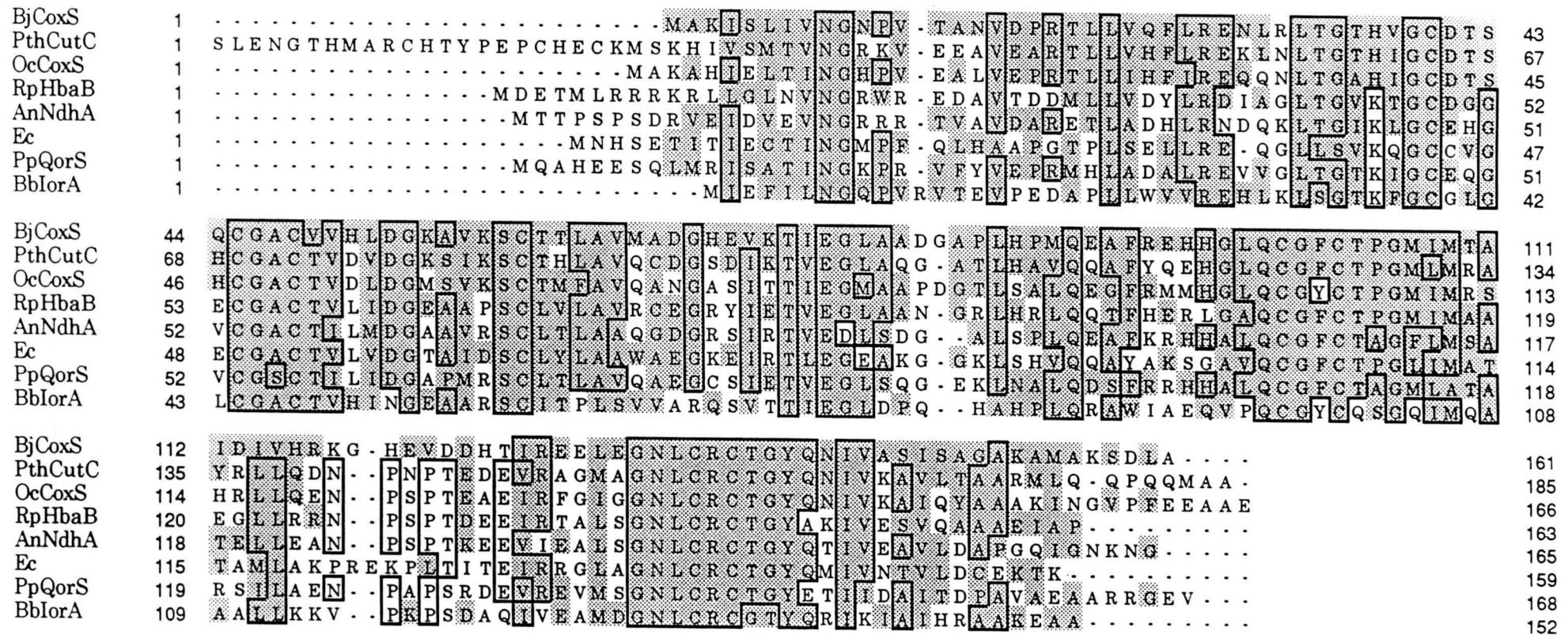


Figura 1.12. Alineamiento de CoxS de *B. japonicum* con proteínas homólogas de otros microorganismos.

BjCoxS, Subunidad S de la enzima CODH de *B. japonicum*; PthCutC, subunidad S de la enzima CODH de *P. thermocarboxidovorans* (Pearson et al., 1994); OcCoxS, subunidad S de la enzima CODH de *O. carboxidovorans* (Shübel et al., 1995); RpHbaB, subunidad S de la enzima 4-OHbenzoil-CoA reductasa de *R. palustris* (Gibson et al., 1997); An NdhA, subunidad S de la enzima nicotina deshidrogenasa de *A. nicotinovorans* (Grether-Beck et al., 1994); PpQorS, subunidad S de la enzima isoquinolina 2-oxidoreductasa de *P. putida* (Bläse et al., 1996); BbIorA, subunidad de menor tamaño de la enzima isiquinolina 1-oxidoreductasa de *B. diminuta* (Lhemann et al., 1995). Los aminoácidos idénticos se marcan en cajas. Los aminoácidos similares entre CoxS de *B. japonicum* y las de otras enzimas se presentan sombreados.

BjCoxM	1	- - MYEERKYHRP	PGTVRQ	AAANLLVKN	- EDAKVI	AGGHTL	IPV	MRQLAS	PPHLVDL	SHIEGL	NAIEMKGRS	VVIG	70																																																														
OcCoxM	1	MI	PGSE	DYHRPK	SIADAV	ALLTKL	GEDAR	PLAGGHS	LIP	MKTR	LATPEHLVDL	RDIGD	VGI	REEGT	DVVIG	73																																																											
AnNdhD	1	MKL	PAIRY	ASPA	SI	EDACD	LLSTD	- EDSKI	IAGG	SLLP	VAM	RLAQ	ESV	V	DLGNV	PG	TR	LEE	V	G	DY	V	R	F	G	72																																																	
PthCutB	1	MI	PPAF	AYH	APRT	LPDA	IRLL	SEL	GD	DAK	LL	AGGHS	LLP	M	M	K	L	R	S	P	L	P	R	S	T	S	T	A	S	R	N	F	A	G	Y	G	K	K	P	A	L	S	A	L	G	73																													
PpQorM	1	M	K	F	P	A	F	S	Y	R	A	P	A	S	L	Q	E	V	I	Q	V	L	A	D	D	-	P	D	A	R	I	I	A	G	G	S	L	L	P	L	L	A	F	R	E	V	P	S	C	L	V	D	L	R	N	V	S	E	L	F	E	I	S	Q	S	A	G	I	L	S	V	G	72		
BjCoxM	71	A	T	A	K	H	A	E	V	A	T	S	A	V	V	G	E	A	I	P	A	L	A	S	L	A	G	G	I	G	D	P	A	V	R	H	K	G	T	I	G	G	S	L	A	N	N	D	P	T	A	D	Y	P	A	V	L	A	L	G	A	T	I	V	T	N	-	-	-	-	K	R	R	139	
OcCoxM	74	A	M	T	T	H	A	L	I	G	S	D	F	L	A	A	K	L	P	I	R	E	T	S	L	L	I	A	D	P	Q	I	R	Y	M	G	T	I	G	N	A	A	N	G	D	P	G	N	D	M	P	A	L	M	Q	C	L	G	A	A	Y	E	L	T	G	P	E	G	A	R	I	146			
AnNdhD	73	P	M	V	T	H	A	T	I	V	N	S	P	A	V	A	K	H	L	P	M	M	A	A	A	G	R	H	I	A	H	P	Q	I	R	N	R	G	T	I	G	G	S	L	A	H	G	D	A	A	G	E	W	P	L	V	L	L	A	L	N	G	M	V	E	V	Q	S	V	R	G	R	T	145	
PthCutB	74	A	M	T	T	E	N	E	L	I	A	S	E	L	L	K	E	K	V	P	L	L	P	E	A	A	Q	L	I	A	D	P	Q	V	R	N	R	G	T	I	G	G	S	L	A	H	G	D	A	A	G	E	W	P	L	V	L	L	A	L	N	G	M	V	E	V	Q	S	V	R	G	R	T	145	
PpQorM	73	A	M	V	T	H	E	R	N	K	T	D	P	T	V	A	K	C	V	P	I	L	P	K	V	L	A	H	V	A	H	Q	A	V	R	N	R	G	T	I	G	G	S	L	A	H	A	D	A	G	A	E	M	P	F	L	M	A	T	L	G	A	T	M	Y	I	A	S	A	G	V	R	S	145	
BjCoxM	140	L	K	A	E	E	Y	L	Q	G	L	F	R	T	A	L	E	A	D	E	I	I	T	K	V	M	F	P	L	P	K	-	-	-	A	A	Y	I	K	F	R	N	Q	A	S	R	Y	A	L	V	G	V	E	V	A	R	R	P	S	-	-	-	-	D	V	R	V	A	V	T	G	A	204		
OcCoxM	147	V	A	A	R	D	Y	Y	Q	G	A	Y	F	T	A	I	E	F	G	E	L	L	T	A	I	R	I	P	V	P	T	G	H	G	Y	A	E	K	L	K	R	K	I	G	D	Y	A	T	A	A	A	V	V	L	T	M	S	G	G	K	C	V	T	A	S	I	G	L	T	N	V	219			
AnNdhD	146	L	E	A	D	L	F	V	G	P	Y	M	T	S	L	A	A	E	I	L	T	D	V	W	L	P	S	R	P	N	G	-	-	W	G	Y	G	E	F	A	R	R	S	G	D	Y	G	L	A	N	V	A	V	L	S	T	A	D	S	R	I	S	D	V	R	I	A	V	G	G	A	216			
PthCutB	147	V	K	A	T	E	F	F	Q	D	T	Y	M	T	A	L	A	E	N	E	L	L	T	A	L	L	V	P	P	M	A	A	G	T	G	V	A	Y	T	K	L	K	R	K	T	G	D	W	A	T	A	G	A	A	V	I	L	N	M	S	A	G	K	V	T	Q	A	P	I	A	L	T	N	V	219
PpQorM	146	V	S	A	T	D	F	M	K	G	H	Y	F	T	D	L	E	A	G	E	V	L	V	R	V	E	L	P	I	P	A	L	H	-	-	W	E	F	D	E	Y	A	R	K	G	D	Y	A	L	V	M	A	A	A	G	L	S	M	Q	G	R	C	V	A	A	R	I	A	L	G	A	V	216		
BjCoxM	205	G	S	E	G	V	F	R	V	T	A	F	E	E	A	L	K	K	R	F	S	A	K	A	L	D	G	I	E	V	P	A	E	G	N	-	-	S	D	I	H	G	S	A	E	Y	R	A	H	L	I	G	V	L	T	R	R	A	V	D	A	A	N	A	K	E	268								
OcCoxM	220	A	N	T	P	L	W	A	E	E	A	G	K	V	L	V	G	T	A	L	D	K	P	A	L	D	K	A	V	A	L	A	E	A	I	T	A	F	A	S	D	G	R	G	F	A	E	Y	R	T	K	M	A	G	V	M	L	R	R	A	V	E	R	A	K	A	R	A	K	N	288				
AnNdhD	217	V	G	K	I	Q	R	V	P	D	A	E	D	V	L	N	G	S	E	L	S	P	E	R	A	E	A	A	S	E	A	G	A	K	S	L	S	Y	I	S	D	I	H	G	S	A	E	Y	R	H	G	L	V	Q	E	L	I	R	R	T	I	V	E	A	G	A	R	T	D	284					
PthCutB	220	A	P	T	A	L	R	A	S	A	A	A	G	L	I	G	R	P	I	D	A	A	S	L	N	D	V	A	T	A	V	R	A	I	C	D	P	A	E	D	L	R	G	D	A	E	Y	K	T	A	M	A	A	E	M	V	K	R	A	I	Q	K	A	A	R	C	H	287							
PpQorM	217	E	E	R	A	H	Q	A	I	R	A	N	D	F	L	V	G	K	V	I	D	E	S	T	A	A	T	A	A	E	L	A	T	E	G	L	E	P	R	S	D	I	H	G	S	R	D	L	R	L	S	L	A	K	A	I	T	Q	R	V	I	L	K	A	A	Q	G	A	M	Y	A	G	A	288	

Figura 1.12. Alineamiento de CoxM de *B. japonicum* con proteínas homólogas de otros microorganismos.

BjCoxM, Subunidad S de la enzima CODH de *B. japonicum*; OcCoxS, subunidad M de la enzima CODH de *O. carboxidovorans* (Shübel et al., 1995); An NdhB, subunidad M de la enzima nicotina deshidrogenasa de *A. nicotinovorans* (Grether-Beck et al., 1994); PthCutB, subunidad M de la enzima CODH de *P. thermocarboxidovorans* (Pearson et al., 1994); PpQorM, subunidad M de la enzima isoquinolina 2-oxidoreductasa de *P. putida* (Bläse et al., 1996). Los aminoácidos idénticos se marcan en cajas. Los aminoácidos similares entre CoxS de *B. japonicum* y las de otras enzimas se presentan sombreados.

orf4 Bj	1	M T S A A L P A S V D A M L E L L T S R G Y L A E R S L A T V T Y L S L R M G R P L F L E G E A G V G K T E I A K V L S A	61
orf4 Oc	1	M R H . . . H A E R D K V A E R L A Y A G Y I P D R D L A T A V W L M E S L S R P L L E G E A G V G K T E V A L T L A Q	58
orfRhsp	1	M S G R S F S S G I E . V K D A I R E Q D Y I A D D E F A V V V H L A T A L G R P L L E G P A G V G K T E L A K S L A A	60
orf4 Bj	62	A L G R K L I R L Q C Y E G L D V S S A V Y E W N S A A Q M I A I R M A E A A G D T D R D Q L S	109
orf4 Oc	59	A N G A R L I R L Q C Y E G L D Q N A A L Y E W N Y Q R Q L L A I K T R E S R A D A V D V I E	105
orfRhsp	61	I G G R K L V R L Q C Y E G L D D N R A L Y E W D Y A N E L L H V Q M L R D R I S D Q V S E F D S V A E A S K F L A D Q D	121
orf4 Bj	110	S D I F A G R Y M I K R P L L Q A L E P D V A G P P V L L I D E L D R A D E A F E A Y L L E I L S D F Q V T I P E F G T V	170
orf4 Oc	106	D H I F S E K F L L E R P L L A A I R Q . . P K S A V L L I D E V D R A D E E F E A F L L E L L S D Y Q V S I P E L G T I	164
orfRhsp	122	F G L Y S E N F L F V R P L L E A I L S . . P D P V V L L V D E V D R T E E S M E A L L L E I L A E Q Q I T I P E V G T F	180
orf4 Bj	171	K A P Y P P I V I I T S N R T R E I H D A L K R R C L Y H W V D Y P A A E R E L A I V K T R V P G I S T K L S Q Q V V R F	231
orf4 Oc	165	H A T T I P Q V I L T S N G T R E L S D A L R R R C L Y H Y V D Y P D V E R E A R I I T T R M P N I D V A L A L Q I A R M	225
orfRhsp	181	V A R S Q P W V I L T S N D T R E L S P A L K R R C L H Y H L G Y P T S E R E R E I V T A R A P E V D A A T A T E V V E L	241
orf4 Bj	232	V Q A L R N Q D F Y K S P G V A E T I D W A T A L S E L D A R S L . . T P Q V V G D T L G A L L K Y Q D D I T R M Q G D T	290
orf4 Oc	226	I E G I R K E D L R K S P G V A E T I D W A A A L A G L G V E D L R A E P E A V F E T M M C L I K T V E D K S R V T R E V	286
orfRhsp	242	A R I L R D L P L R K S P S I S E V I D A A R A A T V L A A S G F D T A S D A K V R D I L L T A L L K Y S S D V T L A K E	302
orf4 Bj	291	L Q K V L K E A T S E D H	303
orf4 Oc	287	S D R L L G K V A	295
orfRhsp	303	R F D G K L L E S P S R D G G E P I E R S T V A S K P A N T T T A V F R G T G G R D P H Q Q G I R G G S G I R S T R	360

Figura 1.14. Alineamiento de Orf4 de *B. japonicum* con proteínas homólogas de otros microorganismos.

BjOrf4, Región 3' de CoxMS de *B. japonicum*; OcOrf4, región 3' de los genes estructurales de la enzima CODH de *O. carboxidovorans* (Schübel et al., 1995); RhspOrf1, región 3' del gen *tchE* de *Rhodococcus* sp. (Nagy et al., 1995). Los aminoácidos idénticos se marcan en cajas. Los aminoácidos similares entre Orf4 de *B. japonicum* y las de otras enzimas se presentan sombreados.

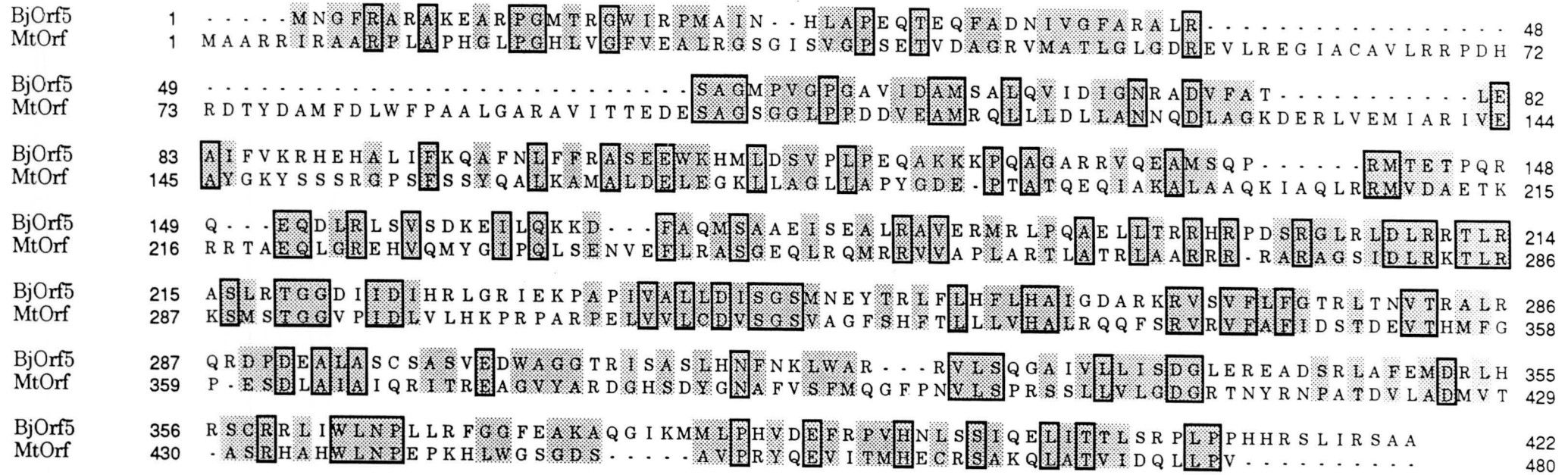


Figura 1.15. Alineamiento de Orf5 de *B. japonicum* con una proteína homóloga de *M. tuberculosis* (Z8141519).

Los aminoácidos idénticos se marcan en cajas. Los aminoácidos similares entre Orf4 de *B. japonicum* y las de otras enzimas se presentan sombreados.

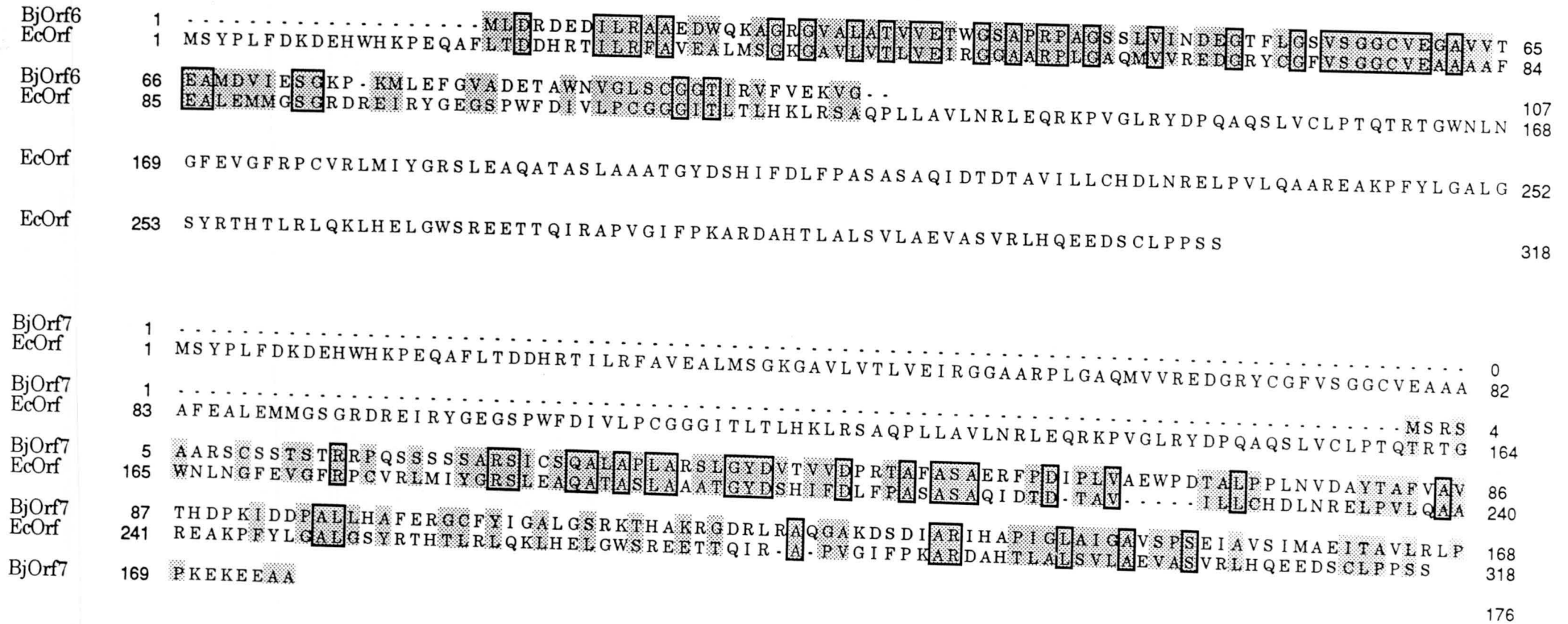


Figura 1.16. Alineamiento de Orf6 de *B. japonicum* con una proteína homóloga de *E. coli* (Situada en la región 5' de un *orf* homólogo a CoxL).

Los aminoácidos idénticos se marcan en cajas. Los aminoácidos similares entre Orf4 de *B. japonicum* y las de otras enzimas se presentan sombreados.

Figura 1.17. Alineamiento de Orf7 de *B. japonicum* con con la misma proteína que Orf6, pero con la parte carboxi-terminal.

Los aminoácidos idénticos se marcan en cajas. Los aminoácidos similares entre Orf4 de *B. japonicum* y las de otras enzimas se presentan sombreados.

2. Identificación y caracterización de genes *pca* implicados en el metabolismo de protocatheuato

Durante la búsqueda del gen *coxL* de *B. japonicum*, la secuenciación hacia la izquierda del sitio *Bgl* II del plásmido pML12 (Figura 2.1), puso de manifiesto la existencia, a 408 nucleótidos de distancia, de tres marcos abiertos de lectura (ORFs) implicados en el metabolismo de compuestos fenólicos e hidroxiaromáticos como p-hidroxi-benzoato, quinato y shikimato. En las especies de la familia *Rhizobiaceae*, así como en otras bacterias del suelo, estos compuestos se metabolizan via protocatheuato para formar succinil-CoA y acetil-CoA (Parke y Ornston, 1984; Parke, 1997).

Los tres ORFs que intervienen en el metabolismo del protocathuato ocupan una región de 3'6 kb, desde *Bgl* II hasta el sitio *Pst* I del plásmido pML12 (Figura 2.1), y por la elevada homología que presentan con los genes *pca* de *Acinetobacter calcoaceticus* y *Pseudomonas putida* (Hartnett et al. 1990; Hartnett y Ornston, 1994; Yeh et al. 1994) se les denominó de igual manera, esto es *pcaB*, *pcaD* y *pcaC*.

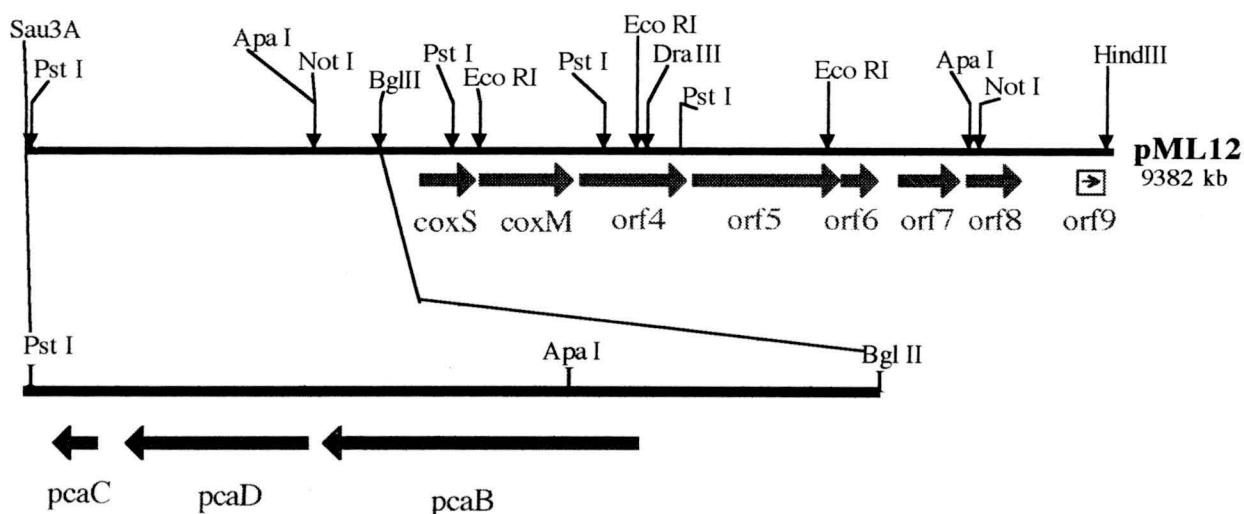


Figura 2.1. Localización de los genes *pca*, en relación con la región *cox* en el plásmido pML12.

2.1. *pcaB*.

Este ORF presenta el inicio de la traducción a 408 nucleótidos a la izquierda del sitio *Bgl* II, utiliza como inicio de la transcripción el codon AUG y no presenta una secuencia Shine-Dalgarno bien conservada. El codon de terminación es UGA (Figura 2.2). *pcaB* está compuesto por 1.356 nucleótidos, y

codificaría para una proteína de 451 aminoácidos, con un tamaño molecular calculado de 47.208. De acuerdo con los alineamientos de las secuencias aminoacídicas (Figura 2.3), la proteína PcaB de *B. japonicum* tiene 53 % de identidad (70% de similitud) con la enzima β -carboxi-cis,cis-muconato-cicloisomerasa (también denominada 3-carboxi-muconolactona) codificada por el gene *pcaB* de *P. putida* (Williams et al. 1992) y un 45% de identidad (62% de similitud) con la misma enzima codificada por el gen *pcaB* de *A. calcoaceticus* (Hartnett y Ornston, 1994; Kowalchuck et al. 1994). Dada la identidad con estas enzimas, es posible que la proteína PcaB de *B. japonicum* sea una β -carboxi-cis,cis-muconato-cicloisomerasa implicada en la conversión de β -carboxi-cis, cis-muconato a γ -carboxi-muconolactona.

En PcaB de *B. japonicum* el agrupamiento GSSTMPHKRN, correspondiente a los residuos 278 a 287 (Figura 2.3) es equivalente al motivo G-S-X₂-M-X₂-K-X-N, que es típico de la clase II de las enzimas con actividad fumarasa, motivo que parece estar implicado en la actividad catalítica de la enzima (Williams et al. 1992).

2.2. *pcaD*.

Este ORF se localiza a 73 nucleótidos de *pcaB*. Utiliza como inicio de la traducción el codon AUG situado a 1.836 nucleótidos delante del sitio *Bgl* II y el pentanucleótido GGAGA, a 6 nucleótidos del codon de iniciación, como posible secuencia Shine-Dalgarno. El codon de terminación es TGA (Figura 2.2). *pcaD* está compuesto por 1.356 nucleótidos y puede codificar una proteína de 260 aminoácidos, con un tamaño molecular calculado de 28.417.

Basándonos en los alineamientos que se presentan en la Figura 2.4, se puede indicar que la proteína PcaD muestra identidades de un 39% (59% de similitud) y un 37% (56% de similitud) con las proteínas CatD y PcaD de *A. calcoaceticus*, respectivamente, que se han identificado, en ambos casos, como la enzima β -ceto adipato enol-lactona hidrolasa, que cataliza la hidrólisis de β -ceto adipato enol-actona a β -ceto adipato (Hartnett y Ornston, 1994). CatD y PcaD poseen la misma actividad catalítica, aunque los genes *pca* son los responsables de la utilización de 4-hidroxi-benzoato y los *cat* están implicados en el metabolismo del catecol (Hartnett y Ornston, 1994). Es interesante mencionar que PcaD de *B. japonicum* presenta un 28% de identidad (51% de similitud) y un 26% de identidad (47% de similitud) con el producto del gen *phaB* de *P. aeruginosa* (Timm y Steinbuechel, 1992) y *P. oleovorans* (Huisman

et al. 1991), que es, en ambos casos, una enzima implicada en el metabolismo de poli-(3-hidroxi-alcanoatos).

La enzima dienol-lactona hidrolasa cataliza la hidrólisis de dienol-lactona a maleil-acetato durante la utilización de compuestos halogenados via 3-clorocatecol (Schidth y Knackmuss, 1980). La secuencia de aminoácidos Q-G-Y-A-A-V-C₁₂₃ en la enzima dienol-lactona hidrolasa de *Pseudomonas* sp. B13 es similar a la secuencia N-terminal QGYAANC de la enzima enol-lactona hidrolasa de *P. putida* (Yeh et al. 1980; Frantz et al. 1987). Secuencias similares, siempre conteniendo un residuo de citosina, se han identificado en CatD de *A. calcoaceticus* (E-G-Y-A-S-C-C₁₉₁), en PcaD de *A. calcoaceticus* (Q-G-Y-A-N-A-C₁₉₀) y en PcaD de *B. japonicum* (E-G-Y-L-A-C-C₁₈₅) (Figura 2.4). Puesto que la mutación en la cisteína-123 de la dienol-lactona hidrolasa de *Pseudomonas* sp. B13 resulta en la pérdida de la actividad catalítica de la enzima (Pathak et al. 1991), es posible que las secuencias mencionadas sean necesarias para el funcionamiento de esta clase de hidrolasas.

3.3. *pcaC*.

Se localiza a 128 nucleótidos de *pcaD*. Presenta el inicio de la traducción a 2.746 nucleótidos de distancia del sitio *Bgl* II, utiliza como inicio de la traducción el codon AUG y su codon de terminación es UGA. A 6 nucleótidos del codon de iniciación, el pentanucleótido GGAGAA podría actuar como posible secuencia Shine-Dalgarno. *pcaC* está compuesto por 189 nucleótidos que codificarían una proteína de 63 aminoácidos de tamaño molecular calculado 7.229.

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos (Figura 2.5) de la proteína codificada por este ORF presenta un 40 % de identidad (68% de similitud) con la proteína PcaC de *A. calcoaceticus* (Hartnett et al. 1980) y un 52% de identidad (70% de similitud) con la secuencia parcial disponible de la proteína codificadas por el gen *pcaC* de *P. putida* (Yeh et al. 1994). Dado que el gen *pcaC*, tanto de *A. calcoaceticus* como el de *P. putida*, codifica la enzima γ -carboxi-muconolactona descarboxilasa, es posible que el gen *pcaC* de *B. japonicum* codifique una enzima similar capaz de llevar a cabo la descarboxilación de γ -carboxi-muconolactona para producir β -ceto adipato-enol-lactona. Hay que hacer notar que mientras la secuencia de la proteína PcaB determinada en *A. calcoaceticus* es de 134 aminoácidos, la secuencia aminoacídica de PcaC de *B. japonicum* es sólo de 63 aminoácidos, por lo que se

desconoce si la secuencia del gen *pcaC* de *B. japonicum* corresponde a un gen funcional. Hay que indicar, sin embargo, que se ha localizado una posible secuencia de terminación de la transcripción, independiente del factor *rho*, a unos 40 nucleótidos del codon de terminación TGA del gen *pcaC* (Figura 2.2).

La cepa de *B. japonicum* USDA110 creció normalmente cuando se cultivó en medio mínimo con 4-hidroxibenzoato o protocatehuato como única fuente de carbono. Estos resultados coinciden con aquellos previamente publicados que indican que tales compuestos pueden ser utilizados como sustrato por diferentes especies de la familia *Rhizobiaceae* (Parke y Ornston, 1984; Wong et al. 1991; van Rossum et al. 1995, Parke, 1997)

Del análisis de la secuencia de nucleótidos se puede deducir que los genes *pca* de *B. japonicum* se transcriben en dirección opuesta a los genes *cox* (Figura 12) y parecen disponerse formando un único operón, *pcaBCD*. Dado que a la derecha de los genes *pca* se encuentran los genes *cox* (Figura 2.1), y la extensión de la secuencia a la izquierda del gen *pcaC* no ha permitido la identificación de otros genes implicados en el metabolismo del protocatehuato, se puede concluir que los genes *pcaBDC* se encuentran separados del resto de genes que intervienen en la ruta de utilización del 4-hidroxibenzoato. En *B. japonicum* se han identificado los genes *pcaHG*, que codifica para la enzima 3,4 protocatehuato dioxigenasa, responsable de la síntesis de β -carboxi-cis,cis-muconato a partir de protocatehuato, aunque se carece de más información al respecto por no haberse publicado dichas secuencias.

La organización de los genes *pca* difiere en los distintos microorganismos estudiados (Parke, 1997). Mientras que en *A. calcoaceticus* se encuentran organizados en el operón *pcaIJFBDKCHG*, en *P. putida* se disponen en cinco operones *pcaIJ*, *pcaK*, *pcaF* y *pcaTBDC*, y se agrupan en cuatro operones *pcaJI*, *pcaR*, *pcaQ* y *pcaDCHGB*, en *A. tumefaciens*. En algunos casos no se conoce la localización precisa de unos operones respecto a otros. De acuerdo con nuestros resultados (Figura 2.2), la organización de los genes implicados en la degradación de protocatehuato en *B. japonicum* es similar a la descrita en *P. putida*, con la excepción de la presencia en esta última del gen *pcaT*, que parece codificar para la proteína transportadora de β -cetoadipato al interior celular (Buck y Houghton, 1996).

1	AGATCTTGTAGCCGTTTCGGCGGATCGAGATCGGAGAGCGTCACCTTGCCCTTGAAGCGCG	60
61	CCGACACCGGGCCGACCTTCATTTTCGCTGTGGCGCGAAAGCCGCCGTCGTCGGTCTTCT	120
121	CCAGCTCCTCGCAGCCGGGATGCAGGCCTTCAGCACCTCGGGATCGTTGAGCTTGGCCC	180
181	ACACAGCCTCGCGCGGCGCCGAAGCTGGACTTCGCCGTTTCATCGTCATGGCCATGGGGT	240
241	GCCTCCCGGGATCGTGCAATTATAATGCTGTTCAAGTAACGCACGTAGGCCGCAAAGGAA	300
301	AGGGCGGCCTCCGGCCACGTGCAATGCATATTCGCAACTGCAAAAAATCTTGCGCGGTCG	360
361	GTTTTGGATTGGCACAGGCGGGCCATGATGGTTAGGTCCC CGCAACATGAGCACAGCCC	420
M S T A L		
PcaB ->		
421	TCTCCCCCTGCTTGCGCCGATGCTGTGCGAGCGCCGCATGCGCGCCGCTGCGACGACC	480
	S P L L A P M L S S A A M R A A C D D R	
481	GGTCAACGCTCCAGAACATGCTCGATTTTGAGGCAGCCTTGGCGCGCGCCGAAGCCGCCA	540
	S T L Q N M L D F E A A L A R A E A A T	
541	CCGGCGTGATTCCC CGCGCCGCGTGGGCCCGATCGAAACCGCCTGCAAGGCGGCTACCT	600
	G V I P A A A V G P I E T A C K A A T F	
601	TTGACATCGCCGCGCTGGCCGAGGCCGCGACACGGTCCGGCAATCTCGCGATTCCCCTGG	660
	D I A A L A E A A T R S G N L A I P L V	
661	TCAAGGCGCTGACCGCCAACGTGCGGAAGGCCGATGCGGAGGCCGCACGCTACGTGCATT	720
	K A L T A N V A K A D A E A A R Y V H W	
721	GGGGCGGACCAGCCAGGACGTCATCGACACCGCGACCATGCTCACGCTGCGCGCCGCCA	780
	G A T S Q D V I D T A T M L T L R A A I	
781	TCGACGCGCTGGATGCCGACCTCAGCCGCGCCATCAAGGGTTTTGCCGCACTGGCGCGCA	840
	D A L D A D L S R A I K G F A A L A R N	
841	ATCATCGCAACACCGCAATGGTGGCGCGGACCTGGCTCCAGCACGCGCTGCCGATGCCGT	900
	H R N T A M V A R T W L Q H A L P M P F	
901	TCGGACTCAAGGCCGCCGAATATGCCGCAAGTCTTGCCCGCGCCGCTGCCGCTCAGGC	960
	G L K A A E Y A A S L A R A R C R L R R	
961	GGCTCTCCCGCGACGGCTCGCGCTGCAATTCGGCGGCGCGGCCGGCACGCTCGCGGCC	1020
	L S R D G L A L Q F G G A A G T L A A L	
1021	TCGGCGACAAGGGGCTCGTCTCGCGGAGCGACTGGCGCAAGAGCTCAACCTGCCGCTGC	1080
	G D K G L V V A E R L A Q E L N L P L P	
1081	CGGAAGCACCTGGCACACCCATCGCGACCGCATCGCGGAAGCCGCATCGGCCCTTGCGA	1140
	E A P W H T H R D R I A E A A S A L A I	
1141	TTCTCGCCGGAAGCTGCGGCAAGATCGCGCGCGACGTCTCGCTGATGATGCAGACCGATG	1200
	L A G S C G K I A R D V S L M M Q T D V	

1201 TCGCCGAGGCGTTTCGAGCCGGCCGGCGAAGGCCGGCGGCTCCTCGACCATGCCGCACA 1260
A E A F E P A G E G R G G S S T M P H K

1261 AGCGCAACCCTGTCGAGCCGCAAGCGCGCTGGGATGTGCCACCATGGCCCCGAGCTCG 1320
R N P V A A A S A L G C A T M A P Q L A

1321 CCGCGaCGATTTTTGCGCGCAGGTACAGGACCACGAGCGCAGCGCCGGCCCCCTGGCATG 1380
A T I F A A Q V Q D H E R S A G P W H A

1381 CGGAATGGCCGACGCTGCCTCAACTGATGCTGGTCACTTCGGGCGCGCTCGCCGCCATCG 1440
E W P T L P Q L M L V T S G A L A A I V

1441 TCGACATCGCCGAGGGCCTGGACGTCGATGCCGCGCATGCGCAGCAATCTCGATGCGA 1500
D I A E G L D V D A A R M R S N L D A T

1501 CGCACGGGCTGATCATGGCCGAGGCGGTACCTTTGCGCTGGCCGAGAGGATCGGCAAGA 1560
H G L I M A E A V T F A L A E R I G K S

1561 GCGATGCGCATCATCTCATCGAGGCCGCGAGCAAGCGCGGGTCGCCGAGAAGAAGCATC 1620
D A H H L I E A A S K R A V A E K K H L

1621 TGC GCGAGGTTCTCGCGGCCGATTTCGAGGTACAGCGCATCTTTCCGCCGAAAAAATTG 1680
R E V L A A D S Q V T A H L S P E K I A

1681 CGGCATTGTTTCGAGCCGATGGCCTATCAAGGGGCTTCCCAAGCCATGATCGACCCGGCTGC 1740
A L F E P M A Y Q G A S Q A M I D R L L

1741 TCGACAGCCTCGAGCGAGATTGATTGTTTGGAGCATGATCCCTTCGGAAAACCGTTCCACA 1800
D S L E R D *

1801 CTTTTCCGGATCATGCTCCAGAACGGAGACGCCGCATGCCCATGATCGATGCCGACGGTT 1860
M P M I D A D G C

PcaD ->

1861 GCCTGATCAACGTCTCCGTCTGAAGGCCGCGACGGCGGGCCGACCTTGATGCTGTCCAATT 1920
L I N V S V E G R D G G P T L M L S N S

1921 CGCTCGGCTGCACGCTTCAGATGTGGGAGCCGAGATGAAGGCGCTGACACAGGTGTTCC 1980
L G C T L Q M W E P Q M K A L T Q V F R

1981 GCGTCATCCGCTATGACCGCCGCGCCACGGCAAGTCGAACGTTCCCCCGGCCCTTACA 2040
V I R Y D R R G H G K S N V P P G P Y T

2041 CGATGGAGCGCTTCGGCCGCGACGTGCTGGCGATCCTCAACGATCTCAACATCGAGAAGG 2100
M E R F G R D V L A I L N D L N I E K V

2101 TGCATTGGTGCGGCCTGTCGATGGGCGGCATGGTCGGACAATGGCTGGGCGCGAATGCGC 2160
H W C G L S M G G M V G Q W L G A N A P

2161 CGGAGCGCTTCGGCAAGCTCATCTCGCCAACACCTCTGCTACTATGCCGAGCCGACCA 2220
E R F G K L I L A N T S C Y Y A E P T K

2221 AATGGCTGGAACGCATCGATGCCGTGAAGAAGGGCGGCATCGCGGCGGTGGCCGATGCCG 2280
W L E R I D A V K K G G I A A V A D A V

2281	TGATCGCGGGCTGGCTCACCCAGGATTTCCGCGAGCGCGAGCCTGACATCACCGCGCGGA	2340
	I A G W L T Q D F R E R E P D I T A R M	
2341	TGAAAGCGATGCTGCTCGCCTCACCCGTGGAGGGCTATCTCGCCTGCTGCGAGGCGCTGT	2400
	K A M L L A S P V E G Y L A C C E A L S	
2401	CGACGCTCGACCAGCGCGAGCTGCTGCCAAAGATCAAGAGCCCGACATTGGTGATCGCCG	2460
	T L D Q R E L L P K I K S P T L V I A G	
2461	GCCGCCACGACATGGCGACGCCGATCTCGGCGGGCGAGCTGATCCGCTCGAAAATTCCCCG	2520
	R H D M A T P I S A G E L I R S K I P G	
2521	GCGCCAACATGACCATCATCGACGCCGCCCATATTTCCAATGTCGAGCAGCCGCACGCGT	2580
	A N M T I I D A A H I S N V E Q P H A F	
2581	TCACCGATGCGGTGGTGGGGTTCTTGACGCAACGCTGATTGCGCCTGTCGTCATCCGGA	2640
	T D A V V G F L T Q R *	
2641	GCGATGCAAAGCATCGTCCCCGGAATCTCGATCGGCATTCACAACCTCGAGATTCCGGGT	2700
2701	TCGCCTCTTCGAGGCGCCCCGGAATGACTGATCC <u>GAGAAA</u> CAAACATGGACGACCAGAA	2760
	M D D Q K	
2761	GCGCCGCGATGCCGGCATGAACGTGCGCCGCAAGGTGCTGGGCAATGCCTGGGTGACAA	2820
	R R D A G M N V R R K V L G N A W V D K	
2821	ATCAGTCGCCAATCGCAATGCCTTCAACACGGATTTCCAGGATCTGATCATTGATCATCG	2880
	S V A N R N A F N T D F Q D L I I D H R	
2881	CGCTTCGCTTCCACATACGGCAAGAACTTGGCTTGCCGGTCTGAAGCAGGTCGACTGAAA	2940
	A S L P H T A R T W L A G L K Q V D *	
2941	GGCCATTTATGTCCGAACTGATCTATAACAGCGGCTTGGTCCGCCCAAGTTACGGCGGTC	3000
3001	AACTGCCTGCAGACTCTGCGACTCTGGTTTCTTTGGCAAAGGCAGATC 3048	

Figura 2.2. Secuencia de DNA del fragmento *Bgl* II/*Sau* 3A de *B. japonicum* que contiene los genes *pcaB*, *pcaD* y *pcaC*.

Se indica también la secuencia de aminoácidos correspondiente a los productos de *pcaB*, *pcaD* y *pcaC*. Los motivos se encuentran señalados en cuadros. Las posibles secuencias Shine-Dalgarno se encuentran subrayadas y en negrita el inicio de la proteína.

BjPcaB	1	VPRNMSTALSPLLAPMLSSAAMRAACDDRSTLQNM LDFE AALARAEAATGVIPAAAVGPIETACKA	66
AcPcaB	1MSQLYASLFYQRDVTEIFSDRALVSYMVEAEVLAQQQAQVGVIPQSAIAN-CDRTCQQ	57
PpPcaB	1MTNQLEDAYETAFA MREIFSDRGR LQGMLDFE AALARAEAAGLVPHSAVA AIEAACKA	59
BjPcaB	67	AT...FDIAALAEAA TRSGNLA IPLVKAL TANVAKADA EAARYVHWGATSQDV IDTATM LTLRAA	128
AcPcaB	58	KTAIDKIDFDALATA TGLAGNIA I P FV KQLTAI VKDADED EAARYVHWGATSQDILDTACILQCRDA	123
PpPcaB	60	ER...YDVGALANA IATAGNSA IPLVKALGKVIA SGVPEA ERYVHLGATSQDAMD TGLVLQLRDA	121
BjPcaB	129	IDALDADLSRAIKGFAALARNHRNTAMVARTWLQHALPMPFGLKAAEYAAASLARARCRRLRRLSRDGG	194
AcPcaB	124	LAIVQNQVQQCYETA L SQAQTYRHQVMMGRTWLQQA LPIITLGHKLARWASAFKRDLDRI NAIKARV	189
PpPcaB	122	LDLIEADLGLK LADT L SQA LKHADTPMVGRTWLQHATPVITLGMKLAGV L GALT RHRQRLEQLGPPC	187
BjPcaB	195	LALQFGGAAGT L AALGDKGLVVAERLA QELNLP LPEA PWHTHRDRIAEAA SALLA ILAGSCGKIARD	260
AcPcaB	190	LVAQLGGAVGSLASLQDQGSIVVEAYAKQLKLGQ TACTWHGERDRIVEIASVLG IITGNVGMARD	255
PpPcaB	188	WCCSSGGASGSLAALGSKAMPVAEALAEQLKLSLPEQ PWHTRDRIVEFASV LGLVAGSLGKFGRD	253
BjPcaB	261	VSLMMQTDVAAEAFEPAGEGRGGSSTMPHKRNPVAAA S ALGCATMAPQLAATIFA AQVQDHERSAGP	326
AcPcaB	256	WSLMMQTEIAEVFEP T AKGRGGSSTMPHKRNPVAAA SVLAAANRVPAIMSSIIYQSMVQEHERSLGA	321
PpPcaB	254	VSLMMQTEAGEVFEP S APGKGGSSSTMPHKRNPVGA AV L IGAATRVPGLVSTLFAAMPQEHERSLGL	319
BjPcaB	327	WHAEWPTLPQLMLV TSGALAAIVDIAEGLDVDAARMRSNLDA THGLIMAEAVTFALAEERIGKSDAH	392
AcPcaB	322	WHAEWLSLPEIFQLTAGALERTLDVLEKGM EVNAENMHQNI ECTHGLIMAEAVMMALAPHMGR LNAH	387
PpPcaB	320	WHAEWETLPDI CCLVSGALRQAQVIAEGIEVDAARMRNLDITQGLVLA EAVSIVLARTPGPR...	382
BjPcaB	393	HLIEAASKR AVAEKKHLREVLAA DSQVTAHLSPEKIAALFEPMAYQGA SQAMIDRLLDSLE...	453
AcPcaB	388	HVVEAACKTAVAEQKHLKDIISQVDEVKQYFNPSQLDEIFKPE SYLGNIQDQIDAVLQEAKGEAK	452
PpPcaB	383PC PPLAGAMLPA SRGR TAAPACGAG.....	407

Figura 2.3. Alineamiento de la proteína PcaB de *B. japonicum* con proteínas similares de otros organismos.

BjPcaB, β- carboxi-cis,cis-muconato lactona de *B. japonicum*; AcPcaB, β- carboxi-cis,cis-muconato lactona de *A. calcoaceticus* (Harnett y Ornston, 1992); PpPcaB, β- carboxi-cis,cis-muconato lactona de *P. putida* (Willians et al.,1994). Las identidades entre al menos dos de las tres proteínas alineadas aparecen marcadas en cajas. Las similitud con respecto a PcaB de *B. japonicum* se muestran sombreadas.

BjPcatD	1	M P M I D A D G C L I N V S V E G R D G G P T L M L S N S L G C T L Q M W E P Q M K A L T Q V F R V I R Y D R R G H G K S N V P P	65
AcCatD	1	M P V F H F K D T L T A Q D V A L N Y A T F G Q A D R P A L I F S N S L G T N L S M W Q Q Q I A Y F Q D K Y F V I C Y D T R G H G A S S T P V	71
AcPcaD	1	V S E I H S I M I T N R Q G K T L S V Q I N G P E N A P A I V F S N S L G T D H G M W Q P Q V A A L K S Q Y R V V T Y D T R G H G Q S D V . I	70
BjPcatD	66	G P Y T M E R F G R D V L A I I N D L N I E K V H W C G L S M G G M V G Q W L G A N A P E R F G K L I L A N T S C Y Y A E P T K W L E R I D A	136
AcCatD	72	G P Y R I D Q L G T D V I I A I L D H L Q I P Q A T F C G I S M G G L T G Q W L A I H F P E R F N Q V I V A N T A A K I G E A Q A W Q A R A Q L	142
AcPcaD	71	E N T T L Q N L G E D V I D I I L D A L N I E K A H F C G I S M G G L T A L V L G I Y Q A A R E Y S I T V A N S A A K I W T E D G W N A R A E A	141
BjPcatD	137	V K K G G I A V A D A V I A G W L T Q D F R E R E P D I T A R M K A M L L A S P V E G Y L A C C E A L S T I D Q R E L I P K I K S P T L V I	207
AcCatD	143	V R E Q G L T P I A Q T A A T R W F T P G F I E D S P E I V E K L S H D L A Q G S A E G Y A S C C E A L A E A D V R P Q L Q R I S I P V L V I	213
AcPcaD	142	V E A N G L A D L V A S T H T R W F S D K F D Y K N D N L A Q K T I Q S L A D T P A Q G Y A N A C R A L A K A D V R E K L A S I S I P T L I I	212
BjPcatD	208	A G R H D M A T P I S A G E L I R S K I P G A N M T I I D A A H I S N V E Q P H A F T D A V V G F L T Q . R	260
AcCatD	214	A G A Q D P V T T V A D G Q F L C E H I V H S T L E V L E A S H I S N V E Q P Q A F N H A V E A V M K R F N	267
AcPcaD	213	A G S A D P V T T I T D G E F M Q Q H I Q C N Q F E V I D A S H I S N I E Q P E K E I Q I F S G E V K S I Q	266

Figura 2.4. Alineamiento de la proteína PcaD de *B. japonicum* con proteínas similares de otros organismos.

BjPcaD, β-cetoadipato enol-lactona hidrolasa de *B. japonicum*, AcCatD, β-cetoadipato enol-lactona hidrolasa II de *A. calcoaceticus* (Harnett y Ornston, 1992); AcPcaD, β-cetoadipato enol-lactona hidrolasa de *A. calcoaceticus* (Harnett y Ornston, 1992). Las identidades entre al menos 2 de las tres proteínas aparecen marcadas en cajas. Las similitudes con respecto a PcaB de *B. japonicum* se muestran sombreadas.

3. Purificación de la enzima CO deshidrogenasa de *B. japonicum*

3.1. Cultivo autotrófico de *B. japonicum* con CO

Las células de *B. japonicum* 110*spc4* crecieron autotróficamente en un medio que contenía sales minerales, vitaminas, sulfato amónico como fuente de N y 50% de CO como única fuente de C. Durante el crecimiento con CO durante 12 días el cultivo alcanzó una densidad óptica (DO₆₀₀) de 0'319 (Figura 3.1). El número de células (unidades formadores de colonias) incrementó desde 1.4×10^4 /ml, que fue las que se emplearon como inóculo, hasta 1.6×10^8 /ml, que fue el número de unidades formadores de colonias calculado después de 12 días de cultivo (Figura 3.1). Durante este tiempo, el incremento del contenido en proteínas fue de 90 veces (Figura 3.1).

3.2. Cultivo heterotrófico de *B. japonicum* con CO

Debido al escaso rendimiento en masa celular de los cultivos crecidos en medio autotrófico, para la purificación de la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa, las células de *B. japonicum* se cultivaron en fermentadores de 50 l de capacidad que contenían medio PSY gaseado de forma continua con 10% de CO. La incubación de las células en estas condiciones de cultivo durante 48 h resultó en una DO₆₀₀ de 0'58 (Figura 3.1), y el rendimiento fue de 1 g de células/l de cultivo. Una vez rotas las células y obtenido el citosol, esto es, la fracción soluble libre de células, antes de iniciar la purificación se trató de determinar tanto la actividad específica como la actividad total de la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa. Nuestros intentos para detectar actividad enzimática siguiendo los métodos descritos (Meyer y Schlegel, 1979; Kim y Hegeman, 1981; Kraut et al. 1989) no dieron resultado positivo, posiblemente debido a las fuertes interferencias reductoras que otras enzimas de óxido reducción, presentes en el citosol, podrían estar ejerciendo. Se decidió entonces utilizar como criterio de purificación el espectro UV-visible típico de la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa descrito para *O. carboxidovorans*, que se caracteriza por presentar un máximo de absorción entre 325 y 335 nm, junto con otro pico a 550 nm, característico de los grupos [2Fe-2S], y un tercer máximo a 450 nm específico de la absorbancia debida a la presencia de flavinas (Meyer, 1982). Hay que indicar no obstante, que otras molibdohidrolasas presentan similares espectros de absorción UV-visible (Meyer, 1982).

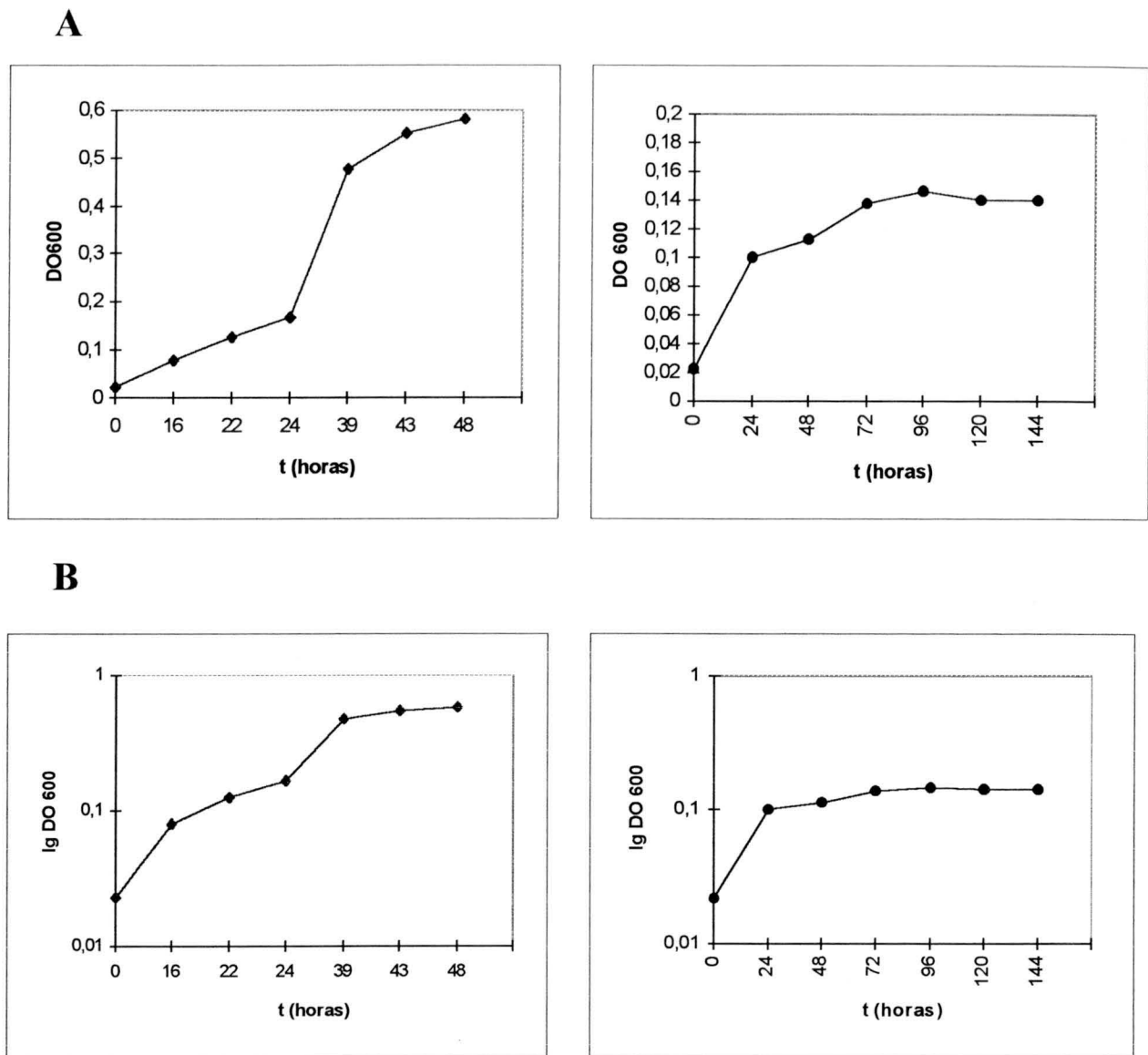


Figura 3.1. Crecimiento heterotrófico y autotrófico de *B. japonicum* USDA110 $spc4$ con CO.

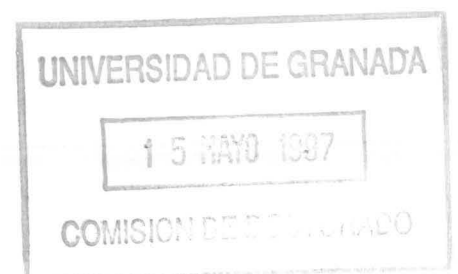
A. Curva realizada con ordenadas en escala decimal.

B. Curva realizada con ordenadas en escala logarítmica.

El crecimiento heterotrófico se llevó a cabo en medio PSY gaseado de forma continua con 10% CO, 5% CO₂ y 85% aire. El crecimiento autotrófico se llevó a cabo en medio PSY mínimo con una atmósfera de 50% aire, 50% CO.

◆ Crecimiento heterotrófico con CO

● Crecimiento autotrófico con CO



3.2.1. Cromatografía de intercambio aniónico

La purificación se inició mediante cromatografía de intercambio aniónico, (Accell QHA) después de la cual el análisis del espectro de absorción UV-visible (300-700 nm) de cada una de las fracciones recogidas indicó que las fracciones 32 a 46 contenían un pico de proteína cuyo valor máximo correspondió a una concentración de 0'4 M de KCl (Figura 3.2A) y que presentaban el espectro UV-visible (300-700 nm) típico de las molibдохидrolasas. Como ejemplo representativo, en la Figura 3.2B se presenta el espectro de absorción de las fracciones 38, 39 y 40, donde se puede observar el incremento paulatino en la absorbancia a 331 nm, un hombro a 450 nm y un pico a 550 nm. Junto con el enzima, se eluyó un citocromo de tipo b, posiblemente b₅₆₁, que en el espectro oxidado presentó un máximo a 410 nm (Figura 3.2B). Las fracciones que contenían la proteína (32-48) se mezclaron, se concentraron mediante ultrafiltración y se complementaron con (NH₄)₂SO₄ saturado hasta una concentración final 1'2 M.

3.2.2. Cromatografía de interacción hidrofóbica

Las muestras obtenidas (60 mg/ml) se sometieron a cromatografía de interacción hidrofóbica (15ISO), liberándose la proteína de la matriz de la columna mediante la aplicación de un gradiente descendente de 1'2 a 0 M de (NH₄)₂SO₄, después de lavar la columna con dos volúmenes de tampón KH₂PO₄/NaOH (pH 7'2) para eliminar proteínas contaminantes, incluidos los citocromos de tipo b. La elución de la proteína ocurrió a una concentración 0'7 M de (NH₄)₂SO₄, detectándose, entre las fracciones 45 a 55, un único pico de proteína (Figura 3.3A). Las fracciones se mezclaron y concentraron mediante ultrafiltración hasta un volumen final aproximado de 2'5 ml con una concentración de proteína de 3 mg/ml cuyo espectro de absorción UV-visible (300-700 nm) presentó los picos característicos de las enzimas molibдохидrolasa con máximos a 331, 450 y 550 nm (Figura 3.3B). Los coeficientes A₄₅₀/A₅₅₀ y A₂₈₀/A₄₅₀ fueron de 3'37 y 5'1, respectivamente, lo que, de acuerdo a los valores descritos por Coughlan (1980), son indicativos de la existencia de contaminación por proteínas no coloreadas en las muestras. Esa contaminación se pudo observar cuando la proteína se sometió a electroforesis en geles nativos y desnaturalizantes.

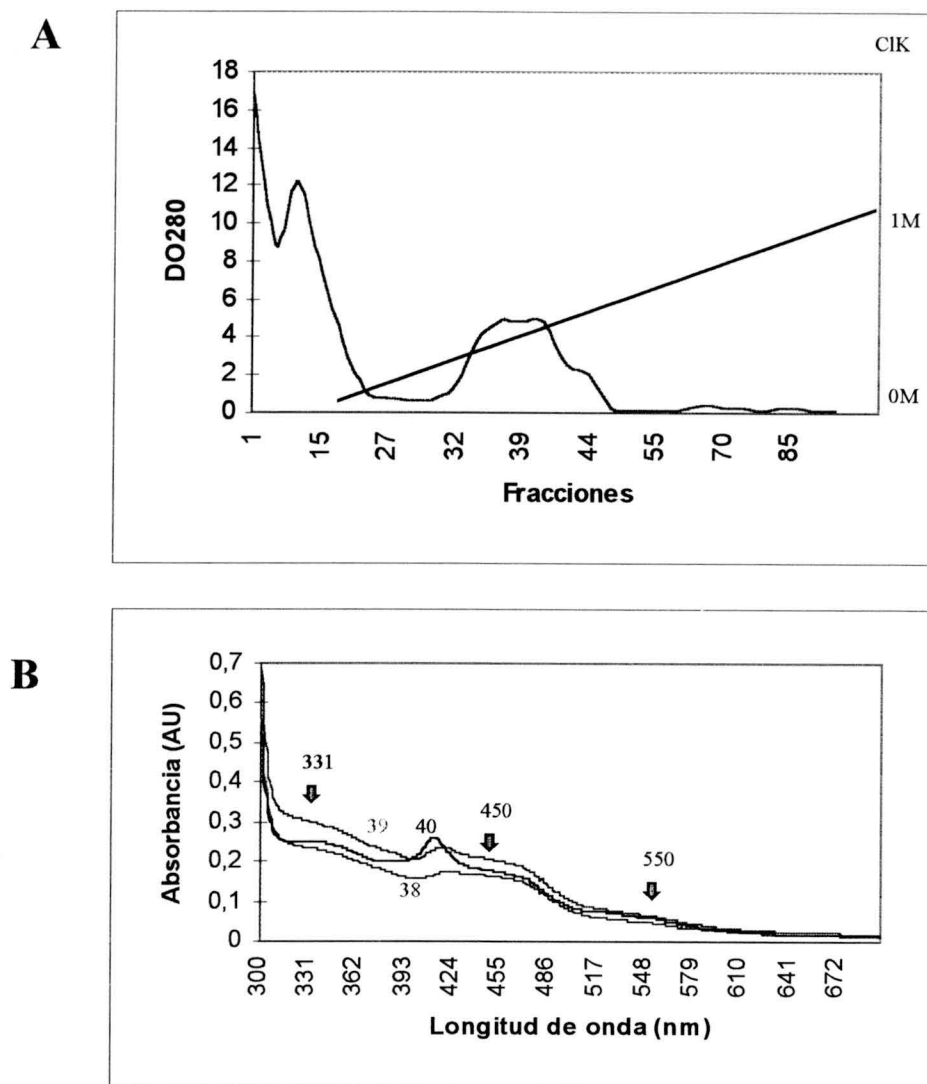


Figura 3.2. Fraccionamiento del citosol de *B. japonicum* USDA110Spc4 mediante cromatografía de intercambio aniónico.

La columna se cargó con muestras de 200 ml (184,8 mg de proteína) del citosol de *B. japonicum* USDA110Spc4.

A. Fracciones recogidas, así como el registro de la concentración de proteína (A280) y el gradiente lineal de KCl (50 nM- 1M), preparado en tampón H₂PO₄-NaOH (pH 7,4) que se empleó para eluir la enzima.

B. Espectro UV- visible (300-700 nm) de las fracciones 38, 39 y 40 como representativas de las que contienen enzimas de tipo molibdo hidrolasas. Las flechas indican los máximos de absorción.

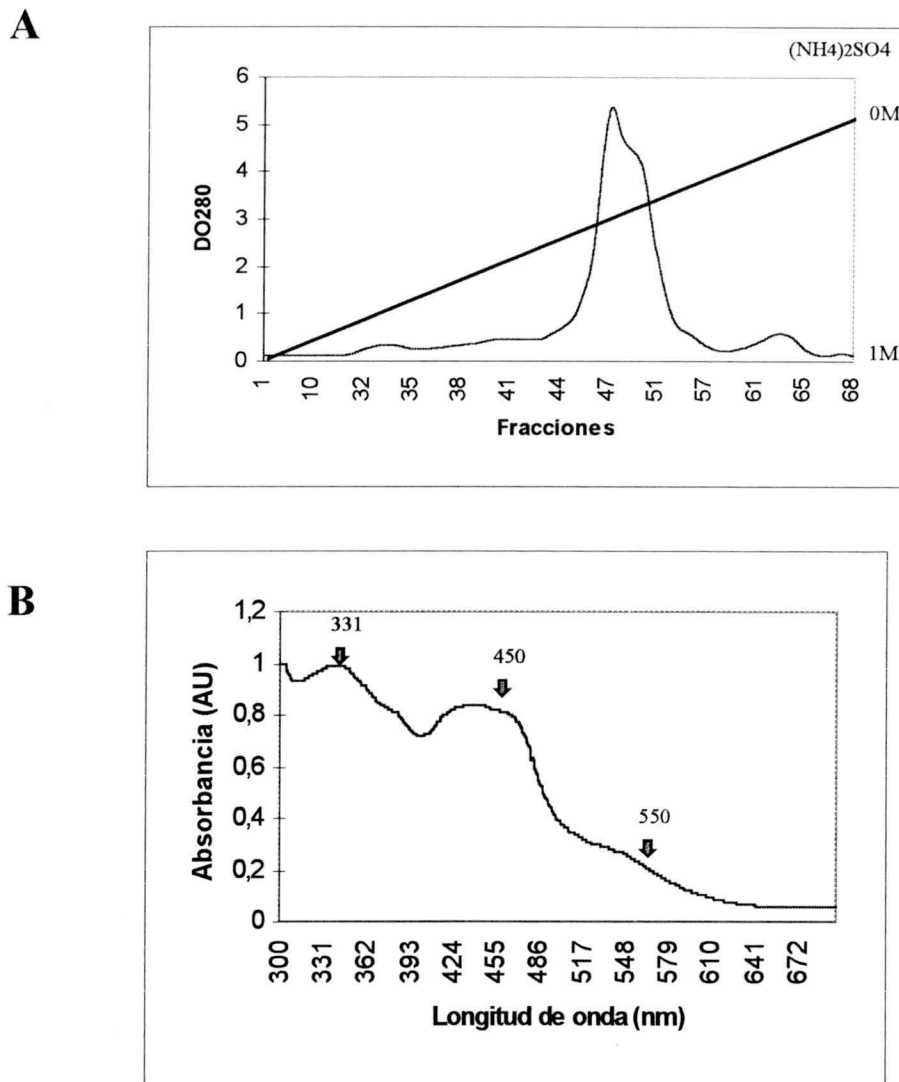


Figura 3.3 Fraccionamiento del citosol de *B. japonicum* USDA110spc4 mediante cromatografía de interacción hidrofóbica .

La columna (15ISO) se cargó con 70 ml (91 mg) de proteína de la fracción proteica obtenida después de la cromatografía de intercambio aniónico y concentrada mediante ultrafiltración.

A Se indican las fracciones recogidas, así como el registro de la concentración de proteína (A 280) y el gradiente lineal descendente de (1'2M a 0M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ preparado en tampón $\text{H}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ (pH 7'2) que se empleó para eluir la enzima.

B. Se presenta el espectro UV-visible (300-700 nm) de la fracción proteica eluida previa concentración de las mismas. Las flechas indican los máximos de absorción detectados a 331,450 y 550 nm.

Antes de continuar con la purificación, se sustituyó el tampón $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ (pH 7.2) por tampón Hepes (50 mM)/ClNa (150 mM) (pH 7.2) mediante el uso de una columna PD10, obteniéndose finalmente 3.5 ml de solución.

3.2.3. Cromatografía de exclusión molecular

Para eliminar las proteínas contaminantes se utilizó cromatografía de exclusión molecular (Sephacryl HR-S300), después de la cual se detectó un sólo pico de proteína correspondiente a las fracciones 65-73 (Figura 3.4) que se mezclaron y concentraron mediante ultrafiltración. Los coeficientes A_{450}/A_{550} y A_{280}/A_{450} fueron de 2.995 y 4.899, valores propios de proteínas purificadas. Como resultado final de la purificación se obtuvieron 8 ml de proteína, cuya concentración, calculada por el método de Bradford (1986), fue de 2.35 mg/ml.

3.3. Caracterización de la enzima CO deshidrogenasa

3.3.1. Tamaño molecular relativo

Después de la cromatografía de exclusión molecular, la detección de proteína en geles nativos de poliacrilamida reveló la existencia de una sola banda de proteína, lo que demostró la purificación a homogeneidad electroforética de la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa. El tamaño molecular estimado de la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa fue de 220.000 (Figura 3.5).

3.3.2. Espectro de absorción

El espectro de absorción UV-visible (220-700 nm) de la enzima purificada indicó la presencia de tres picos de absorción a 331, 449 y 550 nm, respectivamente (Figura 3.6). El primero es típico de las molibdohidrolasas, el segundo corresponde a la presencia de flavinas y el tercero es propio de las proteínas que contienen agrupamientos de tipo $[2\text{Fe}-2\text{S}]$. Este espectro de absorción es similar al descrito para la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa purificada de *O. carboxydovorans* (Meyer, 1982).

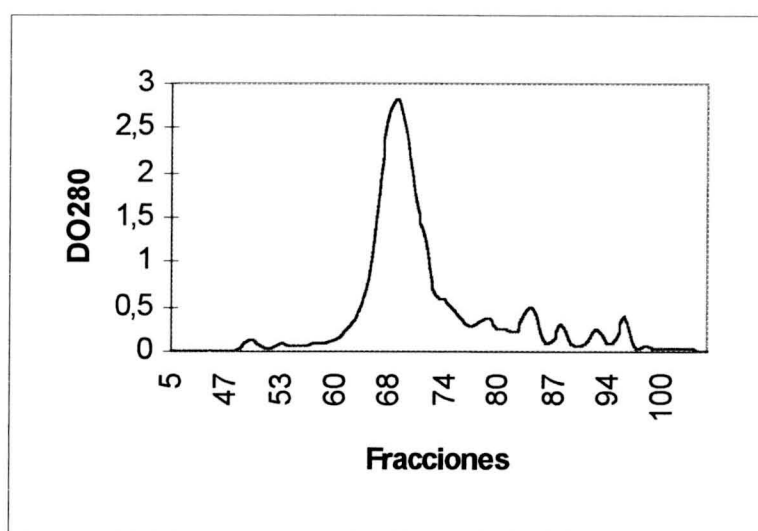


Figura 3.4. Fraccionamiento del citosol de *B. japonicum* USA110spc4 mediante cromatografía de exclusión molecular.

La columna (Sephacryl HR-300) se cargó con 3,5 ml (21 mg de proteína) de la fracción proteica obtenida después de la cromatografía de interacción hidrofóbica y concentrada mediante ultrafiltración. La enzima se eluyó con tampón Hepes 50 mM adicionado de NaCl 150 mM (pH 7,2).

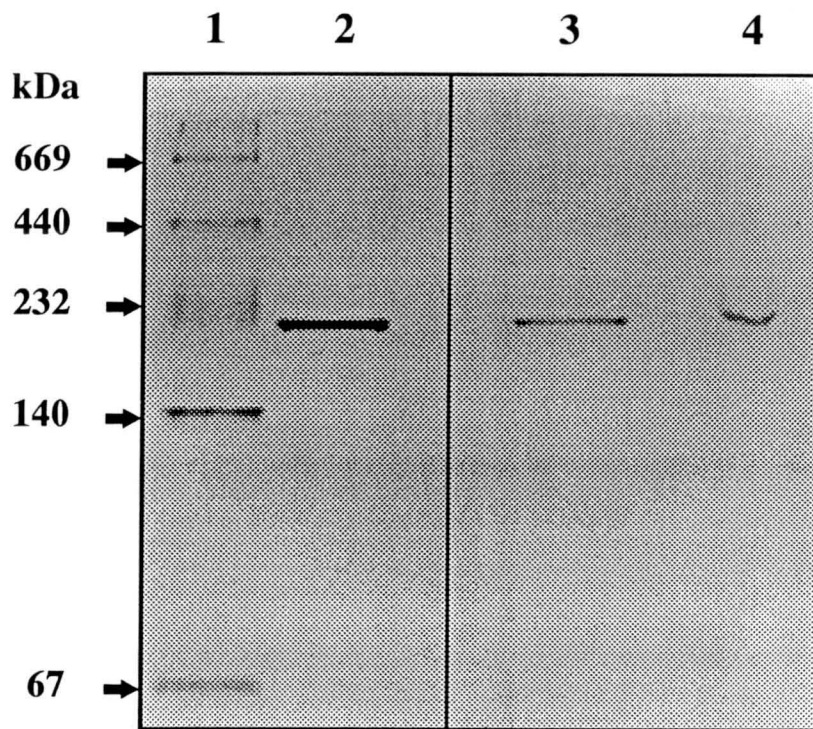


Figura 3.5. Detección de la enzima CODH purificada de *B.japonicum* USDA110Spc en geles nativos de poliacrilamida.

Las muestras (3 μ g) de enzima purificada se sometieron a electroforesis en geles nativos de poliacrilamida (7.5 %). La enzima se detectó mediante tinción con azul Coomasie (carril 2) y mediante actividad empleando fenacina metosulfato y azul de nitro-tetrazolio como donadores de electrones (carril 3). Actividad CODH en citosol (carril 4). Marcador de peso molecular (carril 1)

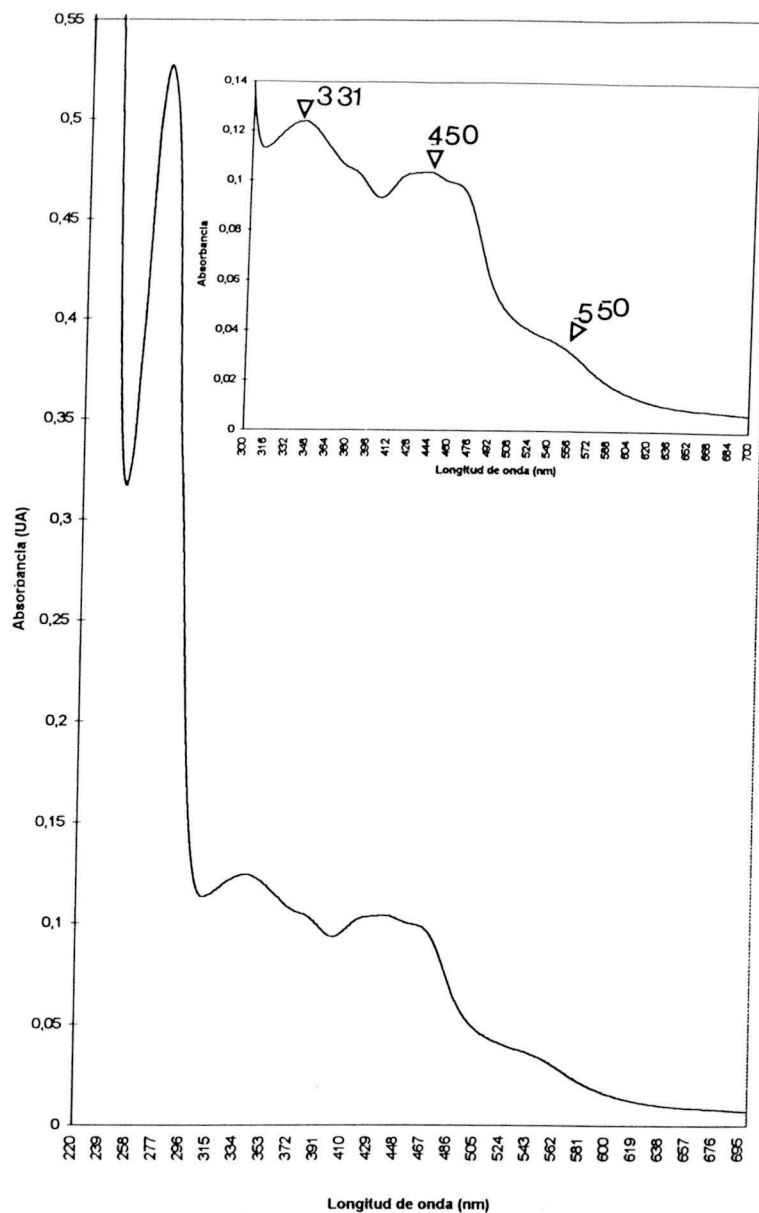


Figura 3.6. Espectro de absorción UV-visible de la enzima CO deshidrogenasa purificada de *B. japonicum* USDA110sp4.

Se emplearon muestras de 12 μg de proteína purificada. Como referencia se utilizó el mismo tampón en el que se eluyeron las muestras (Hepes 50mM adicionado de NaCl, pH7'2). Las flechas marcan los máximos de absorción detectados a 331, 450 y 550 nm. En el inserto se presenta el espectro de absorción entre 300 y 700 nm de la misma muestra.

3.3.2. Composición en subunidades

La determinación de la composición en subunidades de la enzima CODH se levó a cabo mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida, empleándose muestras que contenían 50 μg de enzima purificada. La detección de proteína después de la electroforesis reveló la existencia de tres polipéptidos cuyo tamaño molecular relativo fue de 75, 28'4 y 17'2 kDa, respectivamente (Figura 3.7C). La concentración relativa de cada subunidad, calculada en base a la correspondiente área parcial obtenida mediante análisis densitométrico del gel (Figura 3.7D), fue del 63'4% para la subunidad de mayor tamaño (L), 20'2% para la de tamaño intermedio (M) y 16'4% para la subunidad de menor tamaño (S), lo que corresponde a una relación 1:1:1 entre subunidades. Dado que la suma de los tamaño moleculares de las tres subunidades corresponde a 110'6 kDa y el tamaño molecular calculado de la proteína nativa fue de 200 kDa (Figura 3.5), la conformación más probable de las subunidades de la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa podría ser del tipo (LMS)₂. La mayoría de las molibдохidrolasas que se han purificado constan de tres subunidades, L, M y S (Ferry, 1995) que se disponen en una conformación (LMS)₂.

3.3.3. Hibridación con anticuerpos anti-CoxL

Se emplearon 50 μg de proteína purificada que se sometió a electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida. Como control positivo se utilizó 50 μg de enzima monóxido de carbono deshidrogenasa purificada de *O. carboxidovorans* OM5 (amablemente proporcionado por O. Meyer). Después de la transferencia a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF), el inmunorevelado de los filtros con anticuerpos anti-CoxL de la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa de *O. carboxidovorans* OM5, demostró que dichos anticuerpos reconocieron la subunidad de mayor tamaño de la enzima purificada de *B. japonicum*, aunque también se observó señal de hibridación con la subunidad de tamaño mediano (Figura 3.7B). No se detectó reacción cruzada de los anticuerpos con la subunidad de menor tamaño de *B. japonicum*.

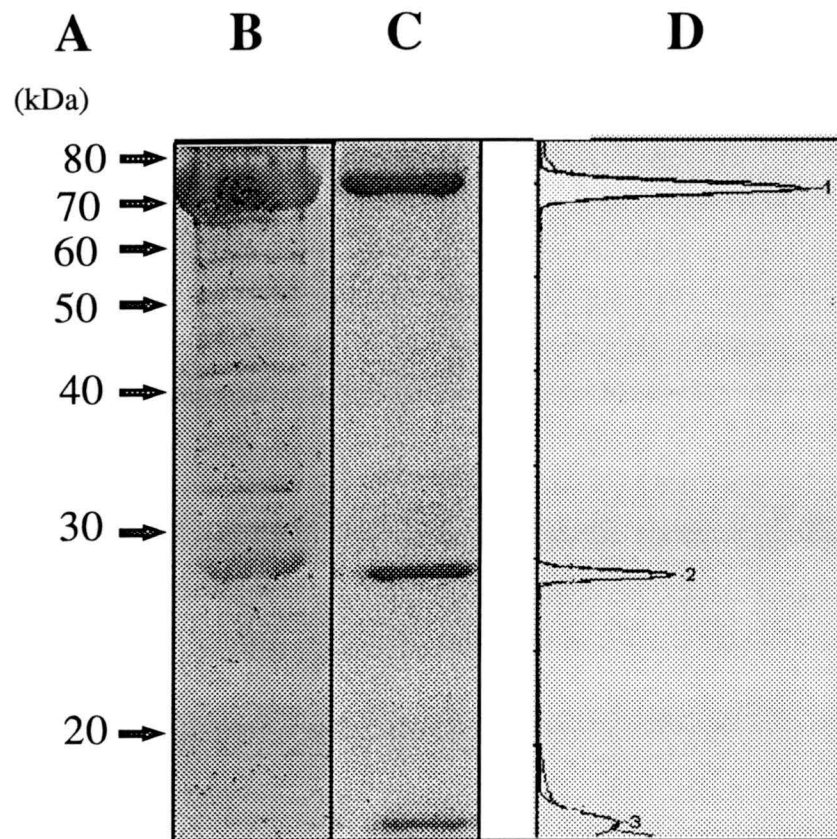


Figura 3.7. Detección del enzima CODH purificada en geles desnaturalizantes.

A. Las flechas indican los marcadores de peso molecular en escalera.

B. Inmuno revelado del enzima CODH (5 µg) utilizando para la reacción anticuerpos anti-CoxL de *O. carboxidovorans*.

C. 50 µg de enzima CODH teñida con azul Coomassie.

D. Densitograma representativo de la composición en subunidades del enzima CODH referido a la línea C.

3.3.4. Contenido en metales

El análisis del contenido en Fe, Mo y W en 62'8 μg de proteína purificada/1 ml de tampón HEPES 20 mM (pH 7'0) fue (en $\mu\text{g/l}$) de 61.1 para el primero, 60 para el segundo y 0.0 para el tercero. Si se considera que el tamaño molecular de la enzima, estimado mediante electroforesis en geles nativos de poliacrilamida, es de 220,000 (Figura 3.5), se ha calculado que 1 mol de enzima contiene 2'23 nmoles de Mo y 3'77 nmoles de Fe.

3.3.5. Determinación de cofactores:

A. Flavinas. La presencia de flavinas se comprobó a partir de 0'5 ml de proteína purificada (1'6 mg). Después de su extracción, mediante tratamiento con ácido tricloroacético, la determinación cuantitativa de flavinas, basada en el espectro de óxido-reducción (A_{450}) fue de 1'9-2'4 moles de flavinas/mol de enzima.

B. Pterinas. El fraccionamiento de 200 μl de pterinas, extraídas mediante tratamiento con iodoacetamida a través de una columna de fase reversa y eluída con acetato amónico 100 mM (pH 4'5), reveló la existencia de un pico de elución a 17'28 min. Este tiempo de elución corresponde a las pterinas de tipo molibdopterina (MPT) y dinucleótido de molibdopterina y citosina (MCD) (Lhotar y Meyer, 1996). El espectro de absorción UV-visible (220-500 nm) de la fracción recogida mostró la presencia de dos máximos de absorción a 283 y 367 nm, que es típico de las pterinas tipo MCD (Lhotar y Meyer, 1996). La razón A_{276}/A_{367} es de 3'48. De acuerdo con estos resultados, se podría concluir que la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa de *B. japonicum* presenta un cofactor de molibdeno de tipo MCD.

3.3.6. Determinación y detección de actividad CO deshidrogenasa

Como se ha indicado anteriormente, los intentos realizados para determinar la actividad *in vitro* de la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa empleando los métodos previamente descritos que emplean azul de metileno o tionina como aceptores de electrones durante la reacción catalizada por la enzima (Meyer y Schlegel, 1979; Kim y Hegeman, 1981; Kraut et al. 1989), no dieron resultado positivo. Este hecho ocurrió tanto cuando se determinó actividad en el citosol de las células de *B. japonicum*

cultivadas en diferentes condiciones, como cuando se utilizaron las sucesivas fracciones proteicas que se obtuvieron durante el proceso de purificación. Tampoco se detectó actividad *in vitro* cuando se utilizaron otros aceptores de electrones como metil viológeno, bencil viológeno, FAD, NAD o ferricianuro potásico.

Igualmente, las determinaciones realizadas con la enzima purificada fueron infructuosas, tanto cuando se empleó CO como sustrato de la enzima, como cuando se utilizaron sustratos específicos de otras enzimas molibdohidrolasas como nicotina, N-metilnicotinamida, ácido isonicotínico (pirimidin-4-ácido carboxílico), ácido quinálico (quinolein-2-ácido carboxílico), hipoxantina (6-hydroxipurina), quinaldina (2-metilquinolina), isoquinolina, hipoxantina (6-hydroxipurina), xantina (2,6 dihidroxipurina) y purina (7-himidazol 4,5 d pirimidina). Hay que indicar, sin embargo, que a pesar de estas dificultades, la purificación a homogeneidad electroforética de la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa de *B. japonicum* ha sido posible por las características propias del espectro UV-visible de las enzimas con actividad molibdohidrolasa.

Sin embargo, la detección de actividad enzimática en geles de poliacrilamida (Meyer y Schlegel, 1979; Kim y Hegeman, 1981) de la enzima purificada reveló la existencia de una banda de actividad cuyo tamaño molecular calculado fue de 220 kDa (Figura 3.5), que correspondió al de la enzima purificada cuando el gel se reveló mediante tinción con azul Coomassie (Figura 3.5). Una banda similar de actividad se detectó cuando se sometió a electroforesis y revelado muestras de citosol de células de *B. japonicum* cultivadas autotróficamente con CO (Figura 3.5).

La reacción utilizada para detectar actividad monóxido de carbono deshidrogenasa en geles de poliacrilamida emplea fenazina metosulfato y azul de nitrotetrazolio como aceptores/donadores de electrones (Meyer y Schlegel, 1979; Kim y Hegeman, 1981). Estos compuestos se emplean, además, en numerosos experimentos como donadores de electrones para determinar la actividad *in vitro* de enzimas con actividad óxidoreductora, fundamentalmente deshidrogenasas (Fine y Costello, 1963). Basándonos en estos hechos se prepararon mezclas de reacción que contenían fenazina metosulfato (0'1 mM) y azul de nitrotetrazolio (0'05 mM) en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7'5) para tratar de determinar la actividad *in vitro* de la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa de *B. japonicum*. Se pudo detectar entonces la aparición de color rojo, medido espectrofotométricamente (A₅₄₀), debida a la producción de

formazán, producto de la reducción del azul de nitrotetrazolio por la fenazina metosulfato. Teniendo en cuenta un coeficiente de extinción molar para el azul de nitrotetrazolio de $7'2 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (The Sigma-Aldrich Handbook of Stain Dyes and Indicators), el valor de actividad calculado para la enzima purificada de *B. japonicum* fue de $17.37 \text{ nmol CO oxidado/mg proteína} \times \text{min. mmol}^{-1}$

CONCLUSIONES

1. *Bradyrhizobium japonicum* es una bacteria carboxidotrofa, capaz de crecer quimiolitotroficamente con monóxido de carbono (CO) como única fuente de carbono y energía.
2. La enzima monóxido de carbono deshidrogenasa de *Bradyrhizobium japonicum* es una molibdo-sulfo-ferro proteína que cataliza la oxidación de monóxido de carbono (CO). La enzima está compuesta por tres subunidades (L, M y S), que se agrupan formando un dímero de configuración (LMS)₂.
3. El genoma de *Bradyrhizobium japonicum* posee un fragmento *Hind* III de 9 kb donde se localizan los genes estructurales *coxS* y *coxM* de la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa, pero no contiene el gen estructural *coxL*.
4. *Bradyrhizobium japonicum* contiene los genes *pcaB*, *pcaD* y *pcaC* implicados en la síntesis de las enzimas β-carboxi-cis,cis-muconato lactona, β-cetoadipato enol-lactona hidrolasa y g-carboxi-muconolactona descarboxilasa, respectivamente.
5. Los genes *pcaBCD* permiten la utilización por *Bradyrhizobium japonicum* de protocatehuato, compuesto intermediario del metabolismo de distintos compuestos fenólicos, aromáticos e hidroxiaromáticos.

BIBLIOGRAFIA

Abbanat, D.R. y Ferry, J.G. 1990. Synthesis of acetyl-CoA by the carbon monoxide dehydrogenase complex from acetate-grown *Methanosarcina thermophila*. *J. Bacteriol.* 172: 7145-7150.

Abbanat, D.R. y Ferry, J.G. 1991. Resolution of component proteins in an enzyme complex from *Methanosarcina thermophila* catalyzing the synthesis or cleavage of acetyl-CoA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3272-3276.

Aeckersberg, F., Bak, F. y Widdel, F. 1991. Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO₂ by a new type of sulfate-reducing bacterium. *Arch. Microbiol.* 156:5-14.

Amaya, Y., Yamazaki, K.I., Sato, M., Noda, K. and Nishino, T. 1990. Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase from the NAD-dependent type to the O₂-dependent type: Amino acid sequence of rat liver xanthine dehydrogenase and identification of the cleavage sites of the enzyme protein during irreversible cont. *J. Biol. Chem.* 265, 14170-14175.

Anderson, M.E. y Lindahl, P.A. 1994. Organization of clusters and internal electron pathways in CO dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*: relevance to the mechanism of catalysis and cyanide inhibition. *Biochemistry* 33:8702-8711.

Bell, J.M., Williams, E. y Colby, J. 1985. Carbon monoxide oxidoreductase from thermophilic carboxidobacteria. En: *Microbial Gas Metabolism* (R.K. Poole y C.S. Dow, eds.), pp. 153-160. Academic Press. London.

Black, G.W., Lyons, C.M., Williams, E., Colby, J., Kehce, M. y O'Reilly, C. 1990. Cloning and expression of the carbon monoxide dehydrogenase genes from *Pseudomonas thermocarboxydovorans* strain C2. *FEMS Microbiol. Lett.* 58:249-254.

Blaut, M. *Metabolism of methanogens.* 1994. *Antonie van Leeuwenhoek* 66:187-208.

Bläse M., Bruntner C., Tshisuaka B., Fetzner S., and Lingens F.. (1996). Cloning, expression, and sequence analysis of the three genes encoding quinoline 2-oxidoreductase, a molybdenum-containing hydrolase from *Pseudomonas putida* *. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 23068-23079.

Blatny, J.M., Brautaset, T., Winther-Larsen, H.C., Haugan, K. y Valla, S. (1997). Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vector based on the RK2 replicon. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 370-379.

Bonam, D., Lehman, L., Roberts, G.P. y Ludden, P.W. 1989. Regulation of carbon monoxide dehydrogenase and hydrogenase in *Rhodospirillum rubrum*: effects of CO and oxygen on synthesis and activity . *J. Bacteriol.* 171:3102-3107

Bonam, D. y Ludden, P.W. 1987. Purification and characterization of carbon monoxide dehydrogenase: a nickel, zinc, iron-sulfur protein from *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biol. Chem.* 262:2980-2987.

Bostjan, K. y Deisenhofer J. . 1995 Proteins with leucine-rich repeats. *Current Opinion in Structural Biology.* 5: 409-416.

Bray, R.C., George, G.N., Lange, R. y Meyer, O. 1983. Studies by e.p.r. spectroscopy of carbon monoxide oxidase from *Pseudomonas carboxydovorans* and *Pseudomonas carboxyhydrogena*. *Biochem. J.* 211:687-694.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

Calzi, M.L., Raviolo, C., Ghibaudi, E., de Gioia, L., Salmona, M., Cazzaniga, G., Kurosaki, M., Terao, M. y Garattini, E. 1995. Purification, cDNA cloning, and tissue distribution of bovine liver aldehyde oxidase. *J. Biol. Chem.* 270, 31037-31045.

Champine, J.E. y Uffen, R.L. 1987. Regulation of anerobic carbon monoxide oxidation activity in *Rhodocyclus gelatinosus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 44:307-311.

Chen, Y.P., Glenn, A.R. and Dilvorth, M.J. 1984. Uptake and oxidation of aromatic substrates by *Rhizobium leguminosarum* MNF 3841 and *Rhizobium trifolii* TA1. *FEMS Microbiol. Lett.* 21, 201-205.

Cho, J.W., Yim, H.S. y Kim. Y.M. 1985. Acinetobacter isolates growing with carbon monoxide. Kor, J. Microbiol. 23:1-8.

Conrad, R. y Seiler, W. 1980. Role of microorganisms in the consumption and production of atmospheric carbon monoxide by soil. Appl. Environ. Microbiol. 40:437-445

Coughlan, M.P. (1980). Aldehyde oxidase, xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase: hydroxylases containing molybdenum, iron-sulfur and flavin, in Molybdenum and molybdenum containing enzymes (Coughlan, M.P., ed) pp.119-185, Pergamon Press, Oxford.

Cypionka, H., Meyer, O. y Schlegel, H.G. 1980. Physiological characteristics of various species of strains of carboxydobacteria. Arch. Microbiol. 127:301-307.

Cypionka, H. y Meyer, O. 1982. Influence of carbon monoxide on growth and respiration of carboxydobacteria and other organisms. FEMS Microbiol. Lett. 15:209-214.

Cypionka, H. y Meyer, O. 1983. The cytochrome composition of carboxidotrophic bacteria. Arch. Microbiol. 135:293-298.

Cypionka, H., van Verseveld, H.W. y Stouthamer, A.H. 1984. Proton translocation coupled to carbon monoxide-insensitive and -sensitive electron transport in *Pseudomonas carboxydovorans*. FEMS Microbiol. Lett. 22:209-213.

Cypionka, H., Reijners, W.N.M., van Wielink, J.E., Oltmann, L.F. y Stouthamer, A.H. 1985. Half reduction potentials and oxygen affinity of the cytochromes of *Pseudomonas carboxydovorans*. FEMS Microbiol. Lett. 27: 189-193.

Daniels, L., Fuchs, G., Thauer, R.K. y Zeikus, J.G. 1977. Carbon monoxide oxidation by methanogenic bacteria. J. Bacteriol. 132: 118-126.

Delgado, M.J., Olivares, J., Bedmar, E.J. 1989. Nitrate reductase activity of free-living and symbiotic uptake hydrogenase-positive and uptake hydrogenase-negative strains of *Bradyrhizobium japonicum*. Arch. Microbiol. 151:166-170.

Doten, R.C., Ngai, K-L., Mitchell, D.J. and Orsnton, L.N. 1987. Cloning and genetic organization of the *pca* gene cluster from *Acinetobacter calcoaceticus*. J. Bacteriol. 169, 3168-3174.

Drake, H.L. 1994. Acetogenesis, acetogenic bacteria, and the acetyl-CoA "Wood-Jungdahl" pathway: past and current perspectives. En: Acetogenesis (H.L. Drake, ed), pp. 3-60. Chapman and Hall, New York.

Edman, P., Begg, G. 1967. A protein sequenator. Eur. J. Biochem. 1: 80-91.

Elsemore, D.A., y Ornston, L.N. 1994. The *pca-pob* supraoperonic cluster of *Acinetobacter calcoaceticus* contains *quiA*, the structural gene for quinate-shikimate dehydrogenase. J. Bacteriol. 176: 7659-7666.

Englert, C., Kruger, K., Offner, S., Pfeifer, F. 1992. Three different but related gene clusters encoding gas vesicles in halophilic archaea. J. Mol. Biol. 227: 586-592.

Ensign, S.A., Bonam, D. y Luden P.W. 1989. Nickel is required for the transfer of electrons from carbon monoxide to the iron sulfur(s) of carbon monoxide dehydrogenase from *Rhodospirillum rubrum*. Biochemistry 28:4968-4973.

Ensign, S.A., Campbell, M.J. y Luden P.W. 1990. Activation of the nickel-deficient carbon monoxide dehydrogenase from *Rhodospirillum rubrum*: kinetic characterization and reductant requeriment. Biochemistry 29:2161-2168.

Ensign, S.A. y Luden P.W. 1991. Characterization of the CO oxidation/H₂ evolution system of *Rhodospirillum rubrum*: role of a 22-kDa iron sulfur protein in mediating electron transfer between carbon monoxide dehydrogenase and hydrogenase. J. Biol. chem. 266:18395-18403.

Fernández-López, M. Olivares, J. and Bedmar, E.J. 1994. Two differentially regulated nitrate reductases required for nitrate-dependent growth of *Bradyrhizobium japonicum*. Arch. Microbiol. 162, 310-315.

Ferry, J.G. 1992. Biochemistry of methanogenesis. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 27:473-503.

Ferry, J.G. 1993. Fermentation of acetate. En: Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics. J.G. Ferry, ed., pp. 304-334. Chapman and Hall, New York.

Ferry, J.G. 1995. CO Dehydrogenase. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:305-333.

Fox, J.D., Kerby, R.L., Roberts, G.P. y Ludden, P. W. 1996. Characterization of the CO-induced, CO-tolerant hydrogenase from *Rhodospirillum rubrum* and the gene encoding the large subunit of the enzyme. *J. Bacteriol.* 178:1515-1524.

Futo, S. y Meyer, O. 1986. CO₂ is the first species formed upon CO oxidation by CO dehydrogenase from *Pseudomonas carboxidovorans*. *Arch. Microbiol.* 145:358-360.

Frantz, B., Ngai, K.-L., Chatterjee, L., Ornston, L.N. and Chakrabarty, M. 1987. Nucleotide sequence and expression of *clcD*, a plasmid-borne diene lactone hydrolase gene from *Pseudomonas* sp. strain B13. *J. Bacteriol.* 169, 704-709.

Frazer, R.W., Livingstone, D.M., La Porte, D.C. and Lipscomb, J.D. 1993. Cloning, sequencing, and expression of the *Pseudomonas putida* protocatechuate 3,4-dioxygenase genes. *J. Bacteriol.* 175, 6194-6202.

Frunzke, K. y Meyer, O. 1990. Nitrate respiration, denitrification and utilization of nitrogen sources by aerobic carbon monoxide-oxidizing bacteria. *Arch. Microbiol.* 154:168-174.

Gerischer, U., Tran, S. y Ornston, L.N. 1993. Physiological effects exerted by PcaU, a newly discovered gene governing synthesis of enzymes for catabolism of protocatechuate in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Abstr. 93rd Annu. Met. Am. Soc. Microbiol.*, p 32.

Gerstenberg, C., Friedrich, B. y Schlegel, H.G. 1982. Physical evidence for plasmids in autotrophic, especially hydrogen-oxidizing bacteria. *Arch. Microbiol.* 133:90-96.

Gibson, J., Dispensa, M. and Harwood, C.S. 1997. 4-Hydroxybenzoyl coenzyme A reductase (dehydroxylating) is required for anaerobic degradation of 4-hydroxybenzoate by *Rhodopseudomonas palustris* and shares features with molybdenum-containing hydroxylases. *J. Bacteriol.* 179 (3), 634-642

Gremer, L. y Meyer, O. (1996). Characterization of xanthine deshydrogenase from the anaerobic bacterium *Veillonella atypica* and identification of a molybdopterin-cytosine-dinucleotide-containing molybdenum cofactor. *Eur. J. Biochem.* 238, 862-866

Grether-Beck, S., Igloi, G.L., Pust, S., Schilz, E., Decker, K. and Brandsch, R. 1994. Structural analysis and molybdenum-dependent expression of the pAO1-encoded nicotine dehydrogenase genes of *Arthrobacter nicotinovorans*. *Mol. Microbiol.* 13 (5), 929-936.

Hageman, R. H. y Hucklesby, D. P. 1971. Nitrate reduction from higher plants. En: *Methods in Enzymology*. A. San Pietro (Ed.). pp. 491-503. Academic Press. New York.

Hartnett, G.B. y Ornston, L.N. 1994. Acquisition of apparent DNA slippage structures during extensive evolutionary divergence of *pcaD* and *catD* encoding identical catalytic activities in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Gene* 142, 23-29.

Hartnett, G.B., Neidle, E.L., Ngai, K.-L. and Ornston, L.N. 1990. DNA sequences of genes encoding *Acinetobacter calcoaceticus* protocatechuate 3,4-dioxygenase: evidence indicating shuffling of genes and of DNA sequences within genes during their evolutionary divergence. *J. Bacteriol.* 172, 956-966.

Hattori, M. y Sakaki, Y. 1986. Dideoxy sequencing method using denatured plasmid templates. *Anal. Biochem.* 152: 232-238.

Hegeman, G.D. 1984. Oxidation of carbon monoxide by aerobic bacteria. En: *Microbial Growth on C1 Compounds* (R.L. Crawford y R.S. Hanson, eds.), pp. 21-25. Amer. Soc. Microbiol. Washington D.C.

Hugendiek, I. y Meyer, O. 1992. The structural genes encoding CO dehydrogenase subunits (coxL, M, and S) in *Pseudomonas carboxydovorans* OM5

reside on plasmid pHCG3 and are, with the exception of *Streptomyces thermoautotrophicus*, conserved in carboxydophilic bacteria. Arch. Microbiol. 157:301-304.

Henikoff, S. 1984. Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted break points for DNA sequencing. Gene 28: 351-359.

Houde, M., Tiveron, M. C. y Bregegere, F. 1989. Divergence of the nucleotide sequences encoding xanthine dehydrogenase in *Calliphora vicina* and *Drosophila melanogaster*. Gene 85, 391-402.

Hughes, E.J., Shapiro, M.J., Houghton, J.E. and Ornston, L.N. 1988. Cloning and expression of *pca* genes from *Pseudomonas putida* in *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. 134, 2877-2887.

Hughes, R.K., Bennett, B. y Bray, R.C. 1992. Xanthine dehydrogenase from *Drosophila melanogaster*. purification and properties of the wild-type enzyme and of a variant lacking iron-sulfur centers. Biochemistry 31: 3073-3083.

Hughes, R.K., Doyle, W.A., Chovnick, A., Whittle, J.R.S., Burke J.F. y Bray, R.C. 1992. Use of rosy mutant strain from *Drosophila melanogaster* to probe the structure and function of xanthine dehydrogenase. Biochem. J. 285:507-513.

Huisman, G.W., Wonink, E., Meima, R., Kazemier, B., Terpstra, P. and Witholt, B. 1991. Metabolism of poly(3-hydroxyalkanoates) (PHAs) by *Pseudomonas oleovorans*: Identification and sequences of genes and function of the encoded proteins in the synthesis and degradation of PHA. J. Biol. Chem. 266, 2191-2198.

Hussien, Y.A., Tewfik, M.S. and Hamdi, Y.A. 1974. Degradation of certain aromatic compounds by rhizobia. Soil Biol. Biochem. 6, 377-381.

Hyman, M.R., Ensign, S.A., Arp, D.J. y Ludden, P.W. 1989. Carbonyl sulfide inhibition of CO dehydrogenase from *Rhodospirillum rubrum*. Biochemistry 28:6821-6826.

Jablonski, P.E., Lu, W.P., Ragsdale, S.W. y Ferry, J.G. 1993. Characterization of the metal centers of the corrinoid/iron-sulfur components of the CO

dehydrogenase enzyme complex from *Methanosarcina thermophila* by EPR spectroscopy and spectroelectrochemistry. *J. Biol. Chem.* 268: 325-329.

Jacobitz, S. y Meyer, O. 1986. Reduced pyridine nucleotides in *Pseudomonas carboxydovorans* are formed by reverse electron transfer linked to proton motive force. *Arch. Microbiol.*

Jacobitz, S. 1989. Isolierung und Charakterisierung von Cytochrome b₅₆₁ aus *Pseudomonas carboxydovorans* und Identifizierung als physiologischem Elektronenakzeptor von CO dehydrogenase. Ph D. thesis. university of Bayreuth.

Jacobitz, S. y Meyer, O. 1989. Removal of CO dehydrogenase from *Pseudomonas carboxydovorans* cytoplasmic membranes, rebinding of CO dehydrogenase to depleted membrane, and restoration of respiratory activities. *J. Bacteriol.* 171:6294-6299.

Johnson, J.L., Rajagopalan, K.V. y Meyer, O. 1990. Isolation and characterization of a second molybdopterin dinucleotide: molybdopterin cytosine dinucleotide. *Arch. Biochem. Biophys.* 28:542-545.

Kandler, O. 1993. The early diversification of life. En: *Early Life on Earth. Proc. Nobel Symposium'84* (S. Bengtson, ed.), pp. 152-160. Columbia University Press. New York.

Keith, T.P., Riley, M.A., Kreitman, M., Lewontin, R.C., Curtis, D., Chambers, G. 1987. Sequence of the structural gene for xanthine dehydrogenase (*rosy* locus) in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 116, 67-73.

Kerby, R. y Zeikus, J.G. 1983. Growth of *Clostridium thermoaceticum* on H₂/CO₂ or CO as energy source. *Curr. Microbiol.* 8:27-30.

Kerby, R.L., Hong, S.S., Ensign, S.A., Coppoc, L.J. Ludden, P.W. y Roberts, G.P. 1992. Genetic and physiological characterization of the *Rhodospirillum rubrum* carbon monoxide dehydrogenase system. *J. Bacteriol.* 174:5284-5294.

Kerby, R.L., Ludden, P.W. y Roberts, G.P. 1995. Carbon monoxide dependent growth of *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.* 177:2241-2244.

Ketchum, P., Cambier, H.Y., Frazier, W.A., Madansky, C.H. y Nason, A. 1970. In vitro assembly of *Neurospora* assimilatory nitrate reductase from protein subunits of a *Neurospora* mutant and xanthine oxidizing or aldehyde oxidase system of higher animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 66:1016-1023.

Khalil, M.A.K. y Rasmussen, R.A. 1984. Carbon monoxide in the earth's atmosphere: increasing trend. *Science* 224:54-56.

Kim, Y.M. y Hegeman, G.D. 1981a. Purification and some properties of carbon monoxide dehydrogenase from *Pseudomonas carboxydohydrogena*. *J. Bacteriol.* 148:904-911.

Kim, Y.M. y Hegeman, G.D. 1981b. Electron transport system of an aerobic carbon monoxide-oxidizing bacterium. *J. Bacteriol.* 148:991-994.

Kim, Y.M., Kirkconnell, S. y Hegeman, G. 1982. Immunological relationships among carbon monoxide dehydrogenases of carboxydobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 13:219-223.

Kim, Y.M. y Hegeman, G.D. 1983. Oxidation of carbon monoxide by bacteria. *Inter. Rev. Cytol.* 81:1-32.

Kim, Y.M. y Cho, J.W. 1986. Electron transport system of for carbon monoxide oxidation in *Acinetobacter* sp.1. *Kor. J. Microbiol.* 24:46-50.

Kim, Y.M. y Lee, W.H. 1986. Stable subunit pattern of carbon monoxide dehydrogenases from *Pseudomonas carboxydohydrogena* and *Pseudomonas carboxydovorans*. *Kor. Biochem. J.* 19:75-80.

Koch, A.L. y Schmidt, T.M. 1991. The first cellular bionergetic process: primitive generation of a proton motive force. *J. Mol.Evol.* 33:297-304.

Kowalchuck, G.A., Hartnett, G.B., Benson, A., Houghton, J.E., Ngai, K.-L. and Ornston, L.N. 1994. Contrasting patterns of evolutionary divergence within the *Acinetobacter calcoaceticus* *pca* operon. *Gene*, 146, 23-30.

Kraut, M y Meyer, O. 1988. Plasmids in carboxydophilic bacteria: physical and restriction analysis. Arch. Microbiol. 149:540-546.

Kraut, M., Hugendiek, I., Herwig, S. y Meyer, O. 1989. Homology and distribution of CO dehydrogenase structural genes in carboxydophilic bacteria, Arch. Microbiol. 152:335-341.

Krüger, B. y Meyer, O. 1984. Thermophilic Bacilli growing with carbon monoxide. Arch. Microbiol. 139:402-408.

Krüger, B. y Meyer, O. 1986. The pterin (bactopterin) of carbon monoxide dehydrogenase from *Pseudomonas carboxydovorans*. Eur. J. Biochem. 157:121-128.

Kumar, M., Lu, W.P., Liu, L.F. y Ragsdale, S.W. 1993. Kinetic evidence that carbon monoxide dehydrogenase catalyzes the oxidation of carbon monoxide and the synthesis of acetyl-CoA at separate metal centers. J. Am. Chem. Soc. 115:11646-11647.

Kwon, M.O. y Kim, Y.M. 1985. Relationship between carbon monoxide dehydrogenase and a small plasmid of *Pseudomonas carboxydovorans*. FEMS Microbiol. Lett. 29:155-159.

Lederberg, E.M. y Cohen, S.N. 1974. Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol. 119:1072-1074.

Lehmann, M., Tshisuaka, B., Fetzner, S. and Lingens, F. 1995. Molecular cloning of the isoquinoline 1-oxidoreductase genes from *Pseudomonas diminuta* 7, structural analysis of *iorA* and *iorB*, and sequence comparisons with other molybdenum-containing hydroxylases J. Biol. Chem. 270 (24), 14420-14429.

Lepo, J. E. Hickok, R. E., Russell, S. A. y Evans, H. J.. 1981. Revertible hydrogen-uptake deficient mutants of *Rhizobium japonicum*. J. Bacteriol. 146: 614-620.

Ljungdahl, L.G. 1994. The acetyl-CoA pathway and the chemiosmotic generation of ATP during acetogenesis. En: Acetogenesis (H.L. Drake, ed.), pp. 63-87. Chapman and Hall, New York.

Löw, A., Sprinzl, M. & Faulhammer, H.G. (1993). Affinity labeling of c-H-ras p21 consensus elements with periodate-oxidized GDP and GTP, *Eur. J. Biochem.* 215:473-479.

Lu, W.P., Schiau, I., Cunningham, J.R. y Ragsdale, S.W. 1993. Sequence and expression of the gene encoding the corrinoid/iron-sulfur protein from *Clostridium thermoaceticum* and reconstitution of the recombinant protein to full activity. *J. Biol. Chem.* 268:5605-5614.

Lu, W.P., Jablonski, P.E., Rasche, M., Ferry, J.G. y Ragsdale, S.W. 1994. Characterization of the metal centers of the Ni/Fe-S component of the carbon monoxide dehydrogenase enzyme complex from *Methanosarcina thermophila*. *J. Biol. Chem.* 269:9736-9742.

Lupton, F.S., Conrad, R. y Zeikus, J.G. 1984. CO metabolism of *Desulfovibrio vulgaris* strain madison: physiological function in the absence or presence of exogenous substrates. *FEMS Microbiol. Lett.* 23:263-268.

Maier, R. J. y Brill, W.J. 1978. Involvement of *Rhizobium japonicum* O antigen in soybean nodulation. *J. Bacteriol.* 133: 1295-1299.

Markwell, M. A., Hass, S. M., Bieber, L. y Tolberg, N. 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination. *Anal. Biochem.* 87: 206-210.

Maupin, J.A. y Ferry, J.G. 1993. Corrinoid-containing cobalt/iron-sulfur component of the CO dehydrogenase complex from *Methanosarcina thermophila* strain TM-1: cloning, sequencing, and overexpression in *Escherichia coli*. Abstract General Meeting Am. Soc. Microbiol. 93rd, 113, 242.

Maupin-Furrow, J. y Ferry, J.G. 1996. Characterization of the *cdhD* and *cdhE* genes encoding subunits of the corrinoid/iron-sulfur enzyme of the CO dehydrogenase complex from *Methanosarcina thermophila*. *J. Bacteriol.* 178:340-346.

Meyer, O y Schlegel, H.G. 1977. Carbon monoxide oxidation by a new hydrogen bacterium. En: *Microbial Growth on C₁-Compounds* (G.K. Skryabin, ed.),

pp. 95-97. Scientific Center for Biological Research. USSR Academy of Sciences. Pushchino.

Meyer, O. y Schlegel, H.G. 1978. Reisolation of the carbon monoxide-utilizing hydrogen bacterium *Pseudomonas carboxydovorans* (Kistner) comb. nov. *Arch. Microbiol.* 118: 35-43.

Meyer, O y Schlegel, H.G. 1979. Oxidation of carbon monoxide in cell extracts of *Pseudomonas carboxydovorans*. *J. Bacteriol.* 137:811-817.

Meyer, O y Schlegel, H.G. 1980. Carbon monoxide:methylene blue oxidoreductase from *Pseudomonas carboxydovorans*. *J. Bacteriol.* 141:74-80.

Meyer, O. 1982. Chemical and spectral properties of of carbon monoxide methylene blue oxidoreductase. The molybdenum-containing iron-sulfur flavoprotein from *Pseudomonas carboxydovorans*. *J. Biol. Chem.* 257:1333-1341.

Meyer, O. 1982. Chemical and spectral properties of carbon monoxide:methylene blue oxidoreductase. The molibdenum-containing iron-sulfur flavoprotein from *Pseudomonas carboxydovorans*. *J. Biol. Chem.* 257:1333-1341.

Meyer, O y Schlegel, H.G. 1983. Biology of aerobic carbon monoxide-oxidizing bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 37:277-310.

Meyer, O. y Rohde, M. 1984. Enzymology and bioenergetics of carbon monoxide-oxidizing bacteria. En: *Microbial Growth on C1 Compounds* (R.L. Crawford y R.S. Hanson, eds.), pp. 26-33. Amer. Soc. Microbiol. Washington D.C.

Meyer, O. y Rajagopalan, K.V. 1984a. Molybdopterin in carbon monoxide oxidase from carboxydrotrophic bacteria, *J. Bacteriol.* 157:643-648.

Meyer, O. y Rajagopalan, K.V. 1984b. Selenite-binding to carbon monoxide oxidase from *Pseudomonas carboxydovorans*. Selenium binds covalently to the protein and activates specifically the CO:methylene blue reaction. *J. Biol. Chem.* 259:5612-5617.

Meyer, O. 1985. Metabolism of aerobic carbon monoxide-utilizing bacteria. En: *Microbial Gas Metabolism* (R.K. Poole y C.S. Dow, eds.), pp. 131-151. Academic Press. London.

Meyer, O. y Fiebig, K. 1985. Enzymes oxidizing carbon monoxide. En: *Gas Enzymology* (H. Degn, R.P. Cox y H. Toftlund, eds.), pp. 147-168. Reidel, Dordrecht, The Netherlands.

Meyer, O., Jacobitz, S. y Kruger, B. 1986. Biochemistry and physiology of aerobic carbon monoxide-utilizing bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 39:161-179.

Meyer, O. 1989. Aerobic carbon monoxide-oxidizing bacteria. En: *Autotrophic Bacteria* (H. G. Schlegel y B. Bowien, eds.), pp. 331-360. Springer Verlag. Berlín.

Meyer, O., Frunzke, K., Gadkari, D., Jacobitz, S., Hugendiek, I. y Kraut, M. 1990. Utilization of carbon monoxide by aerobes: recent advances. *FEMS Microbiol. Rev.* 87:253-260.

Meyer, O., Stackebrandt, E. y Auling, G. 1993a. Reclassification of ubiquinone Q-10 containing carboxydrotrophic bacteria transfer of "[*Pseudomonas*] carboxydovorans" OM5^T to *Oligotropha*, gen. nov., as *Oligotropha carboxydovorans*, comb. nov., transfer of "[*Alcaligenes*] carboxydus" DSM 1086^T to *Carbophilus*, gen. nov., as *Carbophilus carboxidus* comb. nov., transfer of "[*Pseudomonas*] compransoris" DSM 1231^T to *Zavarzinia*, gen. nov., as *Zavarzinia compransoris*, comb. nov., and amended description of the new genera. *Syst. Appl. microbiol.* 16: 390-395.

Meyer, O. Frunzke, K. y Mosdörf, G. 1993b. Biochemistry of the aerobic utilization of carbon monoxide. En: *Microbial Growth on C1 Compounds* (J.C. Murrell y D.P. Kelly, eds.), pp. 433-459. Intercept, Ltd. Andover, UK.

Meyer, O., Frunzje, H., Tachil J. y Volk, M. 1993c. The bacterial molybdenum cofactor. En: *Molybdenum Enzymes, Cofactors, and Model Systems* (I. Stiefel, D. Coucouvanis y W.E. Newton, eds.), pp. 50-68. American Chemical Society, Washington D.C.

Miller, J.H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, CHS, New York.

Murray, P.A. y Uffen, R.L. 1988. Influence of cyclic AMP on the growth response and anaerobic metabolism of carbon monoxide in *Rhodocyclus gelatinosus*. Arch. Microbiol. 149:312-316.

Nagy, I., Verheijen S., de Schrijver A., Van Damme J., Proost P., Schoofs G., Vanderleyden J. y De Mot R.. (1995). Characterization of the *Rhodococcus sp.* NI86/21 gene encoding alcohol: N,N'-dimethyl-4-nitrosoaniline oxidoreductase inducible by atrazine and thiocarbamate herbicides. Arch. Microbiol. 163,439-446.

Nozhevnikova, A.N. y Yurganov, L.N. 1978. Microbiological aspects of regulating the carbon monoxide content in the earth's atmosphere. En: Advances in Microbial Ecology, Vol. 2 (M. Alexander, ed.), pp. 203-244. Plenum, New York.

O'Brien, J.M., Wolking, R.H., Moench, T.T., Morgan, J.B. y Zeikus, J.G. 1984. Association of hydrogen metabolism with unitrophic or mixotrophic growth of *Methanosarcina barkeri* on carbon monoxide. J. Bacteriol. 158:373-375.

Ohtsuki, T., Okazaki, T., Endo, Y., Kita, Y., Shimosaka, M y Okazaki, M. 1995. Cloning and sequencing of the membrane-bound hydrogenase-encoding genes (*hupS* and *hupL*) from *Pseudomonas hydrogenovora*. Gene 166: 89-93.

Ornston, L.N. y Parke, D. 1977. The evolution of induction mechanisms in bacteria: insights derived from the study of the β -ketoadipate pathway. In: Current Topics in Regulation (Horecker, B. L. y Stadtman, E. R., Eds), Vol.12, pp.209-262, Academic Press, New York, NY.

Parales, R.E. and Harwood, C.H. 1993. Regulation of the *pcaIJ* genes for aromatic degradation in *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. 175, 5829-5838.

Pathak, D., Ashely, G. and Ollis, D. 1991. Thiol-protease-like active site found in the enzyme dienelactone hydrolase: localization using biochemical, genetic, and structural tools. Proteins 9, 267-279.

Park, Y. y Hegeman, G. 1984. The oxidation of carbon monoxide by bacteria. En: Microbial Chemoautotrophy (W.R. Strohl y O.H. Tuovinem, eds.), pp. 211-218. Ohio State University Press. Columbus.

Parke, N.L. 1995. Supraoperonic clustering of *pca* genes for catabolism of the phenolic compound protocatechuate in *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 177, 3808-3817.

Parke, N.L. 1996. Conservation of PcaQ, a transcriptional activator of *pca* genes for catabolism of phenolic compounds, in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium* species. J. Bacteriol. 178, 3671-3675.

Parke, D. and Ornston, L.N. 1984. Nutritional diversity revealed by auxanography. J. Gen. Microbiol. 130, 1743-1750.

Parke, D. and Ornston, L.N. 1986. Enzymes of the β -keto adipate pathway are inducible in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. and constitutive in *Bradyrhizobium* spp. J. Bacteriol. 165, 288-292.

Parke, D. 1997. Acquisition, reorganization, and merger of genes: novel management of the β -Keto adipate pathway in *Agrobacterim tumefaciens*. FEMS Microbiology letters. 146: 3-12.

Pearson, D. M., O'Reilly, C., Colby, J. y Black, G.W. 1994. DNA sequence of the cutA, B and C genes, encoding the molybdenum containing hydroxylase carbon monoxide dehydrogenase from *Pseudomonas thermocarboxydovorans* strain C2. Biochim. Biophys. Acta 1188:432-438.

Peer, C.W., Painter, M.H., Rasche, M.E. y Ferry, J.G. 1994. Characterization of a CO:heterodisulfide oxidoreductase system from acetate-grown *Methanosarcina thermophila*. J. Bacteriol. 176:6974-6979.

Phillips, M.K., Hederstedt, L., Hasnain, S., Rutberg, L. y Guest, J.R. 1987. Nucleotide sequence encoding the flavoprotein and iron-sulfur protein subunits of the *Bacillus subtilis* PY79 succinate dehydrogenase complex. J. Bacteriol. 169, 864-873.

Prentki, P. y Krisch, H.M. 1984. In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* 29: 101-106

Rabus, R., Nordhaus, R., Ludwig, W. y Widdel, F. 1993. Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1444-1451.1

Ragsdale, S.W. 1991. Enzymology of the acetyl-CoA pathway of CO₂ fixation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26:261-300.

Ragsdale, S.W. 1994. CO dehydrogenase and the central role of this enzyme in the fixation of carbon dioxide by anaerobic bacteria. En: *Acetogenesis* (Drake, H.L., ed.), pp. 88-127. Chapman and Hall, New York.

Ragsdale, S.W. y Kumar, M. 1996. *Chem. Rev.* En prensa.

Ragsdale, S.W., Clark, J.E., Ljungdahl, L.G., Lundie, L.L y Drake, H.L. 1983. Properties of purified carbon monoxide dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*, a nickel, iron-sulfur protein. *J. Biol. Chem.* 258:2364-2369.

Ragsdale, S.W., Kumar, M., Menon, S., Seravalli, J., Qiu, D. y Spiro, T.G. 1996. Biological bimetallic catalysis by nickel/iron-sulfur clusters. En: *Workshop on Regulation of hydrogenases biosynthesis. Cost Action 818.* Berlin.

Raybuck, S.A., Ramer, S.E., Abbanat, D.R., Peters, J.W. y Orme-Johnson, W.H. 1991. Demonstration of carbon-carbon bond cleavage of acetyl-CoA by using isotopic exchange catalyzed by the CO dehydrogenase complex from acetate grown *Methanosarcina thermophila*. *J. Bacteriol.* 173:929-932.

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

Roberts, D.L., James-Hagstrom, J.E., Garvin, D.K., Gorst, C.M. y Runquist, J.A. 1989. Cloning and expression of the gene cluster encoding key proteins involved in acetyl-CoA synthesis in *Clostridium thermoaceticum*: CO dehydrogenase, the corrinoid/Fe-S protein, and methyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1-5.

Rodriguez, R. L. y Tait, R. C. 1983. Recombinant DNA techniques. Addison-Wesley Publishing.

Rohde, M., Mayer, F. y Meyer, O. 1984. Immunocytochemical localization of carbon monoxide oxidase in *Pseudomonas carboxydovorans*. The enzyme is attached to the inner aspect of the cytoplasmic membrane. *J. Biol. Chem.* 259:14788-14792.

Rohde, M., Mayer, F., Jacobitz, S. y Meyer, O. 1985. Attachment of CO dehydrogenase to the cytoplasmic membranes is limiting the respiratory rate of *Pseudomonas carboxydovorans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 28:141-144.

Romao, M. J., Archer, M., Moura, J. J., LeGall, J., Engh, R., Schneider, M., Hof, P. y Huber, R. 1995. Crystal structure of the xanthine oxidase-related aldehyde oxido-reductase from *D. gigas*. *Science* 270: 1170-1176.

Romero-Steiner, S., Parales, R.E., Harwood, C.S. and Houghton, J.E. 1994. Characterization of the *pcaR* regulatory gene from *Pseudomonas putida*, which is required for the complete degradation of p-hydroxybenzoate. *J. Bacteriol.* 176, 5771-5779.

Sambrook, J. Fritsch, E. F. y Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Santiago, B. y Meyer, O. 1991. CO dehydrogenase from *Pseudomonas carboxydovorans* carries the activity of a H₂-evolving hydrogenase. *Bioforum* 14:68-76

Sanger, F. Nicklen, S. y Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 5463-5467.

Santiago, B. y Meyer, O. 1992. Hydrogenase activities under different growth conditions in *Pseudomonas carboxydovorans*. *BioEngineering* 8: 75-83

Schmidt, E. and Knackmuss, H.-J. 1980. Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. *Biochem. J.* 192, 339-347.

Schübel, U, Kraut, M., Mörsdorf, G. y Meyer, O. 1995. Molecular characterization of the gene cluster *coxMSL* encoding the molybdenum-containing carbon monoxide dehydrogenase of *Oligotropha carboxydovorans*. *J. Bacteriol* 177:2197-2203.

Shanmugasundaram, T. y Wood, H.G. 1992. Interaction of ferredoxin with carbon monoxide hydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*. *J. Biol. Chem.* 267:897-900.

Shelver, D., Kerby, R.L. He, Y. y Roberts, G.P. 1995. Carbon monoxide-induced activation of gene expression in *Rhodospirillum rubrum* requires the product of *cooA*, a member of the cyclic AMP receptor protein family of transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 177:2157-2163.

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

Simpson, P.G. y Whitman, W.B. 1993. Anabolic pathways in methanogens. En: *Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics*. J.G. Ferry, ed., pp. 3445-472. Chapman and Hall, New York.

Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. bacteriol.* 170: 1721-1729.

Terlesky, K.C., Nelson, M.J.K. y Ferry, J.G. 1986. Isolation of an enzyme complex with carbon monoxide dehydrogenase activity containing a corrinoid and nickel from acetate-grown *Methanosarcina thermophila*. *J. Bacteriol.* 168:1053-1058.

Takahashi, N., Takahashi, Y. y Putnam, F. W. 1985. Periodicity of leucine and tandem repetition of a 24-amino acid segment in the primary structure of leucine-rich α 2-glycoprotein of human serum. *Proc. Natl. Sci. USA.* 82: 1906-1910.

Thauer, R.K. 1988. Citric acid cycle, 50 years on: modifications and an alternative pathway in anarobic bacteria. *Eur. J. Biochem.* 176:497-508.

Thauer, R.K., Moller-Zinckhan, D. y Spormann, A.M. 1989. Biochemistry of acetate catabolism in anaerobic chemotrophic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 43:43-67.

Thoenes, U., Flores, O.L., Neves, A., Devreese, B., van Beeumen, J.J., Huber, R., Romao, M.J., LeGall, J., Moura, J.J.G., Rodrigues-Pousada. 1994. Molecular cloning and sequence analysis of the gene of the molybdenum-containing aldehyde oxido-reductase of *Desulfovibrio gigas*. The deduced amino acid sequence shows similarity to xanthine dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 220, 901-910.

Timm, A. and Steinbuechel, A. 1992. Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) gene locus of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Eur. J. Biochem.* 209, 15-30

Tojo N., Inouye S. y Komano T. 1993. The *lonD* Is Homologous to the *lon* Gene Encoding an ATP-Dependent Protease and Is Essential for the Development of *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology* 175 (14), 4545-4549.

Uffen, R.L. 1976. Anaerobic growth of a *Rhodopseudomonas* species in the dark with carbon monoxide as sole carbon and energy substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:3298-3302.

Uffen, R.L. 1981. Metabolism of carbon monoxide. *Enzyme Microb. Technol.* 3:197-206.

Uffen, R.L. 1983. Metabolism of carbon monoxide by *Rhodopseudomonas gelatinosa*: cell growth and properties of the oxidation system. *J. Bacteriol.* 155:956-965.

van Rossum, D., Schuurmans, F.P., Gillis, M., Muyotcha, A., van Verseveld, H.W., Stouthamer, A.H. and Boogerd, F.C. 1995. Genetic and phenetic analyses of *Bradyrhizobium* strains nodulating peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1599-1609.

van Spanning R.J.M., W. Wansell C., de Boer T., Hazelaar M.J., Anaza H., Harms N., Oltmann L.F., y Stouthamer A. H.. (1991). Isolation and Characterization of the *moxJ*, *moxG*, *moxI* and *moxR* Genes of *Paracoccus denitrificans*: inactivation of

moxJ, *moxG*, and *moxR* and the Resultant Effect on Methilotrophic Growth. *Journal of Bacteriology* 173 (21), 6948-6961.

Vincent, J. M. 1970. A manual for the practical study of the root nodule bacteria. International biological programme handbook 15. Blackwell. Oxford.

Wakim, B.T. y Uffen, R.L. 1983. Membrane association of the carbon monoxide oxidation system in *Rhodopseudomonas gelatinosa*. *J. Bacteriol.* 153:571-573.

Williams, S.E., Woolridge, E.M., Ransom, S.C., Landro, J.A., Babbitt, P.C., and Kozarich, J.W. 1992. 3-carboxy-cis,cis-muconate lactonizing enzyme from *Pseudomonas putida* is homologous to the class II fumarase family: a new reaction in the evolution of a mechanistic motif. *Biochemistry* 31, 9768-9776.

Wong, C.M., Dilworth, M.J. and Glenn, R. 1991. Evidence for two uptake systems in *Rhizobium leguminosarum* for hydroxy-aromatic compounds metabolized by the 3-oxoadipate pathway. *Arch. Microbiol.* 156, 383-391.

Xia, J., Sinclair, J.F., Baldwin, T.O. y Lindahl, P.A. 1996. Carbon monoxide dehydrogenases from *Clostridium thermoaceticum*: quaternary structure, stoichiometry of its SDS-induced dissociation, and characterization of the faster-migrating form. *Biochemistry* 35:1965-1971.

Yanisch-Perron, C. Vieira, J. y Messing, J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119.

Yeh, W.-K., Fletcher, P. and Ornston, L.N. 1980. Homologies in the NH₂ terminal amino acid sequence of g-carboxy-muconolactone decarboxylases and muconalactone isomerases. *J. Biol. Chem.* 255, 6347-6354.

Zavarzin, G.A. y Nozhevnikova, A.N. 1977. Aerobic carboxydobacteria. *Microb. Ecol.* 3:305-326.