



ugr | Universidad
de Granada



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

UNIVERSIDAD DE GRANADA

PROGRAMA DE DOCTORADO DE
BIOLOGÍA FUNDAMENTAL Y DE SISTEMAS

**A coordinated pathway for nitrate assimilation
and nitric oxide detoxification in
*Bradyrhizobium diazoefficiens***

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos
Estación Experimental del Zaidín, CSIC-Granada



TESIS DOCTORAL

Juan José Cabrera Rodríguez

Granada, 2017

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Juan José Cabrera Rodríguez
ISBN: 978-84-9163-473-7
URI: <http://hdl.handle.net/10481/48220>



ugr | Universidad
de Granada



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



UNIVERSIDAD DE GRANADA

PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOLOGÍA FUNDAMENTAL Y DE SISTEMAS

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos

Estación Experimental del Zaidín, CSIC-Granada

**A coordinated pathway for nitrate assimilation
and nitric oxide detoxification in
*Bradyrhizobium diazoefficiens***

Memoria de Tesis Doctoral presentada por el licenciado en Bioquímica

Juan José Cabrera Rodríguez para aspirar al Grado de Doctor

Fdo. Juan José Cabrera Rodríguez

VºBº La Directora

Fdo. María J. Delgado Igeño

Doctora en Biología

Investigadora Científica del CSIC

Granada, 2017

Esta Tesis Doctoral se ha realizado en el Grupo del Metabolismo del Nitrógeno del Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada.

A continuación, se enumeran las publicaciones en revistas científicas donde se ha presentado resultados obtenidos durante esta Tesis Doctoral:

- **Dissecting the role of NtrC and RpoN in the expression of assimilatory nitrate and nitrite reductases in *Bradyrhizobium diazoefficiens*.** López MF, **Cabrera JJ**, Salas A, Delgado MJ and López-García SL. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2017 Apr;110(4):531-542. doi: 10.1007/s10482-016-0821-3. (IF: 1.944, MICROBIOLOGY, Q3).
- **An integrated biochemical system for nitrate assimilation and nitric oxide detoxification in *Bradyrhizobium japonicum*.** **Cabrera JJ**, Salas A, Torres MJ, Bedmar EJ, Richardson DJ, Gates AJ and Delgado MJ. *Biochem. J.* 2016 Feb; 473(3):297-309. doi: 10.1042/BJ20150880. (IF: 4.396, BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY, Q1).
- **The nitric oxide response in plant-associated endosymbiotic bacteria.** **Cabrera JJ**, Sánchez C, Gates AJ, Bedmar EJ, Mesa S, Richardson DJ and Delgado MJ. *Biochem Soc Trans.* 2011 Dec; 39(6):1880-5. doi: 10.1042/BST20110732. (IF: 3.711, BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY, Q2).
- **Nitric oxide detoxification in the rhizobia-legume symbiosis.** Sánchez C, **Cabrera JJ**, Gates AJ, Bedmar EJ, Richardson DJ and Delgado MJ. *Biochem Soc Trans.* 2011 Jan; 39(1):184-8. doi: 10.1042/BST0390184. (IF: 3.711, BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY, Q2).

A continuación, se enumeran las participaciones en congresos y reuniones donde se ha presentado resultados obtenidos durante esta Tesis Doctoral:

- **A coordinated pathway for nitrate assimilation and nitric oxide metabolism in plant-associated endosymbiotic bacteria.** Delgado MJ, Salas A, **Cabrera JJ**, Torres MJ, Hidalgo A, Tortosa G, Mesa S, Bedmar EJ, Girard L, Richardson DJ and Gates AJ. 21st European Nitrogen Cycle Annual Meeting, Norwich, United Kingdom 5-7 September 2016.
- **Purification and biochemical characterization of the two-component nitric oxide detoxification system Bjgb-Flp from *Bradyrhizobium diazoefficiens*.** Salas A, Edwards MJ, **Cabrera JJ**, Bedmar EJ, Richardson DJ, Delgado MJ and Gates AJ. 21st European Nitrogen Cycle Annual Meeting, Norwich, United Kingdom 5-7 September 2016.
- **Nitrate assimilation and nitric oxide metabolism in *Bradyrhizobium japonicum*.** Salas A, **Cabrera JJ**, Mesa S, Bedmar EJ, Richardson DJ, Gates AJ and Delgado MJ. XIII National meeting of nitrogen metabolism, Villanueva de la Serena (Badajoz), Spain 4-6 February 2016.
- **Nitric oxide and nitrous oxide metabolism in the *Glycine max-Bradyrhizobium japonicum* symbiosis.** **Cabrera JJ**, Salas A, Torres MJ, Bedmar EJ, Richardson DJ, Gates AJ and Delgado MJ. 23rd North Americas Conference on Symbiotic Nitrogen Fixation, Ixtapa, México 6-10 December 2015.

- **Nitrate assimilation and nitric oxide detoxification in *Bradyrhizobium japonicum*.** Salas A, **Cabrera JJ**, López MF, Torres MJ, López-García SL, Mesa S, Bedmar EJ, Richardson DJ, Gates AJ and Delgado MJ. XV National Meeting of the Spanish Society of Nitrogen Fixation and IV Portuguese-Spanish Congress on Nitrogen Fixation, León, Spain 16-18 June 2015.
- **Co-regulation of nitrate assimilation and nitric oxide metabolism in *Bradyrhizobium japonicum*.** Salas A, **Cabrera JJ**, López MF, Torres MJ, López-García SL, Bedmar EJ, Richardson DJ, Gates AJ, Delgado MJ. Meeting in the series Bacterial Electron Transfer Processes and their Regulation, Vimeiro, Portugal 15-18 March 2015.
- **A new integrated system for nitrate assimilation and nitric oxide detoxification in *Bradyrhizobium japonicum*.** **Cabrera JJ**, Torres MJ, Bedmar EJ, Richardson DJ, Gates AJ and Delgado MJ. XII National meeting of nitrogen metabolism, Bilbao, Spain 7-9 July 2014
- **An Integrated biochemical system for nitrate assimilation and nitric oxide detoxification in *Bradyrhizobium japonicum*.** **Cabrera JJ**, Sanchez C, Bedmar EJ, Richardson DJ, Gates AJ and Delgado MJ. 18th European N-cycle meeting, Darmstadt, Germany, September 18-20, 2013
- **Nitric oxide detoxification and nitrate assimilation in *Bradyrhizobium japonicum*.** **Cabrera JJ**, Sanchez C, Gates AJ, Bedmar EJ, Richardson DJ and Delgado MJ. 17th European N-cycle meeting, Oslo, Norway, September 26-28, 2012
- **Destoxificación de óxido nítrico y asimilación de nitrato en *Bradyrhizobium Japonicum*.** **Cabrera JJ**, Sánchez C, Bedmar EJ and Delgado MJ, XI National meeting of nitrogen metabolism, Cáceres, Spain 12-14 June 2012
- **Characterization of a *Bradyrhizobium japonicum* gene cluster involved in nitric oxide detoxification.** **Cabrera JJ**, Sánchez C, Meakin GE, Bedmar EJ, Richardson DJ, and Delgado MJ. 16th European N-cycle meeting, Nijmegen, Netherlands, 3-7 July 2011
- **Nitric Oxide detoxification in legume-associated endosymbiotic bacteria.** Sánchez C, **Cabrera JJ**, Gates AJ, Bedmar EJ, Richardson DJ and Delgado MJ. 15th European Meeting of Enzymology and Ecology of the Nitrogen Cycle, Birmingham, England, 15-17 August 2010
- **The role of *Bradyrhizobium japonicum* nirB gene in nitric oxide detoxification in soybean nodules.** Sánchez C, **Cabrera JJ**, Meakin GE, Gates AJ, Richardson DJ, Bedmar EJ and Delgado MJ. XIII National Meeting of the Spanish Society of Nitrogen Fixation (SEFIN), Zaragoza, Spain, 15-18 June 2010

El doctorando / *The doctoral candidate* **Juan José Cabrera Rodríguez** y la directora de la tesis / *and the thesis supervisor*: **María Jesús Delgado Igeño**

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

/

Guarantee, by signing this doctoral thesis, that the work has been done by the doctoral candidate under the direction of the thesis supervisor/s and, as far as our knowledge reaches, in the performance of the work, the rights of other authors to be cited (when their results or publications have been used) have been respected.

Lugar y fecha / *Place and date*:

Granada a 13 de junio de 2017

Directora de la Tesis / *Thesis supervisor*; Doctorando / *Doctoral candidate*:

Firma / *Signed*

María Jesús Delgado Igeño

Firma / *Signed*

Juan José Cabrera Rodríguez

ÍNDICE

1. RESUMEN / SUMMARY	9
2. INTRODUCCIÓN GENERAL	19
2.1. Ciclo del nitrógeno	19
2.1.1. Impacto antropogénico en el ciclo del Nitrógeno	22
2.2. Asimilación de NO_3^- y NO_2^- en bacterias	23
2.2.1. Bioquímica de la asimilación de nitrato y nitrito	25
2.2.1.1. Nitrato reductasas asimilativas (Nas)	25
2.2.1.2. Nitrito reductasas asimilativas (Nir)	29
2.2.2. Transporte de nitrato y nitrito	30
2.2.3. Organización de los genes codificantes de las nitrato y nitrito reductasas asimilativas	32
2.2.4. Regulación de la asimilación de nitrato y nitrito	35
2.2.4.1. Regulación general de la asimilación de compuestos nitrogenados	35
2.2.4.2. Regulación específica de la asimilación de nitrato y nitrito	37
2.2.5. Incorporación del amonio a esqueletos carbonados	40
2.3. Metabolismo de NO en bacterias	41
2.3.1. Producción de NO	43
2.3.1.1. Fuentes respiratorias	44
2.3.1.1.1. Desnitrificación	44
2.3.1.1.1.1. Nitrito reductasas NirK y NirS	46
2.3.1.1.2. Reducción desasimilativa de nitrato a amonio	48
2.3.1.1.3. Nitrito reductasa NrfA	49
2.3.1.2. Fuentes no respiratorias	50
2.3.1.2.1. NOS bacterianas (bNOS)	51
2.3.1.2.2. Nitrato reductasas de molibdeno	52
2.3.2. Destoxificación de NO	55
2.3.2.1. Hemoglobinas	55
2.3.2.1.1. Flavohemoglobinas	56
2.3.2.1.2. Hemoglobinas de dominio único	57
2.3.2.1.3. Hemoglobinas truncadas	57
2.3.2.2. Óxido Nítrico reductasas	58
2.3.2.3. Flavorrubredoxinas	60
2.3.2.4. NrfA	61
2.3.2.5. Hcp (Hybrid cluster protein)	61
2.3.2.6. Otros sistemas para destoxificar NO	62

2.3.3. Regulación en respuesta a NO	63
2.3.3.1. Reguladores de respuesta a NO	63
2.3.3.1.1. NnrR y DNR	63
2.3.3.1.2. NorR	64
2.3.3.1.3. NsrR	65
2.3.3.2. Otros reguladores implicados en estrés nitrosativo	65
2.4. Metabolismo de NO en rizobios	67
2.4.1. Simbiosis Rhizobium-Leguminosa	67
2.4.2. Nitrogenasa	69
2.4.3. Control por oxígeno en el nódulo	69
2.4.4. Regulación	70
2.4.5. Desnitrificación en Rizobios. <i>B. diazoefficiens</i> como organismo modelo	72
2.4.5.1. Nitrato reductasa periplásmica	73
2.4.5.2. Nitrito reductasa de cobre	73
2.4.5.3. Óxido Nítrico Reductasa tipo c	73
2.4.5.4. Óxido Nitroso Reductasa	74
2.4.5.5. Regulación de la desnitrificación en <i>B. diazoefficiens</i> . Respuesta a NO	74
2.4.6. Metabolismo de NO en nódulos de soja	76
3. OBJETIVOS	81
4. MATERIALES Y MÉTODOS	87
4.1. Materiales	87
4.1.1. Cepas bacterianas	87
4.1.2. Plásmidos	89
4.1.3. Oligonucleótidos	92
4.1.4. Medios de cultivo	95
4.1.5. Antibióticos	98
4.1.6. Materiales químicos y bioquímicos	99
4.2. Métodos Microbiológicos	102
4.2.1. Conservación de cepas bacterianas	102
4.2.2. Cultivo de células de <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	103
4.2.2.1. Precultivos e inoculación	103
4.2.2.2. Cultivos aeróbicos	103
4.2.2.3. Cultivos anaeróbicos	104
4.2.2.4. Cultivos microaeróbicos	104
4.2.2.5. Incubación de células en microaerobiosis y anaerobiosis con nitrato	105
4.2.2.6. Determinación del número de unidades formadoras de colonias (UFC/ml)	105

4.2.3. Obtención de las fracciones soluble (citosol) y particulada (membranas) de <i>B. diazoefficiens</i>	105
4.2.4. Generación de cepas mutantes por delección en fase sin marcador	106
4.3. Métodos Analíticos	107
4.3.1. Determinación de actividad nitrato reductasa (NR)	107
4.3.2. Determinación de actividad nitrito reductasa (NiR)	108
4.3.3. Determinación de nitrito	109
4.3.4. Determinación de óxido nitroso	109
4.3.5. Determinación de óxido nítrico	109
4.3.5.1. Preparación del sistema electrodo-membrana	110
4.3.5.2. Calibración del sistema	111
4.3.5.2.1. Calibración con una solución acuosa de NO	111
4.3.5.3. Determinación de consumo de NO	111
4.3.6. Determinación de actividad β -galactosidasa	112
4.3.7. Determinación de proteína	113
4.3.7.1. Reactivo de Bio-Rad	113
4.3.8. Detección de citocromos tipo c en membranas de <i>B. diazoefficiens</i>	114
4.3.8.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS)	114
4.3.8.2. Transferencia a membranas de nitrocelulosa	114
4.3.8.3. Detección de citocromos tipo c	115
4.4. Métodos de Biología Molecular	115
4.4.1. Obtención de ADN total de <i>B. diazoefficiens</i> .	115
4.4.1.1. Lisados por calor	115
4.4.1.2. Método comercial	116
4.4.2. Obtención de ADN plasmídico de <i>E coli</i> (minipreps)	116
4.4.2.1. Método TENS	116
4.4.2.2. Método comercial	117
4.4.3. Obtención de ADN plasmídico de <i>B. diazoefficiens</i>	118
4.4.4. Amplificación de ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	119
4.4.5. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	120
4.4.6. Purificación de fragmentos de PCR	121
4.4.6.1. Purificación de fragmentos de PCR	121
4.4.6.2. A partir de geles de agarosa	121
4.4.7. Aislamiento de ARN total de células de <i>B. diazoefficiens</i>	122
4.4.7.1. Reverso transcripción	123
4.4.8. Determinación de la concentración de ADN y ARN	124
4.4.9. Secuenciación de ADN	125

4.4.10. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción _____	125
4.4.11. Ligación de fragmentos de restricción en vectores de clonación _____	127
4.4.11.1. Ligación a vectores de clonación _____	127
4.4.11.2. Defosforilación de vectores clonación _____	128
4.4.12. Transformación de células de <i>E. coli</i> _____	128
4.4.12.1. Preparación de células competentes con RbCl _____	128
4.4.12.2. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> _____	129
4.4.13. Transferencia de ADN a células de <i>B. diazoefficiens</i> mediante conjugación _____	130
4.4.14. Ensayo de Co-transcripción (RT-PCR) _____	131
4.4.15. Identificación del inicio de la transcripción (RACE) _____	131
4.5. Análisis bioinformáticos _____	133
5. RESULTADOS _____	137
5.1. Chapter I. An integrated biochemical system for nitrate assimilation and nitric oxide detoxification in <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> _____	139
5.1.1. Abstract _____	139
5.1.2. Introduction _____	139
5.1.3. Experimental approaches _____	143
5.1.3.1. Bacterial strains, plasmids and growth conditions _____	143
5.1.3.2. Construction of <i>B. diazoefficiens narK-lacZ</i> and <i>nirA-lacZ</i> transcriptional fusions _	144
5.1.3.3. Growth conditions for β -galactosidase activity assay of <i>narK-lacZ</i> , <i>nirA-lacZ</i> and <i>norC-</i> <i>lacZ</i> fusions _____	144
5.1.3.4. Construction and complementation of <i>B. diazoefficiens</i> mutants _____	145
5.1.3.5. Analysis of gene expression by RT-PCR _____	148
5.1.3.6. β -Galactosidase assays _____	148
5.1.3.7. Transcription Start Site identification of <i>narK</i> operon and <i>nirA</i> gene _____	149
5.1.3.8. Promoter bio-informatics analysis of <i>narK</i> operon and <i>nirA</i> gene _____	149
5.1.3.9. Determination of NO_3^- reductase and NO_2^- reductase activity _____	150
5.1.3.10. Heme-staining analysis _____	150
5.1.3.11. Intracellular NO_2^- determination _____	151
5.1.3.12. NO consumption activity _____	151
5.1.3.13. N_2O measurements _____	151
5.1.4. Results _____	152
5.1.4.1. Genetic basis for NO_3^- and NO_2^- assimilation in endosymbiotic denitrifying rhizobia _ _____	152
5.1.4.2. A biochemical pathway for assimilation of NO_3^- and NO_2^- _____	163

5.1.4.3. Regulation of the <i>narK-bjgb-flp-nasC</i> operon and <i>nirA</i> by NasS-NasT	164
5.1.4.4. Sequence analysis of <i>narK</i> operon and <i>nirA</i> gene promoters	165
5.1.4.5. Involvement of Bjgb and Flp in nitrosative stress defence	167
5.1.4.6. Nitric oxide formed during nitrate assimilation induces <i>nor</i> gene expression	170
5.1.5. Discussion	173
5.1.5.1. Defining the key components and transcriptional architecture of NO ₃ ⁻ and NO ₂ ⁻ assimilation in <i>B. diazoefficiens</i>	173
5.1.5.2. A modular detoxification system for NO generated during NO ₃ ⁻ assimilation	176
5.1.5.3. Sources of NO: NasC and NapA activity is responsible for elevated NorCB expression	177
5.2. Chapter II. Dissecting the role of NtrC and RpoN in the expression of assimilatory nitrate and nitrite reductases in <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	181
5.2.1. Abstract	181
5.2.2. Introduction	181
5.2.3. Experimental approaches	184
5.2.3.1. Bacterial strains, plasmids and primers	184
5.2.3.2. Construction of a <i>B. diazoefficiens ntrC</i> mutant	185
5.2.3.3. Determination of nitrate and nitrite reductase activities	185
5.2.3.4. β-galactosidase activity of <i>narK-lacZ</i> and <i>nirA-lacZ</i> fusions	186
5.2.3.5. Analytical methods	186
5.2.4. Results	187
5.2.4.1. Involvement of NtrC and RpoN in nitrate and nitrite dependent growth	187
5.2.4.2. Nitrate and nitrite reductase activities are controlled by NtrC and RpoN	190
5.2.4.3. Role of NtrC and RpoN on the transcription of <i>nasC</i> and <i>nirA</i>	191
5.2.5. Discussion	193
6. DISCUSIÓN GENERAL	199
6.1. Genes implicados en la asimilación de NO₃⁻ y NO₂⁻ en <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	199
6.2. Identificación de un sistema integrado de asimilación de nitrato y detoxificación de NO.	202
6.3. Papel de la nitrato reductasa asimilativa NasC en la producción de NO.	203
6.4. Implicación de NtrBC y RpoN en la regulación de la asimilación de nitrato y nitrito en <i>B. diazoefficiens</i>	205

7. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS	211
8. BIBLIOGRAFÍA	215
9. Anexos	243
9.1. Abreviaturas y símbolos	245
9.2. Especies	247
9.3. Índice de figuras	248
9.4. Índice de tablas	249

1

RESUMEN / SUMMARY

1. RESUMEN

El nitrógeno (N) es uno de los componentes esenciales para la vida, con una gran demanda para los seres vivos. Frecuentemente es el factor limitante para el crecimiento de muchos organismos, ya que, aunque constituye el 78% de la composición del aire (N_2), solamente una pequeña proporción de los organismos, los diazótrofos, son capaces de fijarlo. Sin embargo, la mayoría de los organismos utilizan compuestos nitrogenados disponibles en el medio ambiente, presentes como una amplia variedad de moléculas que contienen nitrógeno en diferentes estados de oxidación, y que conforman el ciclo del nitrógeno siendo la más abundante el nitrato (NO_3^-).

La asimilación de NO_3^- es un proceso ubicuo realizado por procariotas, hongos, algas y plantas superiores, clave para movilizar este compuesto, cuya acumulación provoca problemas medio ambientales y de salud pública. Bioquímicamente, la reducción asimilativa del NO_3^- siempre tiene lugar por una enzima nitrato reductasa con un centro activo de molibdeno, donde el NO_3^- es reducido a nitrito (NO_2^-). A continuación, el NO_2^- es reducido hasta amonio (NH_4^+) por una enzima nitrito reductasa con un grupo sirohemo en su centro activo. Finalmente, el NH_4^+ es incorporado en esqueletos carbonados para su utilización en el metabolismo celular.

El NO_3^- , además puede ser utilizado por microorganismos como aceptor final de electrones en cadenas respiratorias, siendo la más importante la desnitrificación, proceso en el cual el NO_3^- es reducido hasta N_2 con los intermediarios NO_2^- , óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N_2O), los dos primeros, NO_2^- y fundamentalmente el NO, tóxicos para las células.

Bradyrhizobium diazoefficiens es una α -proteobacteria, diazótrofo del orden Rhizobiales, capaz de crecer con NO_3^- como única fuente de nitrógeno, tanto para asimilarlo, como aceptor final de electrones, para respirarlo, mediante la desnitrificación. *B. diazoefficiens* es conocido principalmente, por asociarse simbióticamente con plantas de soja (*Glycine max*). La asociación simbiótica entre la planta y *B. diazoefficiens*, se establece en unas estructuras especializadas de la raíz de

la planta, llamadas nódulo, donde tiene lugar la fijación biológica del N_2 , y en el caso particular de *B. diazoefficiens*, también la desnitrificación.

Estudios previos realizados por el Grupo del Metabolismo del Nitrógeno del Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC-Granada) habían demostrado que la hipoxia y el NO_3^- inducen la formación de NO en los nódulos de soja. Debido al efecto inhibitor del NO sobre la actividad nitrogenasa, era de esperar la presencia de mecanismos que lo eliminaran dentro del nódulo. Estudios realizados por Meakin y colaboradores (2006) sugerían la existencia en los nódulos de sistemas para la destoxificación de NO adicionales a la propia enzima NO reductasa de la ruta de la desnitrificación.

En el genoma de *B. diazoefficiens*, localizamos la presencia de una hemoglobina, Bjgb, codificada por el gen blr2807 (*bjgb*), que posee alta homología con las hemoglobinas de dominio único Vgb y Cgb de *Vitreoscilla stercoraria* y *Campylobacter jejuni*, cuyo papel en destoxificación de NO estaba ya demostrado. Junto al gen *bjgb* responsable de la síntesis de Bjgb, se encuentran otros genes responsables de la síntesis de proteínas potencialmente implicadas en la asimilación de nitrato, tales como blr2803-05 (*nrtABC*) que codifican un transportador de nitrato tipo ABC; blr2806 (*nark*), responsable de una proteína implicada en el transporte de NO_3^-/NO_2^- ; blr2808 (*flp*), que codifica una flavoproteína; y blr2809 (*nasC*) implicada en la síntesis de la nitrato reductasa asimilativa. Por otra parte, distalmente, se encuentran genes también implicados en asimilación de NO_3^- , bll4571 (*nirA*), que codifica la nitrito reductasa asimilativa; y bll4572-73 (*nasST*), responsables de la síntesis de un regulador de respuesta a NO_3^-/NO_2^- .

Mediante diferentes aproximaciones experimentales, en esta Tesis Doctoral hemos podido demostrar la implicación de los genes blr2806-blr2809 y bll4572-73 en la asimilación de NO_3^- y NO_2^- de *B. diazoefficiens*. Así como, la función de Bjgb, como mecanismo para la eliminación del NO generado por NasC durante la asimilación de NO_3^- , lo que hace a este grupo de genes un sistema coordinado para la asimilación de NO_3^- y NO_2^- y destoxificación de NO, descrito por primera vez en bacterias. Adicionalmente, hemos caracterizado los elementos más importantes de la regulación

de estos genes, e identificado los reguladores que intervienen en la expresión de los mismos.

En esta Tesis Doctoral, se ha llevado a cabo la construcción de cepas de *B. diazoefficiens* mutantes en fase por delección, en cada uno de los genes *blr2803-blr2809* y *bll4572-73*. El análisis fenotípico de las mutantes, ha permitido demostrar que NasC y NirA son las subunidades catalíticas para la reducción asimilativa de NO_3^- y NO_2^- , respectivamente. Ambas cepas mutantes para *nasC* y *nirA*, son incapaces de crecer con NO_3^- como única fuente de nitrógeno. En el caso de la mutante *nirA*, tampoco fue capaz de crecer con NO_2^- y lo acumuló en presencia de NO_3^- en el medio, lo que indica que la asimilación de NO_3^- queda bloqueada a nivel de la reducción de NO_2^- . Esta hipótesis, fue confirmada al cuantificar la actividad NO_3^- y NO_2^- reductasa de ambas mutantes, mientras que la mutante *nasC* carece de actividad NO_3^- reductasa, pero mantiene la NO_2^- reductasa, ocurre lo contrario en la cepa mutante *nirA*. Además de NasC y NirA, en esta Tesis se ha demostrado la implicación de la flavoproteína (Flp) en la asimilación de NO_3^- , puesto que una cepa mutante *flp* fue incapaz de crecer únicamente con esta fuente de nitrógeno, sin embargo, no interviene en el mecanismo catalítico, sino en la transferencia electrónica a NasC, debido a que esta cepa no pierde la actividad NO_3^- reductasa cuando se usa un donador artificial de electrones.

La implicación de la hemoglobina de dominio único Bjgb en destoxificación de NO, se ha demostrado al verificar que la cepa mutante en este gen presenta un déficit de crecimiento en anaerobiosis con NO_3^- . Además, en presencia de un agente donador de NO, la cepa mutante *bjgb* mostró un retraso en su crecimiento, al igual que una mutante en *flp*, lo que indica que posiblemente los electrones que necesita Bjgb para eliminar el NO se los proporciona Flp. Adicionalmente, en una mutante *bjgb*, la expresión del promotor del gen *norC*, dependiente de NO, se induce, indicando un aumento de la concentración de NO en esta cepa, lo cual se ha verificado al observar un aumento en la capacidad de consumir NO y de producir N_2O en la cepa mutante *bjgb*. NarK, posiblemente actúa como un nivel adicional de control para la eliminación de NO_2^- intracelular, que puede conducir a la producción de NO, sin embargo, bajo nuestras condiciones experimentales, la eliminación de NO_2^- del interior de la célula

que realiza NarK, provoca una limitación en el crecimiento con NO_3^- o NO_2^- como únicas fuentes de nitrógeno.

A nivel genético, hemos verificado que los genes *narK-bjgb-flp-nasC* se transcriben como una unidad policistronica bajo el control de un promotor situado en *narK*, con un inicio de la transcripción identificado por 5'-RACE, y que *nirA* está controlado por un promotor situado en el espacio intergénico previo a éste. En la región promotora de *narK* se ha identificado una secuencia consenso o caja FNR, además de cajas NtrC o la formación de horquillas con las secuencias ANTAR en el inicio de sus ARN mensajeros que se han localizado tanto en la región promotora de *narK* como de *nirA*. La funcionalidad de estos elementos reguladores se ha confirmado mediante el empleo de cepas de *B. diazoefficiens* mutantes en el gen *ntrC*, que es responsable de la síntesis del regulador transcripcional NtrC implicado en la regulación general por compuestos nitrogenados. Una cepa mutante en el gen *ntrC* es incapaz de crecer con NO_3^- como única fuente de nitrógeno, y presenta un considerable defecto en el crecimiento con NO_2^- , careciendo esta cepa de las actividades NO_3^- y NO_2^- reductasas, así como mostrando bajos niveles de expresión de las fusiones transcripcionales *narK-lacZ* y *nirA-lacZ*. De forma similar, la cepa mutante del regulador de respuesta a $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ NasT, es incapaz de crecer con NO_3^- y NO_2^- , y mostró valores reducidos de actividades nitrato y nitrito reductasa, así como de expresión *narK-lacZ* y *nirA-lacZ* comparados con los niveles observados en la cepa parental. Estos resultados confirman la implicación de las horquillas presentes en el ARN mensajero de las regiones promotoras de los genes *narK* y *nirA* en la terminación prematura de la transcripción en ausencia de la proteína NasT. Por último, se ha verificado la dependencia de los promotores *narK* y *nirA* del factor sigma σ^{54} de la ARN polimerasa para su transcripción, ya que una mutante en los genes responsables (*rpoN_{1/2}*) también mostró un déficit en crecimiento, actividades NO_3^- y NO_2^- reductasas y expresión génica.

En conjunto, estos resultados conforman una detallada caracterización, a nivel fisiológico, bioquímico y de regulación génica, de un sistema coordinado de asimilación de NO_3^- y NO_2^- y detoxificación de NO en *B. diazoefficiens*, ambos procesos escasamente estudiados en rizobios, siendo la primera vez que este sistema se ha descrito en bacterias.

1. SUMMARY

Nitrogen (N) is one of the essential compounds, with a great demand by living organisms. Frequently, N is a limiting factor because, even it constitutes 78% of the air composition (N_2), only few organisms, the diazotrophs, are able to fix it. Mainly, N-assimilation by organisms is provided from different nitrogenous molecules present in the environment, that form part of the nitrogen cycle, being the most abundant molecule, nitrate (NO_3^-).

NO_3^- assimilation is a ubiquitous process carried out by prokaryotic, fungi, algae and higher plants. This process is a key to mobilizing this compound, whose accumulation causes environmental and public health problems. Biochemically, the assimilative reduction of NO_3^- always occurs by a nitrate reductase enzyme with an active molybdenum centre, where NO_3^- is reduced to NO_2^- . Next, NO_2^- is reduced to ammonium (NH_4^+) by a nitrite reductase enzyme with a sirohaem group at its active site. Finally, NH_4^+ is incorporated into carbon skeletons to be used in cell metabolism.

Microorganisms can also use NO_3^- as final acceptor of electrons in respiratory chains. Denitrification is the most important, in which NO_3^- is reduced to N_2 through the formation of NO_2^- , nitric oxide (NO) and nitrous oxide (N_2O) as intermediates, being NO_2^- and mainly NO toxic for the cells.

This Doctoral Thesis is focus in the rizobia species *Bradyrhizobium diazoefficiens*, an α -proteobacteria from the Rhizobiales order, able to grow with NO_3^- as sole N-source, both to assimilate it, and to use as the final electron acceptor, through denitrification. *B. diazoefficiens* is known mainly for its capacity to associate symbiotically with soybean plants (*Glycine max*). The symbiotic association between the plant and *B. diazoefficiens* is established in specialized structures of the plant root, called nodules, where the biological N-fixation as well as denitrification occurs.

Previous studies carried out by the Nitrogen Metabolism Group of the Department of Soil Microbiology and Symbiotic Systems from Estación Experimental del Zaidín (CSIC-Granada) showed that hypoxia and NO_3^- induce NO formation inside the nodules. Due to the inhibitory effect of NO on nitrogenase activity, it is expected the presence of mechanisms to eliminate NO within the nodule. Studies by Meakin *et al.* (2006)

suggested the presence in nodules, of others NO detoxification systems in addition to the denitrification enzyme NO reductase.

In the *B. diazoefficiens* genome, we could find the presence of an haemoglobin, Bjgb; encoded by blr2807 (*bjgb*), which showed high homology with the single domain haemoglobins Vgb and Cgb of *Vitreoscilla stercoraria* and *Campylobacter jejuni*, whose role in NO detoxification were already demonstrated. In the same cluster where *bjgb* is located, there are other genes putative roles in NO₃⁻ assimilation; blr2803-05 (*nrtABC*), that encodes an ABC type nitrate transporter; blr2806 (*nark*), responsible for a NO₃⁻/NO₂⁻ transporter; blr2808 (*flp*), encoding a flavoprotein; and blr2809 (*nasC*), implicated in the synthesis of the assimilatory NO₃⁻ reductase. On the other hand, at other location in the chromosome, we have identified genes also involved in NO₃⁻/NO₂⁻ assimilation; bll4571 (*nirA*), encoding the assimilatory NO₂⁻ reductase; and bll4572-73 (*nasST*), responsible for a NO₃⁻/NO₂⁻ responsive regulator.

By using different experimental approaches, in this Doctoral Thesis we have been able to demonstrate the implication of blr2806-09 and bll4571-73 genes in NO₃⁻ and NO₂⁻ assimilation in *B. diazoefficiens*. As well as the function of the Bjgb, as a protein involved in detoxification of NO, molecule that is generated by NasC during NO₃⁻ assimilation. These findings propose the identification of a new coordinated system for NO₃⁻ and NO₂⁻ assimilation and NO detoxification described by first time in bacteria. In addition, we have also investigated the regulation of this system as well as identified the regulators involved in its expression.

In this Thesis, we have constructed *B. diazoefficiens* in-frame deletion mutant strains in blr2806-09 and bll4571-73 genes and we have performed the phenotypic characterization of the mutants. In fact, we have demonstrated that NasC and NirA proteins are the catalytic subunits for NO₃⁻ and NO₂⁻ assimilatory reductases, respectively. Both *nasC* and *nirA* mutant strains, were unable to grow with NO₃⁻ as the sole N-source. In the case of the *nirA* mutant, it was not able to grow with NO₂⁻ and accumulated it in the presence of NO₃⁻ in the medium, which indicates that the NO₃⁻ assimilation is blocked at NO₂⁻ reduction level. This hypothesis was confirmed by quantification of NO₃⁻ and NO₂⁻ reductase activity in both mutants, while the *nasC*

mutant lacks NO_3^- reductase activity, but NO_2^- reductase remains. The opposite occurs in the *nirA* mutant strain. We have also shown that the flavoprotein (Flp) is also involved in NO_3^- assimilation, given the incapacity of the *flp* mutant to grow with NO_3^- as the only N-source. We propose that Flp is implicated in the electron transfer to NasC, but not to NirA.

In this Thesis, we have also demonstrated the implication of Bjgb in NO detoxification given the growth decrease it observed in anaerobiosis with NO_3^- compare to the parental strain. Moreover, in the presence of a NO-donor, bjgb strain showed a delay in growth, like a *flp* mutant, indicating that possibly the electrons needed by Bjgb to remove NO are provided by Flp. In addition, the NO-dependent *nor* genes expression is induced in a *bjgb* mutant, probably due to an increase in NO concentration in this strain. The induction of *nor* in the *bjgb* mutant was also verified by measuring NO consumption activity and N_2O production in this strain, parameters that were higher than those from the wild-type cells. NarK, possibly acts as an additional level of control to remove intracellular NO_2^- , which might lead to NO production. However, under our experimental conditions, elimination of NO_2^- from inside the cell by NarK causes a limitation on growth with NO_3^- or NO_2^- as sole N-sources.

In this work, we have identified that the *narK-bjgb-flp-nasC* gene cluster is transcribed as a polycistronic unit under the control of a promoter upstream of *narK*, with a transcription start site identified by 5'-RACE, and that *nirA* gene is controlled by a promoter located in the intergenic space before it. The *narK* promoter region presents some regulatory elements such as FNR box, and also NtrC boxes or the formation of hairpins with the ANTAR sequences at the start of mRNA that were found in *narK* as well as *nirA* promoter regions. The functionality of the regulatory elements found has been confirmed by using mutant strains for the candidate transcriptional regulators involved. In fact, a mutant strain defective in NtrC, the transcriptional regulator involved in the general regulation of N-compounds, was unable to grow with NO_3^- as sole N-source, and also showed a growth defect with NO_2^- , as well as decreased rates of NO_3^- and NO_2^- reductases activities and expression of a *narK-lacZ* and *nirA-lacZ* transcriptional fusions. Similarly, the $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ response regulator *nasT* mutant strain was unable to grow with NO_3^- and NO_2^- , confirming the implication of the hairpins

present in the mRNA of these genes in the premature transcriptional termination in the absence of NasT. Finally, the dependence of the *narK* and *nirA* promoters on the sigma factor σ^{54} of the RNA polymerase has been verified, since a mutant defective in the *rpoN_{1/2}* genes encoding this factor σ^{54} , also exhibited a defect in growth, as well as in NO_3^- and NO_2^- reductases activities and gene expression.

By concluding, in this Thesis, we have performed a detailed characterization, at the physiological, biochemical and regulatory levels, of a new coordinated system for NO_3^- assimilation and NO detoxification in *B. diazoefficiens*. As far as we know, this is the first time where a coordinated system like this has been described in bacteria.

2

INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN GENERAL

2.1. Ciclo del nitrógeno

El nitrógeno es un elemento clave para todos los organismos biológicos, considerado bioelemento primario por constituir el 6% en masa de la materia viva, y quedando en proporción con el resto bioelementos primarios dentro de la fórmula universal de los organismos vivos como $\text{CH}_2\text{O}_{0,5}\text{N}_{0,15}$. El nitrógeno es componente esencial de proteínas, ácidos nucleicos y numerosos cofactores, frecuentemente es factor limitante para el crecimiento y la producción de biomasa, incluso en ambientes con climatologías favorables y agua suficiente para sustentar la vida (Martinez-Espinosa *et al.*, 2011).

Todo el nitrógeno que entra a formar parte de la biosfera proviene de la atmósfera a través fundamentalmente de la fijación biológica del nitrógeno y retorna finalmente a la atmósfera vía desnitrificación u oxidación anaeróbica del amonio (anammox; Figura 2.1). Sin embargo, la mayoría de organismos no realizan ninguno de estos procesos, utilizan compuestos nitrogenados disponibles en el medio ambiente, presentes como una amplia variedad de moléculas que contienen nitrógeno en todos sus estados de oxidación, desde +5, nitrato, a -3, amonio (Richardson & Watmough, 1999).

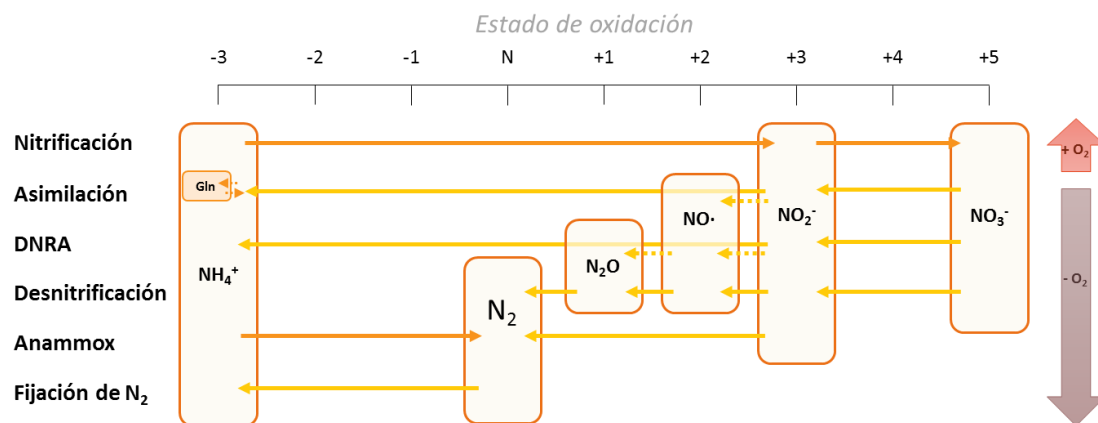


Figura 2.1. **Principales rutas metabólicas del ciclo del nitrógeno.** Principales compuestos nitrogenados accesibles para la biosfera, ordenados por el estado de oxidación del nitrógeno y su interconversión por los principales procesos del ciclo del nitrógeno. Figura adaptada de (Canfield *et al.*, 2010).

El reservorio de nitrógeno de la tierra, aproximadamente el 50% del total, se encuentra en la atmósfera como nitrógeno molecular (N_2) en estado gaseoso, siendo

el 78,03% (v/v) de la composición del aire. El N_2 posee uno de los enlaces químicos más estables que se conocen, enlace covalente triple, haciéndola una molécula muy poco reactiva, prácticamente inerte en condiciones naturales. Su energía de disociación es extremadamente alta, $945,41 \text{ KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, sería necesario elevar la temperatura varios miles de grados para sobrepasar su elevada energía de reacción (Earnshaw & Greenwood, 1997), por lo que es inevitable el empleo de eficientes catalizadores, enzimas en sistemas biológicos, para transformar el N_2 en un compuesto asimilable en condiciones no tan extremas y compatibles con la vida. El aporte principal de nitrógeno a la biosfera desde la atmósfera ocurre a través de la fijación biológica del N_2 , en torno al 60% del total. Únicamente se han descrito microorganismos, tanto eubacterias como arqueas, con esta capacidad, llamados diazótrofos, no conociéndose ningún eucariota con esta habilidad. La enzima utilizada casi universalmente para realizar la fijación de N_2 a amonio (NH_4^+) es la nitrogenasa, capaz de funcionar en las condiciones de temperatura y presión fisiológicas, aunque con la necesidad de ausencia de O_2 (Newton, 2007, Peters *et al.*, 2011).

El amonio que entra al ciclo por la fijación biológica del N_2 es asimilado por la propia célula que lo ha fijado, sin embargo, el amonio puede tomar otros caminos dentro del ciclo, como la oxidación aeróbica (nitrificación) o la oxidación anaeróbica (anammox; Figura 2.1). La asimilación del amonio consiste en la integración del nitrógeno en esqueletos carbonados vía glutamina sintetasa-glutamato sintasa (GS-GOGAT) o en menor medida por la glutamato deshidrogenasa (GDH) y la alanina deshidrogenasa (revisado por Moreno-Vivián *et al.*, 2011; ver apartado 2.2.5). Por otro lado, el amonio puede ser oxidado aeróbicamente a nitrato (NO_3^-) en un proceso de dos etapas llamado nitrificación. En la primera el amonio es oxidado hasta nitrito (NO_2^-) por la enzima amonio monooxigenasa y en la segunda etapa el nitrito es oxidado a nitrato por la nitrito oxido-reductasa (Figura 2.1; Ferguson *et al.*, 2007). En cuanto a la asimilación de compuestos nitrogenados, el amonio procedente de la fijación de nitrógeno no es la única fuente que se utiliza para formar compuestos orgánicos de nitrógeno, de hecho la mayor parte del nitrógeno asimilado por los organismos procede del nitrato, cuya ruta de asimilación conlleva su reducción a nitrito y luego a

amonio para ser asimilado de la misma manera (Moreno-Vivián & Flores, 2007, Tischner & Kaiser, 2007; ver apartado 2.2).

En dirección opuesta a la asimilación se encuentra la amonificación por la que compuestos orgánicos en descomposición o los productos de excreción de los animales son de nuevo, transformados en amonio por numerosas bacterias y hongos degradadores de materia orgánica. El amonio también es empleado para obtener energía por bacterias a través de la oxidación anaeróbica del amonio (anammox) con nitrito como agente oxidante del amonio y produciendo nitrógeno molecular (Figura 2.1; Jetten *et al.*, 2009).

Por otro lado, los compuestos oxidados del nitrógeno pueden ser usados como aceptores finales de electrones en cadenas respiratorias en lugar del oxígeno cuando éste es limitante. La ruta más importante es la desnitrificación en la que el nitrato es reducido a nitrito, luego a óxido nítrico, óxido nitroso y por último a nitrógeno molecular que retorna a la atmósfera y que junto al aporte de N₂ del anammox cierran el ciclo del nitrógeno en la biosfera (Van Spanning *et al.*, 2007; ver apartado 2.3.1.1.1). A medio camino entre la desnitrificación y la asimilación del nitrato está la desasimilación del nitrato a amonio (DNRA, de sus siglas en inglés, dissimilatory nitrate reduction to ammonium) que, aunque comparte sustrato y producto con la asimilación los fines de esta ruta son respiratorios, la realizan bacterias que se encuentran en hábitats reductores como sedimentos marinos anaeróbicos o el interior de animales de sangre caliente, es el caso de *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis* (Mohan & Cole, 2007), siendo una importante fuente de N₂O bajo ciertas condiciones (Figura 2.1; Behrendt *et al.*, 2015).

Estos son los procesos más representativos del ciclo del nitrógeno, pero ni mucho menos los únicos, la investigación con organismos de importancia en el ciclo del nitrógeno es amplia y muy activa encontrándose frecuentemente nuevas rutas, lo que demuestra la gran diversidad biológica y metabólica existente dentro de este ciclo (Jetten *et al.*, 2009). La actividad de todos estos organismos conforma el ciclo del nitrógeno global y establece un delicado equilibrio entre formas oxidadas y reducidas de nitrógeno determinante para la conservación de la diversidad de la biosfera.

De especial relevancia para mantener el equilibrio del ciclo son los procesos de fijación biológica del nitrógeno, única vía biológica de entrada de nitrógeno en la biosfera desde la atmósfera y en sentido opuesto las rutas de desnitrificación y anammox como únicas vías de retorno de N_2 a la atmósfera. Adicionalmente, la entrada de nitrógeno en la biosfera desde la atmósfera puede ocurrir por otras vías no biológicas como son los rayos, volcanes y otros afloramientos, que son naturales y contribuyen al mantenimiento del equilibrio del ciclo. Sin embargo, actualmente existe un importante aporte de nitrógeno al ciclo desde la atmósfera de forma antropogénica, fundamentalmente en forma de nitrato, por el empleo de fertilizantes, combustibles y la fijación biológica de N_2 en suelos agrícolas, que casi doblan la capacidad de fijación de N_2 terrestre (Canfield *et al.*, 2010), y que desbalancean el equilibrio en 90 a 130 millones de toneladas de nitrógeno al año a favor de la acumulación de nitrato que no se puede eliminar por desnitrificación ni anammox y que hacen que cada vez la concentración de nitrato en suelos, aguas o sedimentos sea mayor, derivando a serios problemas medioambientales (Galloway *et al.*, 2008).

2.1.1. Impacto antropogénico en el ciclo del Nitrógeno

Durante los últimos cien años la actividad humana, especialmente por la reducción química de nitrógeno a gran escala para producir fertilizantes sintéticos mediante el proceso de Haber-Bosch y por otro lado por el consumo de combustibles fósiles, han provocado un efecto negativo cada vez más significativo sobre el ciclo global del nitrógeno (Galloway *et al.*, 2008). Las alteraciones del ciclo del nitrógeno influyen negativamente en el cambio climático, salud humana y en el funcionamiento de los ecosistemas reduciendo la biodiversidad, especialmente en sistemas acuáticos y en suelos donde la concentración de nitrógeno se está incrementando, causando eutrofización de lagos y ríos, originando zonas “muertas” anóxicas debido a la exagerada proliferación de algas (Howarth, 2004).

Los compuestos nitrogenados resultantes de la actividad humana con mayores impactos medioambientales son los siguientes. Incremento en las emisiones de NO y N_2O desde suelos fertilizados debido a la desnitrificación. El N_2O junto a dióxido de carbono (CO_2) y metano (CH_4) son los tres gases de efecto invernadero más importantes. La molécula de N_2O tiene una capacidad 300 veces mayor de

calentamiento global que el CO₂ y su concentración en la atmósfera se incrementa a ritmo de 0,25% cada año. Por esta razón, es fundamental llevar a cabo estrategias para mitigar el cambio climático en las que se incluyan la reducción de emisiones de N₂O a la atmósfera (Richardson *et al.*, 2009). Adicionalmente, tanto el N₂O como el NO tienen efectos deletéreos sobre la estratosfera, donde actúan como catalizadores en la destrucción del ozono atmosférico (Ravishankara *et al.*, 2009). Además, el NO puede ser químicamente oxidado hasta dióxido de nitrógeno (NO₂), que a su vez se puede hidratar formando los ácidos nitroso y nítrico (HNO₂ y HNO₃), que caen a la tierra como constituyentes de la lluvia ácida (Zumft, 1997). Por otro lado, el exceso de NO₃⁻ y NO₂⁻ por la aplicación de fertilizantes provoca su lixiviación desde suelos a aguas subterráneas. El NH₃ en la atmósfera también, se ha triplicado como resultado de la actividad humana, actúa como un aerosol, disminuye la calidad del agua y cae en el agua de lluvia (Harper *et al.*, 2010).

Por consiguiente, investigaciones en varias disciplinas, incluyendo microbiología, bioquímica, edafología, ecología y química atmosférica, focalizando diferentes aspectos del ciclo del nitrógeno y trabajando en conjunto, es necesario para poder hacer frente a los grandes retos a los que se enfrenta la humanidad, incluyendo el cambio climático (Richardson *et al.*, 2009), seguridad alimenticia (Socolow, 1999), tratamiento de aguas residuales (Howarth, 2004) y salud humana (Greer & Shannon, 2005, van Grinsven *et al.*, 2010).

2.2. Asimilación de NO₃⁻ y NO₂⁻ en bacterias

El nitrógeno inorgánico, aunque muy abundante en la naturaleza, para ser biológicamente útil tiene que ser procesado hasta nitrógeno orgánico. Cuantitativamente, este procesamiento es fundamentalmente realizado por sólo dos procesos, la fijación biológica del nitrógeno y la asimilación de nitrato, ambos procesos proveen al organismo de amonio para ser incorporado a esqueletos carbonados, y así metabolizable en multitud de rutas enzimáticas.

La asimilación de nitrato es un proceso ubicuo y fundamental realizado por bacterias, hongos, algas y plantas superiores que moviliza cada año en la biosfera más de diez mil millones de toneladas de nitrógeno, siendo así un proceso clave en el ciclo de

nitrógeno y de gran importancia medioambiental y de salud pública al reducir los niveles de nitrato aportados en exceso en la agricultura (Guerrero *et al.*, 1981). En particular, en aporte excesivo de nitrato en suelos agrícolas ha conducido a la contaminación de aguas superficiales y su acumulación en subterráneas. A nivel de salud pública, el consumo de esas aguas con altas concentraciones de nitrato se ha asociado al desarrollo de metahemoglobinemia, causa del síndrome blue baby (Greer & Shannon, 2005), afecciones respiratorias y cáncer gástrico asociado a la formación endógena de compuestos tóxicos *N*-nitrosados por bacterias en el tracto gastrointestinal (van Grinsven *et al.*, 2010). A nivel medioambiental, la consecuencia más directa es la eutrofización de ecosistemas acuáticos, cuyo resultado es un aumento de la producción primaria (fotosíntesis) con importantes consecuencias sobre la composición, estructura y dinámica del ecosistema. Por otra parte, el NO_3^- acumulado en los suelos o aguas superficiales puede retornar a la atmósfera en forma de NO y óxido nitroso (N_2O), ver apartado 2.1.1.

Además de la asimilación, el nitrato puede ser reducido como aceptor final de electrones en la respiración de nitrato para generar energía metabólica o bien, en la desasimilación de nitrato para disipar el exceso de poder reductor y mantener el equilibrio redox celular. Estos dos procesos ocurren muy predominantemente en procariontes, así en eucariotes la reducción de nitrato prácticamente se limita a su asimilación por la enzima nitrato reductasa asimilativa eucariota. En procariontes, se encuentran tres tipos de enzimas nitrato reductasas, además de la nitrato reductasa asimilativa citoplasmática (Nas), las nitrato reductasas respiratorias y desasimilativas de membrana (Nar) y periplásmica (Nap), descritas en detalle en el apartado 2.3.1.2.2. Bioquímicamente, las nitrato reductasas se asemejan en sus centros activos ya que todas alojan un cofactor de molibdeno, aunque para eucariotes se encuentra como grupo molibdopterin y en bacterias como Mo-*bis*-molibdopterin guanina dinucleótido (Mo-*bis*-MGD) (Zumft, 1997, Leimkuhler & Ibbi-Nivol, 2016). En cuanto a la genética y fisiología no existe gran homología entre los diferentes tipos de nitrato reductasas (revisado por Moreno-Vivián *et al.*, 1999, Richardson *et al.*, 2001).

Metabólicamente, el nitrito generado por estas diferentes enzimas bacterianas no tiene por qué seguir un destino metabólico estricto, algunas nitrato reductasas pueden

tener diferentes funciones bajo condiciones fisiológicas distintas. Por ejemplo, el nitrito generado por la respiración anaeróbica puede ser utilizado en asimilación en *Paracoccus denitrificans* (Gates *et al.*, 2011) o *E. coli* (Stewart, 1994) o viceversa, el nitrito reducido en el citoplasma puede no ser empleado para asimilación, únicamente reducido con fines destoxificantes, como ocurre en *E. coli* por la enzima NirB durante la desasimilación (Stewart, 1994) o excretado al periplasma para acoplar su reducción a una cadena electrónica de conservación de la energía. En la misma línea, las nitrato reductasas periplásmicas son usadas tanto para disipar el exceso de poder reductor como para generar el nitrito necesario para continuar con el proceso de la desnitrificación (Bell *et al.*, 1993, Bedzyk *et al.*, 1999).

El proceso de asimilación de nitrato continua con la reducción hasta amonio del nitrito generado fundamentalmente por la nitrato reductasa asimilativa, y finaliza con la incorporación del amonio a esqueletos carbonados. Para estos procesos, los procariontes se sirven de enzimas nitrito reductasas, que pueden ser dependientes de NADH o de ferredoxinas, fundamentalmente en heterótrofos y cianobacterias respectivamente. Bioquímicamente, todas las nitrito reductasas se sirven de un grupo sirohemo y otro [4Fe-4S] para llevar a cabo la reducción en su centro activo (Brittain *et al.*, 1992). Por último, el amonio se incorpora a esqueletos carbonados principalmente por las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT) (Moreno-Vivián *et al.*, 2011)

2.2.1. Bioquímica de la asimilación de nitrato y nitrito

2.2.1.1. Nitrato reductasas asimilativas (Nas)

Como ya se ha mencionado, se han descrito dos tipos de enzimas nitrato reductasa asimilativas dependiendo de su donador de electrones específico, las dependientes de ferredoxina o flavodoxina y las dependientes de NADH. Ambos tipos comparten la presencia de un cofactor Mo-bis-MGD en su centro activo, al igual que el resto de nitrato reductasas procariontes, y al menos un grupo [4Fe-4S] en posición N-terminal. A diferencia de las Nas eucariotas y otras nitrato reductasas procariontes, carecen de grupos hemo (Moreno-Vivián *et al.*, 1999, Richardson *et al.*, 2001).

Las Nas dependientes de ferredoxina se han descrito en cianobacterias, como es el caso de NarB en *Synechococcus sp.* PCC7942 (Figura 2.2), en las proteobacterias *Azotobacter sp.* (NarB) y *Ectothiorhodospira shaposhnikovii*, en la firmicute *Clostridium perfringens* (NarA) y la arquea *Haloferax mediterranei* (NasA) (Moreno-Vivián & Flores, 2007). Se componen de una única subunidad de 75-80 kDa, alcanzando los 105 kDa en el género *Azotobacter*, en su centro activo se aloja el cofactor Mo-*bis*-MGD junto a un grupo [4Fe-4S], el cual recibe los electrones de donadores de bajo potencial como ferredoxinas con [2Fe-2S] o flavodoxinas que contienen un grupo flavina (Gangeswaran *et al.*, 1993, Jepson *et al.*, 2004). Adicionalmente, en el extremo C-terminal se encuentra una cisteína conservada que podría unir un grupo [4Fe-4S] o [3Fe-4S] (Moreno-Vivián *et al.*, 1999). La afinidad de este tipo de Nas por el nitrato se sitúa en torno a una K_m de 1-10 mM, aunque puede alcanzar niveles de hasta 50-80 μ M en algunas cianobacterias (Jepson *et al.*, 2004), o adaptarse a condiciones extremas de pH, temperatura y salinidad en arqueas (Martinez-Espinosa *et al.*, 2001).

Por otro lado, las Nas dependientes de NADH se encuentran en la mayoría de proteobacterias, a diferencia de las Nas NADH-dependientes de eucariotas, las procariontes no presentan un dominio de unión a NADH por lo que dependen de una subunidad adicional NADH oxidasa (diaforasa) para transferir los electrones de la coenzima a la Nas. Estructuralmente son heterodímeros, como es el caso de NasA y NasC de *Klebsiella oxytoca* o NasC y NasB de *Ba. subtilis* (Figura 2.2), la subunidad menor diaforasa de unos 45 kDa con un grupo FAD y la subunidad mayor catalítica de unos 95 kDa con un cofactor Mo-*bis*-MGD junto a un grupo [4Fe-4S] en el extremo N-terminal, y un grupo [2Fe-2S] anclado a una cisteína conservada en C-terminal, denominado dominio tipo NifU, que actúa como un dominio donador de electrones tipo ferredoxina (Lin & Stewart, 1998). Alternativamente, el dominio NifU puede estar alojado en la subunidad pequeña flavoproteína, por ejemplo, en NasB de *Ba. subtilis* (Figura 2.2; Ogawa *et al.*, 1995). Así, el flujo electrónico ocurre desde el NADH, FAD, [2Fe-2S], [4Fe-4S], Mo-*bis*-MGD y finalmente al NO_3^- .

Un caso especial de nitrato reductasa NADH-dependiente se encuentra en *Pa. denitrificans*, donde la actividad diaforasa NADH reductasa radica en la proteína nitrito reductasa NasB. Esta proteína está asociada junto a una subunidad pequeña de 12 kDa

tipo ferredoxina [2Fe-2S] denominada NasG que puede donar electrones tanto a la propia NasB como a la NasC, sustituyendo a la flavoproteína diaforasa de las Nas de *K. oxytoca* (NasC) o *Ba. subtilis* (NasB), y quedando el flujo electrónico en esta bacteria de la manera NADH-Nir(NasB-NasG)-Nas(NasC)(Figura 2.2; Gates *et al.*, 2011). La afinidad por el nitrato de la Nas dependiente de NADH de *Rhodobacter capsulatus* (NasA) se ha cuantificado en 0,1 mM (Blasco *et al.*, 1997).

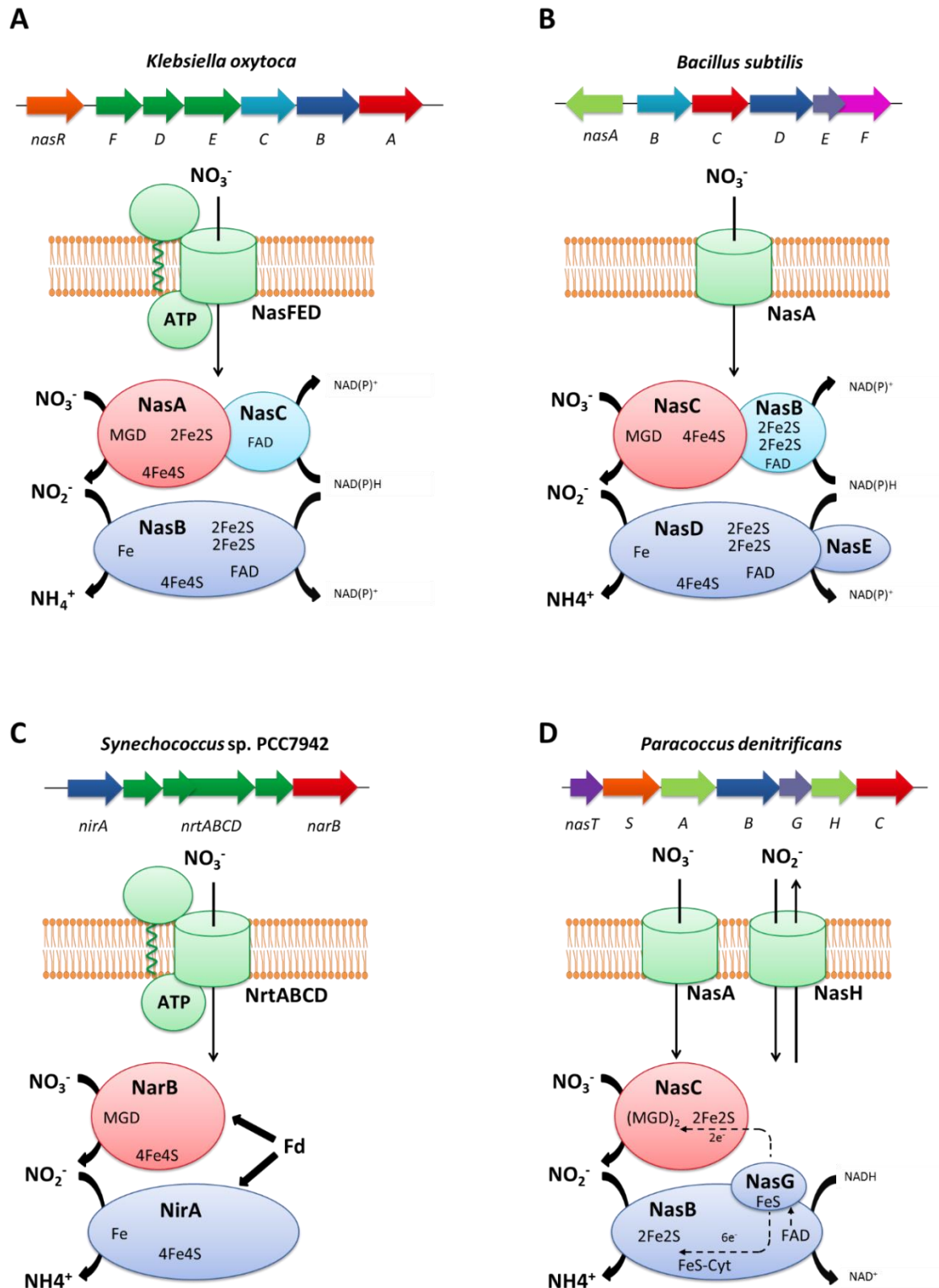


Figura 2.2. Organización genética y funcional de los sistemas para la asimilación de nitrato y nitrito en organismos modelo. Ejemplos representativos de las diferentes organizaciones genéticas y funcionales de las maquinarias enzimáticas para el transporte de nitrato y nitrito, y su reducción a nitrito y amonio, respectivamente, en los organismos *K. oxytoca*, *Ba. subtilis*, *Synechococcus* sp. PCC7942 y *Pa. denitrificans*. Figura adaptada de Richardson *et al.*, 2001, Gates *et al.*, 2011.

Todas las nitrato reductasas pueden también recibir los electrones a través de donadores artificiales como es el caso de los viológenos y un agente reductor, como por ejemplo el ditionito. Específicamente, las nitrato reductasas asimilativas, tanto eucariotas como procariotas, también pueden utilizar azul de bromofenol como reductor artificial (Blasco *et al.*, 1997, Gangeswaran *et al.*, 1993). Por otro lado, la actividad nitrato reductasa se inhibe por cianuro y azida, siendo insensibles al cianato y clorato. Curiosamente, el NADH también afecta negativamente a las enzimas Nas bajo condiciones aeróbicas, debido a la formación del anión superóxido en el centro NADH reductasa, para evitar este efecto utilizan la enzima superóxido dismutasa (Clarke *et al.* 2008, Blasco *et al.*, 1997).

2.2.1.2. Nitrito reductasas asimilativas (Nir)

La reducción de nitrito con fines asimilativos ocurre en el citoplasma, donde el nitrito es reducido con seis electrones hasta amonio. Al igual que con las nitrato reductasas, dos tipos de nitrito reductasas se han descrito en procariotas, atendiendo a su donador de electrones. Las nitrito reductasas dependientes de ferredoxina, como es el caso de NirA de la cianobacteria *Synechococcus sp.* PCC7942 o la NasD de la haloarquea *H. mediterranei*, y por otro lado las nitrito reductasas dependientes de NADH descritas en bacterias heterótrofas (Figura 2.2; revisado por Moreno-Vivián *et al.*, 2011).

Ambos tipos de nitrito reductasas contienen un grupo [4Fe-4S] y otro sirohemo, encargado de la reducción del nitrito. En el caso de las Nir NADH-dependientes, a diferencia de las ferredoxina-dependientes, presentan una extensión N-terminal donde alojan un grupo FAD y el dominio de unión a NADH, como es el caso de la NasB de *K. oxytoca*, NasD de *Ba. subtilis* o NasB de *Pa. denitrificans* (Figura 2.2).

Estructuralmente, las nitrito reductasas dependientes de ferredoxina de procariotas son muy similares a las encontradas en algas eucariotas y en plantas vasculares, con una cisteína conservada responsable del puente Fe-S que une el grupo sirohemo (Fernández *et al.*, 1998). Las Nir de cianobacterias son monómeros de aproximadamente 55 kDa, o algo más grandes, unos 66 kDa, en el caso de arqueas,

que reciben electrones desde ferredoxinas o flavodoxinas reducidas (Flores *et al.*, 2005). Las Nir de cianobacterias presentan una gran afinidad por el nitrito, valores de K_m en torno a 40 – 50 μM , en contraste con la Nir (NasD) de la arquea *H. mediterranei* cuya K_m se eleva hasta 8 mM (Martinez-Espinosa *et al.*, 2001). El flujo electrónico de los seis electrones para la reducción del nitrito sigue la siguiente ruta, desde el grupo [2Fe-2S] de la ferredoxina al [4Fe-4S] de la Nir que los canaliza finalmente al grupo sirohemo del centro activo. Durante la reducción del nitrito a amonio se generan como intermediarios NO y NH_2OH , por lo que se puede considerar este proceso fuente y sumidero de estas moléculas (ver apartado 2.3.1.1.2; Kuznetsova *et al.*, 2004).

Una de las nitrito reductasas dependiente de NADH mejor estudiadas es la presente en *E. coli* (NirBD), que si bien no es una nitrito reductasa asimilativa en el sentido estricto, ya que se induce en anaerobiosis y está implicada en el proceso de desasimilación de nitrito, también la emplea para asimilarlo (Cole, 1996, Lin & Stewart, 1998). Esta enzima se compone de dos subunidades diferentes, una grande de 93 kDa (NirB) donde se encuentra el grupo sirohemo y un grupo [4Fe-4S], y una pequeña de 12kDa (NirD) homóloga a una ferredoxina con un grupo [2Fe-2S]. Esta estructura es homóloga a la NirBD de *R. capsulatus*, la única bacteria fotótrofa en la que se ha descrito una Nir NADH-dependiente (Olmo-Mira *et al.*, 2006). Pero este tipo de estructura de las Nir NADH-dependientes no es la única, en *K. oxytoca* (NasB) es un monómero de 104 kDa donde se engloban los grupos [4Fe-4S] junto al sirohemo en el centro activo, un grupo [2Fe-2S] junto al grupo FAD en el extremo N-terminal que conforman el dominio NADH reductasa, y otro grupo [2Fe-2S] dentro de un dominio Rieske, similar a NifU, en el extremo C-terminal homólogo a la subunidad pequeña NirD de la NirBD de *E. coli*, el cual canaliza el flujo electrónico al centro activo. En *Pa. denitrificans*, como se ha descrito en el apartado 2.2.1.1, la enzima NasB posee una subunidad pequeña tipo ferredoxina [2Fe-2S], NasG, que puede donar electrones para la reducción de nitrato por la NasB como para la reducción de nitrato por la subunidad NasC (Figura 2.2; Gates *et al.*, 2011).

2.2.2. Transporte de nitrato y nitrito

La incorporación de nitrato o nitrito al interior celular prácticamente siempre se realiza por un proceso activo, debido a que la incorporación de aniones negativamente

cargados se ve dificultada por el potencial negativo del lado interno de la membrana, (Moir & Wood, 2001), únicamente el nitrito, en su forma ácida, HNO_2 , podría difundir libremente por la membrana, sin embargo debido a su bajo pK_a (3,3), la proporción de nitrito incorporado por difusión es despreciable. Se han descrito tres tipos de mecanismos en procariontes para la incorporación de nitrato y nitrito de forma activa, transporte dependiente de ATP, como transportadores tipo ABC (de sus siglas en inglés, ATP binding cassette), antiporte de nitrato/nitrito y simporte con protones, estos dos últimos mecanismos llevados a cabo por permeasas tipo MFS (de sus siglas en inglés, Major Facilitator Superfamily; Figura 2.2). El nitrito puede ser exportado por mecanismos pasivos con funciones detoxificantes.

Los transportadores tipo ABC son los transportadores de nitrato y nitrito más extendidos (Ohashi *et al.*, 2011). Están ampliamente distribuidos en bacterias y arqueas, y generalmente tienen la capacidad de importar tanto nitrato como nitrito, mostrando una alta afinidad por ambos sustratos. Se componen de tres subunidades diferentes codificadas en bloque por los genes *ntrABC*, descritos en cianobacterias (Flores *et al.*, 2005) o *nasFED*, descritos en *K. oxytoca* o *R. capsulatus* (Figura 2.2; Pino *et al.*, 2006). Las subunidades NrtA y NasF se localizan en el periplasma y sirven de unión a sustrato, las subunidades NrtB y NasE son proteínas de membrana con 5 y 6 hélices transmembrana respectivamente y conforman el canal en forma de homodímero, y por último las subunidades ATPasas, NrtC y NasD, que funcionan como homodímeros o en ocasiones como heterodímeros en el caso de NrtC con NrtD (Moreno-Vivián *et al.*, 2011). Otros transportadores tipo ABC no dedicados al transporte de nitrato o nitrito pueden transportar estos compuestos bajo ciertas condiciones, como es el caso del transportador de cianato CynABC de *Synechococcus elongatus*, que en condiciones de deficiencia de nitrógeno puede transportar nitrito al interior de la célula con una alta afinidad contribuyendo significativamente en su asimilación (Maeda & Omata, 2009).

Los transportadores tipo MFS, también se encuentran ampliamente distribuidos entre bacterias y arqueas. Tanto el proceso de simporte como de antiporte coexisten frecuentemente en un mismo organismo ya que tienen diferente funcionalidad. En *Pa. denitrificans* se encuentran ambos tipos de transportadores MFS de nitrato y nitrito

(Figura 2.2). Un antiportador NarK y un simportador de nitrato, NasA, este último codificado dentro de un operón dedicado a la asimilación de nitrato, donde también se encuentra *nasH* que podría jugar un importante papel en el mantenimiento de la homeostasis de nitrito entre el interior y exterior de la célula (Gates *et al.*, 2011). Mientras que el simporte tiene un papel mayoritariamente asimilativo, el antiporte está más relacionado con la reducción de nitrato en el proceso de desnitrificación que llevan a cabo nitrato reductasas de membrana (NarG) ya que el nitrato tiene que entrar al citoplasma y el nitrito volver al periplasma para continuar con la desnitrificación, ofreciendo el antiporte un mecanismo de transporte de sustratos sin gasto de energía. Los transportadores tipo MFS normalmente se componen de 12 hélices transmembrana agrupadas en dos dominios, en el caso de los simportadores se ayudan del gradiente electroquímico para introducir el anión junto a un protón, y los antiportadores del intercambio de dos moléculas con la misma carga (Moreno-Vivián *et al.*, 2011). Paradójicamente, el antiportador NarK para funcionar puede necesitar un simportador ya que requiere la presencia de nitrito en el interior celular, para solucionar esto la proteína NarK de *Pa. denitrificans* se compone de dos subunidades, una con función antiporte y la otra simporte para iniciar el proceso, de hecho la subunidad simportadora contribuye y complementa la función de NasA (Figura 2.2; Goddard *et al.*, 2017).

2.2.3. Organización de los genes codificantes de las nitrato y nitrito reductasas asimilativas

La distribución y ordenación de los diferentes genes implicados en asimilación de nitrato y nitrito ha sido estudiada en numerosos organismos, centrándose en principio fundamentalmente sólo en cianobacterias, pero posteriormente también en numerosas bacterias heterótrofas, lo que ha revelado que el proceso de asimilación de nitrato y nitrito está ampliamente distribuido entre procariotas (Richardson *et al.*, 2001). A pesar de que los diferentes elementos implicados en la asimilación de nitrato se encuentran considerablemente conservados entre microorganismos, no se ha seguido una nomenclatura estricta, usándose frecuentemente nombres como *nar*, *nir* o *nap* que también son empleados para la reducción respiratoria de nitrato.

Normalmente los genes implicados en la asimilación de nitrato y nitrito se agrupan dentro de operones o grupos de operones contiguos que incluyen los genes codificantes para las subunidades catalíticas, proteínas implicadas en el transporte electrónico y transportadores de nitrato y nitrito. Frecuentemente, junto a estos genes se encuentran genes relacionados con su regulación, como *nasST*. Algunas bacterias junto a los genes *nas* poseen genes que codifican mecanismos implicados en la síntesis de componentes necesarios, como el gen *cysG* implicado en la síntesis de sirohemo (Luque-Almagro *et al.*, 2011). También se pueden encontrar genes relacionados indirectamente con la asimilación de nitrato, ya que ésta implica la aparición de productos tóxicos como el propio nitrito o subproductos de su reducción como la hidroxilamina (NH₂OH) o el óxido nitrito, por lo que no es de extrañar encontrar genes implicados en su detoxificación como *hcp* y *nsrR* en el caso de *R. capsulatus* (Cabello *et al.*, 2004).

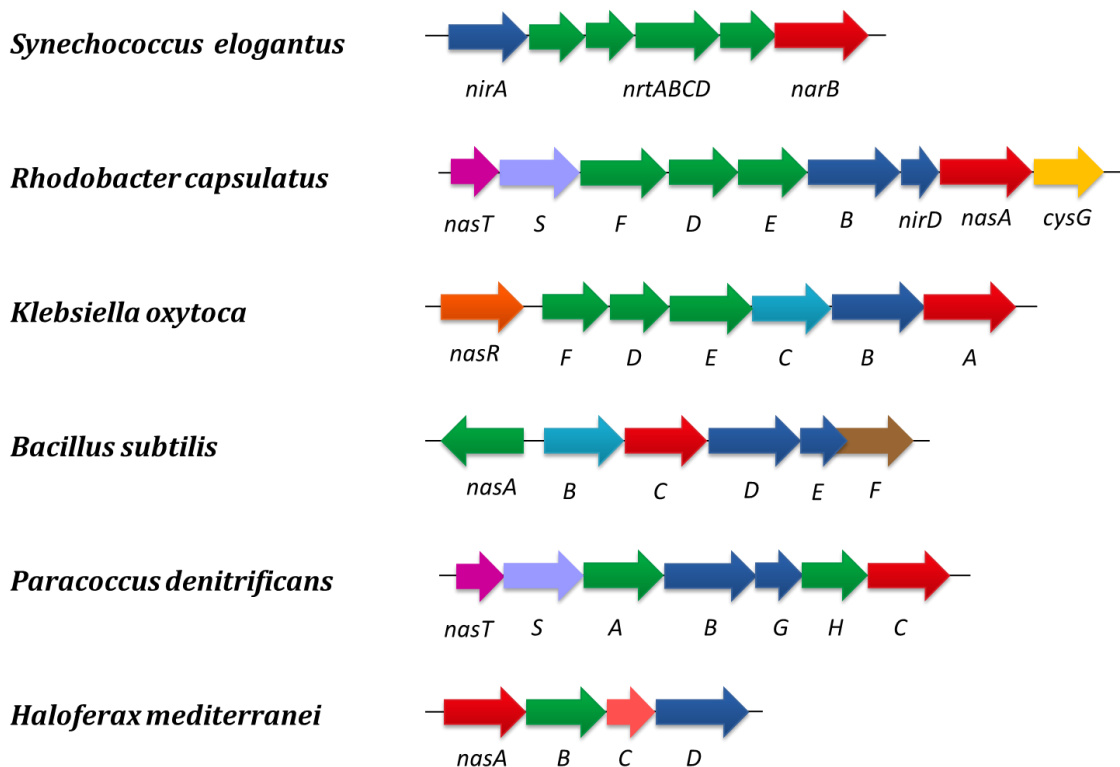


Figura 2.3. Agrupación de los genes implicados en asimilación de nitrato y nitrito en especies de diferentes familias. Se agrupan por colores los genes en función de su hipotético papel en asimilación de nitrato y nitrito. Rojo, nitrato reductasa; azul, nitrito reductasa; gris, transportador de electrones tipo ferredoxina; azul claro, flavoproteína; verde, transportador de nitrato tipo ABC; verde claro, transportador tipo MSF; morado, sensor de nitrato; naranja, regulador tipo NasR; rosa, metabolismo relacionado con asimilación de nitrato. Adaptado de Gates *et al.*, 2011.

Aunque el orden de los genes puede variar entre especies, no hay grandes diferencias entre su ordenación dentro de las mismas familias. En cianobacterias, habitualmente se localiza el gen de la nitrito reductasa NirA ferredoxina-dependiente junto a *nrtABCD* que codifica el transportador tipo ABC, y a continuación el gen de la nitrato reductasa también ferredoxina-dependiente NarB (Figura 2.3). En la bacteria fotoheterótrofa, *R. capsulatus*, se agrupan juntos el gen que codifica la hidroxilamina reductasa, *hcp*, a continuación, tres genes implicados en regulación *nsrR* y *nasST*, los responsables de la síntesis de un transportador tipo ABC *nasFED*, *nasB* y *nirD* codificantes de la nitrito reductasa NADH-dependiente, *nasA* que codifica la nitrato reductasa y por último *cysG* implicado en la síntesis de sirohemo (Figura 2.3). En la gamma-proteobacteria *K. oxytoca* en primer lugar se localiza el gen regulador *nasR*, seguido de *nasFED* que codifican un transportador tipo ABC, *nasC* que codifica la flavoproteína que transfiere electrones a la subunidad catalítica NasA de la nitrato reductasa, *nasB* responsable de la síntesis de la nitrito reductasa y por último el gen *nasA* que codifica la subunidad catalítica de la nitrato reductasa (Figura 2.3). En la bacteria Gram-positiva *Ba. subtilis* el grupo de genes responsables de la asimilación de nitrato lo inicia *nasA* que codifica un transportador tipo MFS en orientación contraria al resto, luego *nasB* responsable de la síntesis de la flavoproteína NasB, a continuación los genes *nasC* y *nasDE* que codifican la nitrato y nitrito reductasa, respectivamente, y por último *nasF* que codifica una proteína para la biosíntesis de sirohemo. En la bacteria desnitrificante *Pa. denitrificans* los reguladores *nasST* son seguidos por el gen *nasA* que codifica el transportador de nitrato, *nasB* y *nasG* que codifican la nitrito reductasa y una pequeña ferredoxina asociada, *nasH* responsable de la síntesis de una permeasa de nitrito y *nasC* que codifica la nitrato reductasa (Figura 2.3). Por último, en la arquea *H. mediterranei* se encuentra el grupo *nasABCD*, que codifica la nitrato reductasa ferredoxina-dependiente NasA, NasB que es un transportador tipo NarK, y NasC que es una proteína implicada en la síntesis del cofactor de la nitrato reductasa MobA. Como unidad transcripcional independiente, se encuentra el gen que codifica la nitrito reductasa dependiente de ferredoxina, NasD (Figura 2.3; revisado por Moreno-Vivián *et al.*, 2011).

Por regla general, los genes codificantes para los elementos estructurales y reguladores de la asimilación de nitrato y nitrito se encuentran codificados juntos (Pino *et al.*, 2006). Así como, dentro de un mismo organismo, el hecho de que, una de las enzimas nitrato o nitrito reductasa sea del tipo ferredoxina- o NADH-dependiente, condiciona a la otra a ser del mismo tipo. Además, normalmente cada clase bacteriana solamente presenta enzimas catalíticas de uno de los dos tipos. En cuanto al tipo de transportadores, proteínas reguladoras o del metabolismo de cofactores, necesarios para la asimilación de nitrato y nitrito, no parece estar tan definida su diferenciación entre familias bacterianas.

2.2.4. Regulación de la asimilación de nitrato y nitrito

El transporte y posterior reducción de nitrato hasta amonio con fines asimilativos es un proceso que requiere una alta demanda energética, al menos una molécula de ATP para el transporte activo y ocho electrones para la reducción de nitrato, así como la síntesis de enzimas dedicadas y complejos grupos prostéticos. Este elevado coste energético condiciona a las células a mantener una estricta regulación de los genes de la asimilación de nitrato y nitrito para evitar el uso de recursos cuando no es necesario o no hay sustratos suficientes para llevar a cabo este proceso. Así, la expresión de estos genes se ve sometida a dos niveles de control, por un lado, a una respuesta específica a la presencia de nitrato o nitrito y por otro lado a una regulación general del balance C/N que puede, tanto inducir la asimilación de nitrato y nitrito si necesita compuestos nitrogenados, como reprimirla si se disponen de otros sustratos nitrogenados más reducidos como el amonio o nitrógeno orgánico (Luque-Almagro *et al.*, 2011).

2.2.4.1. Regulación general de la asimilación de compuestos nitrogenados

Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos para detectar, responder y adaptarse a los cambios en la disponibilidad de nutrientes en el medio (revisado por Shimizu, 2016). La respuesta fisiológica para adaptarse a estos cambios normalmente incluye a un sistema de transducción de señales de dos componentes (two-component system, TCS) que permite a la bacteria responder a diversos estímulos medioambientales (Stock *et al.*, 2000). En relación con la asimilación de nitrógeno, el sistema TCS mejor conocido es NtrB-NtrC, el cual está implicado en la expresión de

genes de repuesta a limitación de nitrógeno (Jiang & Ninfa, 1999, Pioszak *et al.*, 2000, Jiang & Ninfa, 2009, Schumacher *et al.*, 2013). NtrBC ha sido bien caracterizado en bacterias entéricas (Merrick & Edwards, 1995, Reitzer, 2003, Li & Lu, 2007, van Heeswijk *et al.*, 2013). NtrB es el sensor quinasa que responde a una señal interna autofosforilándose en un residuo de histidina. El grupo fosforilo de la histidina es entonces transferido a un residuo de aspartato conservado de la proteína reguladora de respuesta NtrC en su dominio receptor. Una vez fosforilado, NtrC se une a la secuencia de ADN del promotor específico y activa la transcripción de los genes diana (Figura 2.4; (Weiss *et al.*, 1992, Chen & Reitzer, 1995).

En un nivel superior, las proteínas P_{II} (GlnB y GlnK), coordinan la regulación entre el metabolismo del carbono y del nitrógeno, modulando la actividad de NtrBC, en heterótrofos, o NtcA, en cianobacterias. Las proteínas P_{II} detectan los niveles de α -cetoglutarato, y en algunas bacterias de forma indirecta la glutamina (Leigh & Dodsworth, 2007, Forchhammer, 2008). Las proteínas P_{II} forman trímeros que se pueden conjugar con un nucleósido de uridina (UMP) por subunidad, esta uridilación ocurre gracias a una proteína UTPasa sensora de glutamina y conduce a la activación de la enzima glutamina sintasa (GS). Bajo condiciones de limitación de nitrógeno, el ratio de α -cetoglutarato/glutamina se incrementa, provocando que la actividad UTPasa se inhiba, liberando de uridinas a las proteínas P_{II} e inhibiendo por tanto la actividad GS. Por otro lado, las proteínas P_{II} inducen la actividad quinasa de NtrB, la cual fosforila a NtrC. Estudios recientes han confirmado un papel *in vivo* del α -cetoglutarato como regulador predominante, actuando como señal metabólica, de la regulación del nitrógeno (Schumacher *et al.*, 2013). NtrC fosforilado es capaz de unirse a secuencias específicas de ADN y adicionalmente posee actividad ATPasa que es fundamental para la activación de la transcripción de genes involucrados en la captación de nitrógeno, en su metabolismo y su regulación (Zimmer *et al.*, 2000). NtrC habitualmente, regula la expresión de los genes diana junto al factor sigma 54 (σ^{54}), el producto del gen *rpoN* (North *et al.*, 1993), aunque puede ejercer su función de forma independiente a σ^{54} , como en el caso de los genes *nifA*_{1/2} y *glnB* de *R. capsulatus* (Cullen *et al.*, 1996).

Junto a los genes *ntrBC* frecuentemente se encuentran los genes *ntrYX*, también codificantes de un sistema TCS sensor/quinasa parecido a NtrBC, el cual puede de la

misma manera, estar implicado en asimilación de nitrato. Ambos sistemas pueden estar coordinados, ejerciendo un control redundante sobre la asimilación de nitrato, habiendo un defecto en el crecimiento en una mutante *ntrY* de *Pa. denitrificans* (Luque-Almagro *et al.*, 2017), e incluso incapacidad de crecimiento de una cepa mutante *ntrX* de *Azorhizobium caulinodans* usando nitrato como única fuente de nitrógeno (Pawlowski *et al.*, 1991). De hecho, se ha demostrado en *R. capsulatus* que la actividad quinasa de NtrB sobre NtrC puede ser realizada también por NtrY (Drepper *et al.*, 2006).

El sistema NtrBC también está implicado en la regulación negativa de la asimilación de nitrato. A pesar de la baja toxicidad del nitrato y de su presencia en numerosos ecosistemas, frecuentemente deja de ser asimilado por las bacterias si coexiste con otra fuente de nitrógeno más reducida, hecho de esperar debido al gran coste energético de la reducción de nitrato hasta nitrógeno orgánico. El amonio es el principal represor de la asimilación de nitrato, durante su asimilación hasta glutamato se produce glutamina y descienden los niveles de α -cetoglutarato, principal inductor de la asimilación de nitrato.

2.2.4.2. Regulación específica de la asimilación de nitrato y nitrito

Una vez inducida la asimilación de compuestos nitrogenados, en bacterias Gram-negativas, la asimilación de nitrato se somete a un nivel de control adicional. Tres grupos de proteínas diferentes lo llevan a cabo, NtcB en cianobacterias y NasR o el TCS NasST en bacterias heterótrofas (Moreno-Vivián *et al.*, 2011). La proteína NtcB de cianobacterias pertenece a la familia de reguladores transcripcionales tipo LysR, está implicada en inducción de la expresión de los genes para la asimilación en respuesta a nitrito (Ohashi *et al.*, 2011). En el caso de las proteínas NasR y NasST, el mecanismo molecular para la inducción en respuesta a nitrato y nitrito se basa en la antiterminación prematura de la transcripción. Tanto NasR como NasT presentan en el extremo C-terminal un dominio de unión a ARN conocido como ANTAR (de sus siglas en inglés, AmiR and NasR transcription antitermination regulator) con el que se unen a un motivo específico del ARN emergente durante la transcripción, compuesto por dos horquillas en tándem, denominadas como P1 y P2. En el ápice de cada una de las horquillas se localiza una secuencia de 6 nucleótidos con las posiciones A1 y G4 muy

conservadas (Chai & Stewart, 1999), la cuales son reconocidas específicamente por el dominio ANTAR. La segunda horquilla P2, va seguida de un tramo rico en uracilo (Peters *et al.*, 2011), que está implicado en la terminación prematura de la transcripción. Cuando las proteínas ANTAR están activas, su unión a las horquillas P1 y P2 las estabiliza permitiendo que la transcripción continúe, sin embargo, si la horquilla P2 no es estabilizada se desorganiza para formar una horquilla aún mayor que junto a la secuencia rica en uracilo provoca la terminación de la transcripción en ese punto (Stewart & van Tilbeurgh, 2012). La mayoría de las proteínas ANTAR de dos componentes se activan o desactivan por la fosforilación y desfosforilación que provoca la proteína sensora quinasa (Ramesh *et al.*, 2012), aunque el desencadenante puede también ser una interacción física entre ambas proteínas. Las modificaciones químicas o físicas que modulan la actividad de estas proteínas se produce en un dominio REC, tipo CheY, presente en el extremo N-terminal de NasT (Figura 2.4; Luque-Almagro *et al.*, 2013).

Para detectar el nitrato y el nitrito, NasR contiene un dominio sensor NIT (Shu *et al.*, 2003), en cambio NasS parece poder unirse al nitrato y nitrito de forma parecida a como lo hacen los transportadores tipo ABC, de hecho conserva una gran homología con la subunidad NtrA de éstos (Koropatkin *et al.*, 2006), la detección de nitrato o nitrito por NasS provoca la separación del complejo NasST, formado por dos subunidades de cada una, dejando a NasT en su conformación activa monomérica (Luque-Almagro *et al.*, 2013).

La delección del gen *nasT* elimina la capacidad de crecimiento con nitrato como única fuente de nitrógeno en *Pa. denitrificans*, sin embargo la ausencia de *nasS* no demuestra ningún defecto en la asimilación y crecimiento con nitrato, pero queda desregulada la expresión de los genes Nas en ausencia de sustrato (Luque-Almagro *et al.*, 2013).

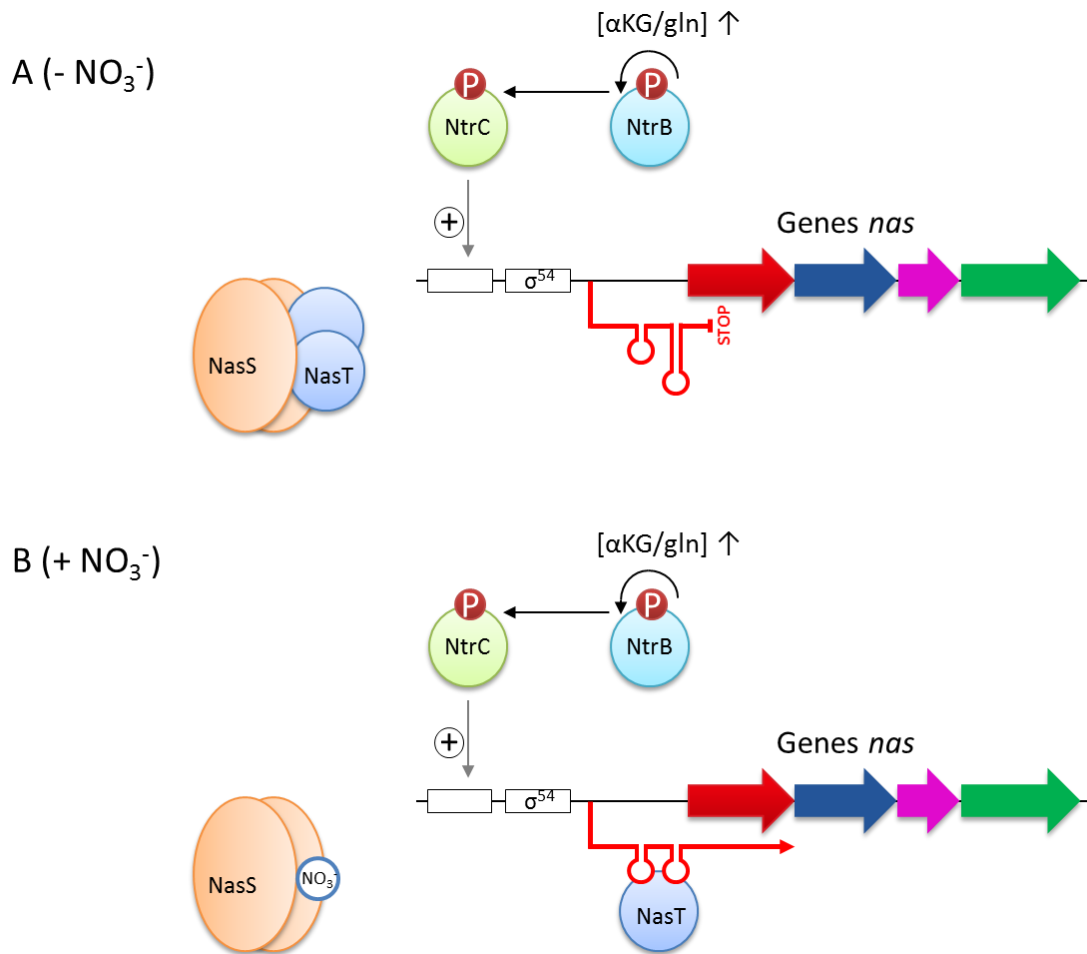


Figura 2.4. Esquema funcional del sistema de dos componentes NasST en respuesta a ausencia y presencia de nitrato. En ausencia de nitrato (A), aunque el sistema de dos componentes NtrBC active la transcripción de los genes *nas*, la inhibición de NasT por NasS provoca la terminación prematura de la transcripción. En presencia de nitrato (B), NasS libera a la subunidad NasT que ejerce un papel de antiterminación de la transcripción de los genes *nas*. Adaptada de (Romeo *et al.*, 2012).

La expresión de estos sistemas de regulación específica, *nasR* y *nasST*, se encuentran a su vez regulados por el sistema de regulación general NtrBC (Lin & Stewart, 1998, Luque-Almagro *et al.*, 2017), ejerciendo de esta manera el sistema general NtrBC un segundo nivel de regulación, de forma directa y coordinado con la regulación específica, sobre los genes de asimilación de nitrato y nitrito (Wang *et al.*, 2012). Incluso, un tercer nivel de control se ha propuesto recientemente sobre la traducción de las proteínas Nas. En ausencia de nitrato, en *Pa. denitrificans* se ha observado que pequeños niveles de transcripción de los genes *nas* no se traduce en la presencia de las proteínas, sugiriendo que otros sistemas implicados en la regulación post-transcripcional de los ARN mensajeros de los genes *nas*, necesitan la presencia de nitrato para permitir su correcta traducción a proteínas (Luque-Almagro *et al.*, 2017).

Adicionalmente, puede existir una regulación directa por nitrato, nitrito u otros ligandos de los genes *nas*. En *Pa. denitrificans* se ha demostrado que la estabilidad de una estructura cuádruplex de ADN en la región promotora de los genes *nasST* puede estar implicada en su regulación. Estas formaciones se originan por la interacción por puentes de hidrógeno entre cuatro guaninas dando una estructura plana cuadrada llamada tétrada. Varias tétradas se organizan en tándem para originar una estructura secundaria que dificulta y modula la expresión génica. La presencia de nitrato parece disminuir la estabilidad de los cuádruplex de guanina en la región promotora de los genes *nasST* permitiendo su expresión, y aumentando en consecuencia la expresión del operón *nas* en *Pa. denitrificans* (Waller *et al.*, 2016).

2.2.5. Incorporación del amonio a esqueletos carbonados

Para finalizar el proceso de asimilación de nitrato y nitrito, el amonio generado por la reducción de éstos debe ser incorporado a un esqueleto carbonado para así convertirse en nitrógeno orgánico y bioaccesible para las diferentes rutas metabólicas de la bacteria. El proceso de incorporación de amonio se produce principalmente por acción secuencial de las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa, también llamada glutamina: 2-oxoglutarato aminotransferasa (GOGAT). La enzima GS cataliza la reacción de amidación del glutamato para generar glutamina con gasto de ATP, a continuación, la GOGAT cataliza la transaminación desde la glutamina a una molécula de α -cetoglutarato para generar dos moléculas de glutamato. A partir de aquí, diferentes moléculas nitrogenadas se producen gracias a diferentes reacciones de transaminación secundarias (revisado por Moreno-Vivián *et al.*, 2011).

En menor medida, el amonio también puede ser incorporado directamente al α -cetoglutarato para producir glutamato por la glutamato deshidrogenasa (GDH) o a piruvato para dar lugar a la síntesis de alanina por la alanina deshidrogenasa. Estos procesos no requieren consumo de ATP, sin embargo, la K_M por el amonio es alta por lo que la reacción normalmente discurre en dirección contraria como proceso de desaminación, y solamente actuaría con función asimilativa bajo condiciones específicas y a muy altas concentraciones de amonio (Muro-Pastor *et al.*, 2005).

2.3. Metabolismo de NO en bacterias

El óxido nítrico (NO), o monóxido de nitrógeno, es un gas diatómico, compuesto por un átomo de oxígeno y otro de nitrógeno quedando un electrón desapareado, lo que lo convierte en un radical, representándose químicamente como $\text{NO}\cdot$ para indicar el electrón desapareado. Su composición química le confiere unas propiedades inusuales y poco intuitivas, ya que a pesar de ser radical, el NO no es especialmente susceptible a oxidación o reducción (Bartberger *et al.*, 2002). De todos modos, puede reaccionar con varias especies de oxígeno como el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y el oxígeno molecular (O_2) para formar las llamadas especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Earnshaw & Greenwood) como el peroxynitrito (ONOO^-), óxido de nitrógeno radical ($\cdot\text{NO}_2$), trióxido de dinitrógeno (N_2O_3), catión nitrosonio (NO^+) o el anión nitroxilo (NO^-).

Las reacciones del NO en organismos vivos se pueden diferenciar entre fisiológicas, como por ejemplo cuando actúa como molécula señal, y patológicas. Las reacciones fisiológicas ocurren a concentraciones bajas de NO, niveles nanomolares, mientras que, cuando las concentraciones alcanzan niveles micromolares se convierten en patológicas (Toledo & Augusto, 2012). A altas concentraciones y especialmente en presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS), el NO provoca innumerables reacciones que conllevan la producción de otros óxidos de nitrógeno tóxicos o la inhibición de enzimas que son importantes para las bacterias impidiendo su crecimiento (revisado por Stern & Zhu, 2014). En sistemas biológicos, el NO puede pasar a formar otras especies reactivas como son los radicales hidroxilo y carbonato ($\text{OH}\cdot$ y $\text{CO}_3^{\cdot-}$, respectivamente). Algunas de estas especies son potentes oxidantes que pueden oxidar directamente el ADN. Por ejemplo, una alta concentración de NO produce la desaminación de la citosina provocando la mutación de citosina (C) a timina (T) (Wink *et al.*, 1991), o el peroxinitrito puede oxidar directamente a los residuos de guanosina transformándolos en 8-oxo-2'-desoxiguanosina y causar roturas en las cadenas de ADN (Salgo *et al.*, 1995, Burney *et al.*, 1999). Junto a la formación de potentes oxidantes, las RNS provocan la formación de modificaciones estables en macromoléculas, como son los complejos de hierro dinitrosilo (DNICs), cisteínas nitrosiladas y tirosinas nitradas. Estas modificaciones alteran la funcionalidad de las

proteínas y por consecuente la regulación génica y la fisiología celular (revisado por Stern & Zhu, 2014).

El NO es altamente reactivo con los metales de transición, como el hierro, tan importante para los organismos. El NO reacciona fácilmente tanto con el hierro hémico como con el no hémico, como son los grupos hierro-azufre, con mayor afinidad por la forma ferrosa que por la férrica. La unión del NO al hierro ocurre de forma similar a como lo hace el O₂ debido a que ambas moléculas poseen un electrón desapareado capaz de formar un enlace covalente coordinado con el orbital *d* del átomo de hierro. Esta propiedad de poder unirse tanto a NO como a O₂ convierte al hierro paradójicamente en un elemento clave tanto para la sensibilidad, por ejemplo bloqueando las cadenas respiratorias, como para la tolerancia al NO, si es detoxificado por una hemoglobina (Stevanin *et al.*, 2000).

A nivel proteico, la modificación más importante producida por el NO es la formación de grupos S-nitrosotiol (S-NO) que comúnmente se produce sobre los residuos de cisteína alterando la funcionalidad de las proteínas. Gran número de proteínas bacterianas son afectadas por la formación de grupos S-nitrosotiol cuando se ven expuestas a NO tanto exógeno como el producido por la desnitrificación (Rhee *et al.*, 2005, Brandes *et al.*, 2007, Seth *et al.*, 2012). De especial relevancia es la S-nitrosilación de cisteínas clave en reguladores transcripcionales, ya que modifican y adaptan la respuesta del organismo a la presencia de RNS (Kim *et al.*, 2002). El mecanismo por el que el NO induce la formación de S-nitrosotioles aún no está claro ya que el NO no reacciona directamente con grupos tioles en condiciones fisiológicas (Stern & Zhu, 2014).

Otra modificación proteica inducida por la presencia de NO es la formación de nitrotirosina. Al igual que con los grupos tioles, el NO no reacciona directamente con las tirosinas sino a través de la formación de peroxinitrito (Souza *et al.*, 2008). Se ha observado que la nitración de tirosinas tiene menos poder de inhibición enzimática que la S-nitrosilación de cisteínas y que para tener efecto requiere, adicionalmente, la presencia de especies oxidantes, de hecho el análisis de expresión génica y proteómica

ha demostrado un solapamiento de la respuesta al peroxinitrito y al estrés oxidativo (McLean *et al.*, 2010, Lindemann *et al.*, 2013).

En resumen, el NO reacciona en los sistemas biológicos por dos vías, la primera a través de la reacción con oxígeno o superóxido para generar RNS, y la otra por nitrosación directa de metales de transición. Por la primera vía, se pueden producir modificaciones de macromoléculas, así como la oxidación directa del ADN. Por la segunda vía, se producen complejos estables como el hemo nitrosilo, los DNICs, cisteínas nitrosiladas y tirosinas nitradas los cuales pueden modificar la función de las proteínas tanto patológicamente como en respuesta adaptativa (Stern & Zhu, 2014).

2.3.1. Producción de NO

Dado que el NO es una molécula combinada por los dos átomos más frecuentes en la atmósfera cabe esperar que no sea extraño encontrarla frecuentemente en cualquier bacteria, de hecho la totalidad de bacterias que se han estudiado presentan algún mecanismo para detectar o tolerar NO (revisado por Stern & Zhu, 2014).

La fuente de NO más estudiada es la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), una enzima que produce NO a altas concentraciones dentro de las células inmunes de mamíferos, como macrófagos y neutrófilos. Este NO producido por la iNOS junto al anión superóxido generado por la NADPH oxidasa crean un potente cóctel de agentes oxidantes que limitan la replicación bacteriana. La iNOS genera NO por la catálisis de L-arginina con oxígeno molecular para generar NO y L-citrulina con consumo de NADPH (Li *et al.*, 2007, Sabat *et al.*, 2013). En mamíferos, además de las vías endógenas enzimáticas, existe otra fuente de NO no menos importante para el control de patógenos a nivel gastrointestinal llamada sistema orogástrico nitrato-nitrito-NO que se sirve de la respiración anaeróbica de NO_3^- bacteriana y la síntesis química del NO. Para empezar, el nitrato de la dieta es reducido a nitrito por la respiración anaeróbica de los microorganismos de la boca, ese nitrito al llegar al estómago y acidificarse el medio es protonado a ácido nitroso el cual, espontáneamente se descompone en NO_2 , NO y agua. Esta es una de las razones por la que se considera al bajo pH del estómago una barrera para muchos patógenos gastrointestinales (Lundberg *et al.*, 2008).

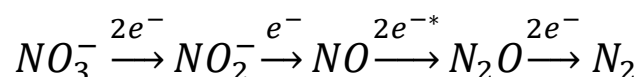
En bacterias se pueden generar cantidades significativas de NO por múltiples mecanismos los cuales se detallan a continuación.

2.3.1.1. Fuentes respiratorias

Aunque se han descrito en bacterias diferentes procesos implicados en la síntesis de NO, actualmente se considera a la desnitrificación y a la reducción desasimilativa de nitrato a amonio (DNRA) las principales fuentes respiratorias de NO (revisado por Torres *et al.*, 2016). Es sabido que el NO es un intermediario del proceso de la desnitrificación mediante el cual el nitrato es reducido hasta nitrógeno molecular con fines respiratorios. La cantidad generada varía dependiendo de la cepa y de las condiciones de cultivo estando en el rango de nanomolar para la mayoría de monocultivos (Goretski *et al.*, 1990, Stuvén & Bock, 2001), y pudiendo alcanzar niveles micromolares para el caso al menos de *Rhodobacter sphaeroides* (Choi *et al.*, 2006). En cuanto a la DNRA, este proceso consiste en la reducción respiratoria de nitrato a nitrito y de nitrito a amonio, en el cual el NO es producido bien químicamente y/o enzimáticamente a partir del nitrito (revisado por Simon & Klotz, 2013).

2.3.1.1.1. Desnitrificación

Se conoce comúnmente como desnitrificación a la reducción de los aniones nitrato y nitrito con fines respiratorios para generar ATP (Simon *et al.*, 2008), estos sustratos se encuentran ampliamente distribuidos en ecosistemas acuáticos y terrestres. El proceso completo consta de cuatro etapas enzimáticas. En la primera, el nitrito es generado por la reducción desasimilativa del nitrato, para luego ser reducido subsecuentemente en NO, óxido nitroso (N₂O) y finalmente nitrógeno molecular (N₂). Cada óxido y anión de nitrógeno actúa individualmente como aceptor final de electrones, constituyendo la desnitrificación una cadena respiratoria que funciona en ausencia de oxígeno y permite la supervivencia y replicación del microorganismo en condiciones anaeróbicas (Zumft, 1997).



La desnitrificación está ampliamente distribuida dentro del dominio Bacteria y parece ser dominante dentro de las Proteobacterias (Shapleigh, 2006). De todos modos, hay

evidencias de que algunos hongos (Takaya, 2002, Prendergast-Miller *et al.*, 2011) y arqueas (Treusch *et al.*, 2005) también pueden desnitrificar, y los organismos nitrificantes también tienen genes implicados en desnitrificación (Cébron & Garnier, 2005). La mayoría de estudios sobre desnitrificación se han focalizado en bacterias Gram-negativas que habitan nichos terrestres. Las α -proteobacterias *Pa. denitrificans* y la γ -proteobacterias *Pseudomonas stutzeri* y *Pseudomonas aeruginosa* se consideran organismos modelo en el estudio de la desnitrificación (Figura 2.6; Zumft, 1997).

Las reacciones de la desnitrificación están catalizadas por las enzimas nitrato reductasas periplásmica (Nap) o nitrato reductasa asociada a membrana (Nar), nitrito reductasas (NirK o NirS), óxido nítrico reductasas (cNor, qNor o Cu_ANor) y óxido nitroso reductasa (Nos), y están codificadas por los genes *nap/nar*, *nirK/nirS*, *nor* y *nos*, respectivamente.

Para la primera etapa de la desnitrificación la mayoría de los desnitrificantes disponen de las enzimas Nap y Nar. Dependiendo de la especie, Nap puede ser empleada para la respiración anaerobia del nitrato como parte de la amonificación, para la desnitrificación o como sumidero de electrones para mantener la homeostasis redox disipando el exceso de poder reductor. Este es el caso de *Pa. denitrificans* que además de Nar, expresa la enzima Nap. En esta bacteria, Nap no es electrogénica y sirve para disipar el exceso de equivalentes de reducción formados durante el crecimiento aeróbico. La enzima Nap está formada por el heterodímero de la subunidad catalítica NapA y el citocromo *c* NapB el cual recibe los electrones desde otro citocromo *c* de membrana, NapC. Tanto las enzimas Nap como Nar reciben los electrones de la reserva de ubiquinonas (revisado por Richardson *et al.*, 2007, Richardson, 2011, Bueno *et al.*, 2012, Simon & Klotz, 2013, Torres *et al.*, 2016). La mayoría de las enzimas Nar tienen orientado su centro activo de reducción de nitrato, NarG, hacia el citoplasma y dependen de un transportador de nitrato en la membrana citoplasmática para su funcionamiento, con la excepción de algunas Nar de arqueas y bacterias cuyo sitio activo está en la cara externa de la membrana citoplasmática y por tanto no requieren de transportador de nitrato (Martinez-Espinosa *et al.*, 2007). En *Pa. denitrificans* se ha identificado un importador de nitrato, NarK, que introduce nitrato

en el citoplasma y exporta nitrito, el producto de la reducción del nitrato, al periplasma para así continuar con el proceso desnitrificante.

2.3.1.1.1.1. Nitrito reductasas NirK y NirS

La producción de NO durante la desnitrificación ocurre en la segunda etapa de la ruta y está catalizada por las nitrito reductasas respiratorias, de las cuales, se han descrito dos tipos, NirS y NirK (revisado por Rinaldo *et al.*, 2008, Van Spanning, 2011). Estas enzimas catalizan la reducción, por ganancia de un electrón, del nitrito a NO, aunque, ninguna de estas enzimas es electrogénica. Ambos tipos de enzimas están localizadas en el espacio periplásmico y reciben electrones de citocromos *c* o de la proteína azul de cobre, pseudoazurina, vía complejo citocromo *bc*₁. NirS es un homodímero con un dominio pequeño hemo *c* y otro grande hemo *d*₁ por cada monómero. Los electrones se transfieren, desde el donador de electrones, vía hemo *c* al hemo *d*₁, donde el nitrito se une y es reducido a NO (Rinaldo *et al.*, 2008). Los genes responsables de la síntesis de NirS se han caracterizado ampliamente en *Ps. aeruginosa* (*nirSMCFDLGHJEN*), *Pa. denitrificans* (*nirXISECFDLGHJN*) y *Ps. stutzeri* con dos grupos (*nirSTBMCFDLGH* y *nirJEN*) quedando entre los dos grupos de genes *nir* un grupo de genes que codifica la óxido nítrico reductasa. El gen *nirS* codifica la subunidad funcional del dímero NirS, y todos los demás genes se necesitan para la propia síntesis y el ensamblaje e inserción del cofactor hemo *d*₁ en el centro activo de la enzima. La biosíntesis del cofactor hemo *d*₁ ha sido objeto de numerosas investigaciones (revisado por Bali *et al.*, 2014).

Por otro lado, las enzimas tipo NirK son homotrímeros que contienen tres centros de cobre tipo I, con un átomo de cobre cada uno, y otros tres tipo II con una estructura de coordinación tipo cuadrada plana. El nitrito se une a los sitios tipo II, reemplazando a un ligando exógeno (agua o ion cloruro), y aquí es reducido a NO por la transferencia electrónica desde el sitio de cobre tipo I. En contraste con la compleja organización de los genes que codifican las proteínas NirS, NirK es codificada por un único gen, *nirK* (Rinaldo & Cutruzzolá, 2007, Van Spanning, 2011). A veces junto al gen *nirK*, existe otro gen, *nirV*, responsable de la síntesis de la proteína NirV relacionada con las desulfurasas y puede ser necesaria para la inserción del centro reactivo de cobre. No se ha encontrado ningún organismo que contenga los dos tipos de nitrito reductasas,

lo que aparentemente sugiere que la presencia de una clase de nitrito reductasa excluye la opción de adquirir la segunda.

La desnitrificación continua con la reducción de NO a N₂O por la enzima Nor en la cara externa de la membrana citoplasmática (revisado por Suharti de Vries & Pouvreau, 2007; Hendriks *et al.*, 2000, Zumft, 2005, Suharti de Vries & Pouvreau, 2007, Richardson, 2011). Dependiendo del donador de electrones, las enzimas Nor, se diferencian en tres grupos, cNor, qNor y qCu_ANor, que reciben electrones desde citocromos *c* y/o quinonas. Una descripción en detalle de los aspectos bioquímicos y fisiológicos de las diferentes Nor se puede ver en el apartado 2.3.2.2.

En la última etapa de la desnitrificación, el N₂O producido por la Nor es reducido, con dos electrones a N₂, catalizado por la enzima soluble periplasmática NosZ (Zumft & Körner, 2007). Se conocen dos clados diferentes de esta enzima, dependiendo del taxón microbiano donde se encuentre, por un lado la NosZ clado I, también conocida como NosZ típica, predominantemente extendida entre los organismos desnitrificantes, y por otro lado la enzima NosZ clado II o atípica, que curiosamente se puede encontrar en bacterias no desnitrificantes, posiblemente para eliminar el N₂O generado por sistemas de eliminación de NO (Jones *et al.*, 2013). Se considera que la enzima NosZ es el único sistema conocido para la eliminación de N₂O, sin embargo, varios autores han sugerido que existe una ruta de consumo alternativo de N₂O en la que es reducido a amonio por la nitrogenasa, la enzima implicada en la fijación biológica del N₂. De hecho, la Nos y la nitrogenasa se encuentran ambas en numerosos desnitrificantes (Shapleigh, 2006), pero experimentos recientes de seguimiento con isótopos en *Ps. stutzeri* han desvelado que el consumo de N₂O por la vía de reducción asimilativa a amonio no ocurre (Desloover *et al.*, 2014), que en realidad, y como los últimos estudios han demostrado, la reducción respiratoria del N₂O se puede acoplar a la fijación de N₂ y ser reducido éste a N₂ para a continuación ser reducido a amonio por la nitrogenasa e incorporado a la biomasa celular. Este mecanismo, que evita la emisión del N₂O a la atmósfera, puede jugar un papel relevante en las estrategias empleadas para mitigar el cambio climático impulsado por el N₂O.

2.3.1.1.2. Reducción desasimilativa de nitrato a amonio

El proceso de la reducción desasimilativa de nitrato a amonio (DNRA) se parece considerablemente a la asimilación del nitrato en el sentido de que comparten la misma ruta metabólica, la reducción del nitrato a nitrito y finalmente a amonio. Además, ambos procesos tienen función desasimilativa ya que se pueden emplear para regenerar NAD(P) (Moreno-Vivian & Ferguson, 1998), sin embargo, a diferencia de la asimilación del nitrato, DNRA genera un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana, el cual es necesario para fosforilar el ADP a ATP permitiendo crecer a las bacterias nitrato-amonificantes a expensas de la respiración del nitrato y nitrito. Únicamente se han descrito dos procesos que permiten a las bacterias crecer mediante la reducción respiratoria del nitrito, la desnitrificación que termina por reducirlo a dinitrógeno y la nitrito-amonificación que lo reduce a amonio. Ambos procesos se realizan en condiciones anaeróbicas y hasta hace poco se pensaba que no coexistían en un mismo microorganismo, sin embargo, actualmente esa afirmación ha sido desmentida gracias a los análisis genómicos. Por ejemplo, la Gammaproteobacteria *Shewanella loihica* cepa PV-4, posee los sets completos de genes necesarios para llevar a cabo la desnitrificación y la DNRA (Sanford *et al.*, 2012). *Sh. loihica* PV-4 posee dos copias de *nrfA*, así como el juego completo para la desnitrificación (*nirK*, *norB*, y *nosZ*) (Sanford *et al.*, 2012, Yoon *et al.*, 2013), y además, la funcionalidad de ambos procesos también ha sido confirmada (Yoon *et al.*, 2015).

Los organismos nitrato-amonificantes que llevan a cabo la DNRA comparten con los desnitrificantes el paso de reducción del nitrato a nitrito (Bleakley & Tiedje, 1982). Para la primera etapa de reducción del nitrato pueden utilizar tanto una nitrato reductasa unida a membrana (Nar) como una periplásmica (Nap) o ambas (Richardson *et al.*, 2001, Kern & Simon, 2009, Simon & Klotz, 2013). A continuación, el nitrito es reducido a amonio por la enzima NrfA, la cual obtiene electrones desde la reserva de quinol/quinonas a través de uno de los varios sistemas enzimáticos de transporte electrónico, dependiendo del organismo (Simon, 2002, Kern & Simon, 2009, Simon & Klotz, 2013). Los ejemplos más relevantes de bacterias nitrato-amonificantes corresponden a Gamma, Delta y Epsilonproteobacterias, como *E. coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Shewanella oneidensis*, *Sh. loihica*, *Anaeromyxobacter*

dehalogenans, *Campylobacter jejuni* y *Wolinella succinogenes* y algunos *Bacillus* como *Ba. vireti*, *Ba. azotoformans* o *Ba. bataviensis* (Heylen & Keltjens, 2012, Mania *et al.*, 2014). Con la excepción de *Sh. loihica*, las bacterias nitrato-amonificantes normalmente carecen tanto de NirK como de NirS, así como de las clásicas NO reductasas respiratorias de membrana (cNor y qNor) de bacterias desnitrificantes, y sin embargo, la DNRA es fuente de NO y N₂O.

2.3.1.1.3. Nitrito reductasa NrfA

Especies nitrato-amonificantes como *Sa. Typhimurium* y *E. coli* carecen de las enzimas nitrito reductasa respiratorias tipo NirS o NirK, pero producen NO como producto asociado al metabolismo del nitrato y nitrito durante el proceso DNRA. Estudios con cepas mutantes de *E. coli* relacionan la formación de NO dependiente de nitrito con la actividad de las enzimas nitrito reductasa asimilativa NirBD y nitrito reductasa respiratoria NrfA, ambas catalizadoras de la reducción de nitrito a amonio (Corker & Poole, 2003, Weiss, 2006). Aunque por el contrario, como se describe en el apartado 2.3.2.4, la NrfA de *E. coli* también se ha descrito como sistema que elimina NO (Poole, 2005, Einsle, 2011). En otros casos, como en *Sa. Typhimurium*, para la generación de NO desde nitrito, a pesar de poseer NirBD y NrfA, la principal fuente de NO procede de la Nar (Rowley *et al.*, 2012).

En *E. coli*, la reducción del nitrato hasta a amonio puede acoplarse a una cadena de transporte electrónico con formiato como donador de electrones (Potter *et al.*, 2001), para ello, la nitrito reductasa periplásmica NrfA, (revisado por Clarke *et al.*, 2008, Einsle, 2011, Simon & Klotz, 2013) reduce el nitrito producido por la Nap hasta amonio con seis electrones, que frecuentemente los obtiene por oxidación del formiato. Esto permite al nitrito ser usado como aceptor final de electrones, facilitando la respiración anaeróbica, a la vez que el nitrógeno permanece en una forma accesible para ser consumido por la bacteria. NrfA fue descrita por primera vez en *E. coli*, se encuentra en el periplasma de un amplio rango de Gamma, Delta y Epsilonproteobacterias. En *E. coli*, los genes *nrfABCDEFG* están implicados en la síntesis y actividad de NrfA. El gen *nrfA* codifica la enzima NrfA, *nrfB* un pequeño transportador de electrones pentahémico que permite el flujo electrónico entre la quinol deshidrogenasa integrada en la membrana NrfCD y NrfA. Y los genes *nrfE*, *nrfF* y *nrfG* codifican componentes de

la maquinaria necesaria para acoplar el grupo hemo del sitio activo de NrfA (Clarke *et al.*, 2007). NrfA contiene cuatro grupos hemo *c* ligados por histidinas para el transporte electrónico que se diferencia estructuralmente del hemo del centro activo para la reducción del nitrito. El hemo catalítico está ligado proximalmente por una lisina o histidina y distalmente queda abierto hacia un bolsillo, con una histidina conservada, donde se une transitoriamente al ligando. Se propone que la histidina del bolsillo coloca al nitrito que entra en el bolsillo en la orientación necesaria para la rotura del enlace N-O (Lockwood *et al.*, 2015). El NO es generado tanto por vía química como enzimática vía NrfA desde el nitrito, aunque los mecanismos en detalle de cómo esto ocurre aún no se conocen con exactitud. Se piensa que ocurre en múltiples etapas involucrando transferencia de electrones desde sus cinco grupos hemo al sustrato, con la formación de NO e NH₂OH como intermediarios, a diferencia de las nitrito reductasas desnitrificantes (NirK o NirS), las cuales convierten el nitrito directamente en NO (Poole, 2005).

2.3.1.2. Fuentes no respiratorias

En procariotas, la formación de NO se ha pensado durante mucho tiempo que ocurría únicamente gracias a la desnitrificación, la reducción desasimilativa del nitrato y otras rutas respiratorias relacionadas como es el caso de la oxidación anaeróbica del amonio (Zumft, 1997, Richardson & Watmough, 1999, Jetten, 2008, Martínez-Espinosa *et al.*, 2011, Maia & Moura, 2014). En estas rutas, el NO es un sustrato y producto común y necesario, actuando también como molécula señal regulando los genes necesarios para su propio metabolismo. Sin embargo, actualmente, es ampliamente reconocido que el NO también está implicado en rutas no respiratorias, incluyendo citoprotección de estrés oxidativo, en *E. coli*, *Ba. subtilis*, *Bacillus anthracis* o *Staphylococcus aureus* (Nakano, 2002, Mukhopadhyay *et al.*, 2004, Shatalin *et al.*, 2008, Gusarov *et al.*, 2009), recuperación de daños provocados por la radiación (Patel *et al.*, 2009) o la biosíntesis de metabolitos secundarios, como la nitración del triptófano en *Deinococcus radiodurans* (Buddha *et al.*, 2004).

Varios procariotas, como *Staphylococcus*, *Geobacillus*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Deinococcus* y *Natronomonas*, contienen la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), homóloga a los dominios oxigenasas de las NOS de mamíferos, que

catalizan la formación de NO aeróbica desde la arginina, usando equivalentes redox celulares (Gusarov *et al.*, 2008). Algunos organismos que tienen NOS también pueden usar la reducción del nitrito para producir NO, como es el caso de *Streptomyces* que produce una pequeña cantidad de NO cuando se le deleciona el gen que codifica la NOS (Johnson *et al.*, 2008).

2.3.1.2.1. NOS bacterianas (bNOS)

Las isoformas bacterianas de la NOS (bNOS) fueron descritas por primera vez en *Nocardia* (Chen & Rosazza, 1994, Chen & Reitzer, 1995) y están presentes en numerosas especies de bacterias Gram-positivas. Las bNOS funcionan de forma similar que las NOS de eucariotas, aunque normalmente carecen del dominio reductasa (Gusarov *et al.*, 2008). Las bNOS actúan en la protección frente a agentes oxidativos (Gusarov & Nudler, 2005, Shatalin *et al.*, 2008) por dos vías diferentes, por un lado el NO producido por la bNOS inhibe transitoriamente la reducción enzimática de la cisteína, impidiendo que esta forma de cisteína se convierta en sustrato de la reacción Fenton, en la cual, esta cisteína junto a iones férrico y H₂O₂ se producen radicales de hidroxilo (OH·) que reaccionan principalmente con el DNA generando modificaciones y roturas de hebras (Aruoma *et al.*, 1989, Liochev & Fridovich, 1999, Woodmansee & Imlay, 2002). Por otro lado, el NO producido por la bNOS induce a la catalasa, la cual cataliza la descomposición del H₂O₂ en oxígeno y agua, y es la principal enzima antioxidante en estas bacterias. Por esta razón, se considera que la producción de NO por la bNOS está implicada en la defensa de los organismos patógenos frente al ataque oxidativo del sistema inmune, siendo esencial para la virulencia de *Ba. anthracis* (Shatalin *et al.*, 2008), y también es importante durante la infección de plantas por parte de *Streptomyces turgidiscabies* (Johnson *et al.*, 2008). Sin embargo, los genes que codifican la bNOS están presentes también en el genoma de numerosas especies de bacterias del suelo no patógenas (Gusarov *et al.*, 2008).

La producción de NO por bNOS se ha demostrado que también está implicada en la resistencia a antibióticos (Gusarov *et al.*, 2009). Para lo cual el NO produce modificaciones químicas en estos compuestos tóxicos para inactivarlos, y adicionalmente mitiga el estrés oxidativo que causan muchos antibióticos

bacteriocidas, como los lactámicos, aminoglucósidos y quinolonas (Kohanski *et al.*, 2007).

Aún no se ha demostrado que las bNOS pudieran tener una función similar a las eucariotas como inhibidoras del crecimiento de otras especies bacterianas presentes en el mismo medio (revisado por Stern & Zhu, 2014), por otro lado, debido a su importancia en la resistencia de patógenos contra antibióticos y a la acción del sistema inmune, la inhibición de esta enzima puede constituir una efectiva intervención antibacteriana (Gusarov *et al.*, 2009).

2.3.1.2.2. Nitrato reductasas de molibdeno

Durante algunos años, la formación de NO a partir de nitrito se asumía que se producía, además de por las NiR respiratorias, por una actividad alternativa de la NiR asimilativa (NirDB) que contiene sirohemo, y la NiR desasimilativa con hemo c (NrfA), que catalizan la reducción de nitrito a amonio. De hecho, estudios con mutantes de *E. coli* parecían indicar que tanto NirDB como NrfA eran las principales responsables de esa formación de NO (Corker & Poole, 2003, Weiss, 2006). Sin embargo, no se observó la formación de NO por estas enzimas purificadas, y por el contrario, ambas enzimas se propusieron como catalizadoras del consumo de NO, como parte de las rutas de destoxicación del NO (Coleman *et al.*, 1978, Vine & Cole, 2011). Actualmente, la mayor fuente no respiratoria de NO dependiente de nitrito se cree que procede de las molibdoenzimas nitrato reductasas (NR).

En procariontes el nitrato es reducido tanto en rutas asimilativas como desasimilativas, para ello estos organismos contienen tres tipos de enzimas NR, distribuidas en diferentes localizaciones subcelulares (revisado por Maia *et al.*, 2015). En primer lugar, las NR respiratorias unidas a membrana (Nar), asociadas a la generación de la fuerza protón-motriz a través de la membrana citoplasmática, en segundo lugar la NR periplásmica (Nap), involucrada también en la generación de fuerza protón-motriz o también como sumidero de electrones para eliminar el exceso de equivalentes reductores (ver apartado 2.3.1.1.1), y por último la NR asimilativa citoplasmática (Nas), implicada en la asimilación del nitrato. Nar, Nap y Nas son molibdoenzimas, pertenecientes a la familia DMSOR (dimetilsulfóxido reductasa) las cuales catalizan la

reducción con dos electrones del nitrato a nitrito en sus centros de molibdeno. A pesar de catalizar la misma reacción y tener un átomo de molibdeno en su centro activo coordinado con cuatro átomos de azufre de dos cofactores piranopterina, los tres tipos de NR presentan diferencias significativas en torno a sus centros activos, sus papeles biológicos diferentes y sus localizaciones subcelulares. Además, estas enzimas también presentan diferencias en su composición de subunidades y en su estructura cuaternaria. Por ejemplo, la enzima respiratoria NarGHI de *E. coli* es un heterotrímero ($\alpha\beta\gamma$)₂, donde la subunidad NarG contiene el centro activo hacia el citoplasma junto a un centro [4Fe-4S], NarH transfiere electrones al centro activo y contiene un centro [3Fe-4S] y tres [4Fe-4S] y NarI que está unida a la membrana y es una quinol-oxidasa con dos grupos hemo-*b* (Jormakka *et al.*, 2004, Bertero *et al.*, 2005). Por otro lado, la NR periplásmica de *Cupriavidus necator* es un dímero NapAB que contiene además dos grupos hemo (Coelho *et al.*, 2011), mientras que esta enzima en *Desulfovibrio desulfuricans* es un monómero, NapA, y contiene únicamente un centro [4Fe-4S] junto a su centro de molibdeno (Dias *et al.*, 1999, Najmudin *et al.*, 2008). En cuanto a la Nas, en *Pa. denitrificans* presenta una única subunidad, NasC, con un centro [4Fe-4S] y posiblemente otro [2Fe-2S] en la región C-terminal (Gates *et al.*, 2011),

Varios estudios sugieren que la generación de NO por estas enzimas es debida a la reducción del nitrito por las mismas siendo la mayor responsable la NR unida a membrana (revisado por Maia & Moura, 2015). De hecho, se ha propuesto que la reducción de nitrito por Nar es la principal fuente de NO tanto para *E. coli* como para *Sa. Typhimurium*. También se ha descrito la contribución en la formación de NO por parte de la Nap periplásmica, aunque mucho menor que la de Nar (<3%) (Gilberthorpe & Poole, 2008, Vine *et al.*, 2011, Rowley *et al.*, 2012). Sin embargo, El potencial de la NR asimilativa citoplasmática como fuente de NO aún no ha sido investigado, aunque la viabilidad para catalizar la reducción de nitrito en NO ya se demostró en un estudio teórico (Kelker & Filner, 1971).

Ya que al parecer los tres tipos de molibdoenzimas NRs pueden catalizar la reducción del nitrito a NO, se sugiere que la química de esta reacción no se debe afectar por las diferencias estructurales de los diferentes centros activos de molibdeno de cada familia, aunque sí varían en su cinética de reacción. Para catalizar la reducción del

nitrito a NO, las molibdoenzimas tienen que unirse al nitrito y transferirle un electrón para romper uno de los enlaces N-O y por último liberar el NO generado. Para llevar a cabo esta reacción, primero el molibdeno se reduce por un substrato reductor como el NADH (revisado por Maia & Moura, 2011, Maia & Moura, 2014). El nitrito se uniría al átomo de molibdeno por uno de sus átomos de oxígeno, gracias a la fuerte apetencia del molibdeno por moléculas oxidadas, sin embargo, ésta se pierde rápidamente por los átomos de oxígeno sencillos (Burgmayer & Stiefel, 1985), hecho que hace a los centros de molibdeno unos excelentes catalizadores de intercambio de átomos de oxígeno cuando las condiciones termodinámicas son favorables (Harlan *et al.*, 1986). A continuación, el molibdeno reducido, Mo^{4+} , transfiere un electrón al nitrito para generar el NO oxidándose el molibdeno hasta Mo^{5+} (Ji & Hollocher, 1988). Los residuos responsables de la reducción del átomo de Mo no han sido aún identificados, sin embargo, se sugiere que un glutamato conservado en el centro activo es esencial para la reducción del nitrito (Maia *et al.*, 2014). Apoyando esta hipótesis hay que tener en cuenta que la localización y orientación de este residuo de glutamato es idóneo para esta acción (Maia & Moura, 2015). Ensayos de espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (EPR) han demostrado que el centro de molibdeno de la xantina oxidasa de mamíferos o la aldehído oxidoreductasa de *Desulfovibrio gigas* se oxidan en presencia de nitrito y simultáneamente se genera NO (Maia & Moura, 2014).

La formación *in vivo* de NO por enzimas NR podría depender de varios factores como anaerobiosis, deficiencias de nitrato y acumulaciones de nitrito, lo cual no sólo puede provocar esta reacción sino que también induce la expresión de esta enzima (Einsle & Kroneck, 2004, Gilberthorpe & Poole, 2008, Rowley *et al.*, 2012), al igual que ocurre en NR vegetales, donde el nitrato inhibe competitivamente la reducción del nitrito, y solamente se promueve cuando la concentración de nitrato desciende y la de nitrito asciende a niveles milimolares. Si tanto el nitrato como el nitrito están presentes a concentraciones bajas, del orden de micromolar, la expresión de la NarG se reprime y la formación de NO es muy baja (Rowley *et al.*, 2012). Sin embargo, la capacidad de los procariontes para producir NO parece depender del organismo, y posiblemente del papel que tiene el NO para este organismo. Por ejemplo, mientras que la generación de NO en *E. coli* se estima que está por debajo del 1% del nitrato reducido (Calmels *et*

al., 1988, Vine & Cole, 2011, Rowley *et al.*, 2012), en *Sa. Typhimurium* puede llegar hasta el 20% (Rowley *et al.*, 2012).

2.3.2. Destoxificación de NO

Las bacterias utilizan múltiples sistemas para eliminar el NO en los cuales existen una gran variedad de enzimas implicadas. La mayoría de estos sistemas funcionan atrapando directamente al NO y transformándolo en una molécula nitrogenada menos reactiva, tal como el nitrato, amonio u óxido nitroso. Sin embargo, otros funcionan de forma indirecta a nivel fisiológico, promoviendo la resistencia a los efectos tóxicos del NO o reparando los daños causados. A continuación, se detalla la información disponible sobre las proteínas implicadas en la destoxificación del NO en bacterias.

2.3.2.1. Hemoglobinas

Las hemoglobinas son posiblemente las proteínas más importantes y mejor estudiadas como sistemas de destoxificación de NO. En procariontas se diferencian tres tipos de hemoglobinas: flavohemoglobinas (fHb), hemoglobinas de dominio único (sdHb) y hemoglobinas truncadas (tHb) (Figura 2.5; revisado por Poole, 2005).

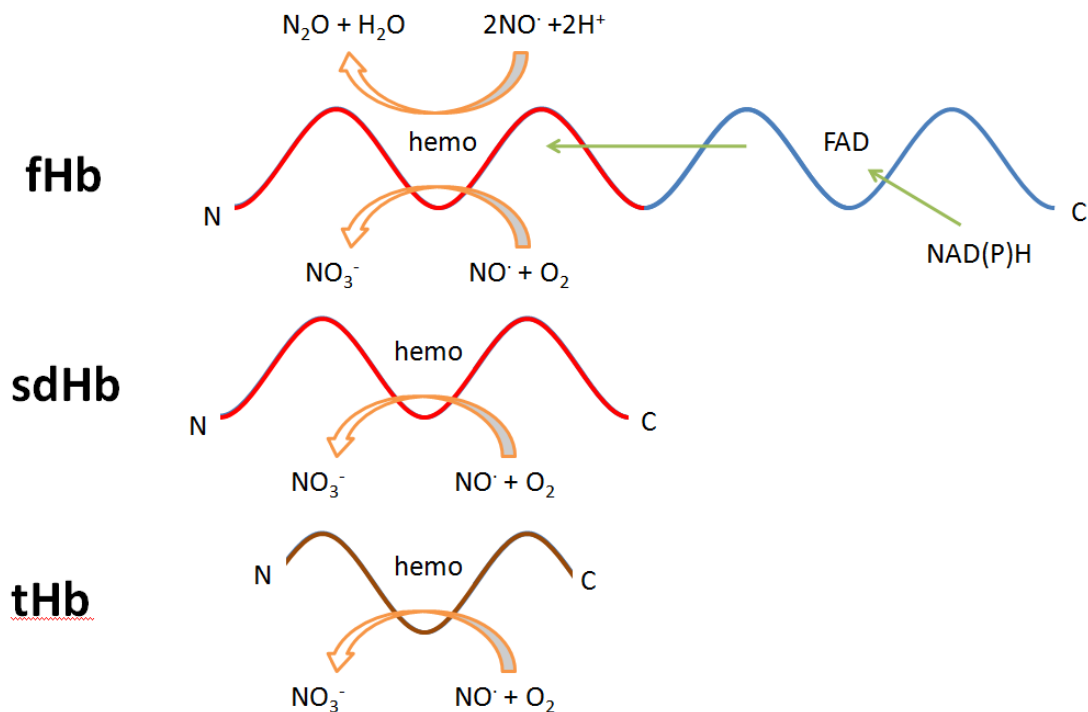


Figura 2.5. **Dominios estructurales de las tres clases de Hb bacterianas.** Rojo, dominio globina; azul, dominio reductasa; marrón, dominio de globina truncada (Poole, 2005).

2.3.2.1.1. Flavohemoglobinas

Las hemoglobinas bacterianas mejor estudiadas son las flavohemoglobinas, teniendo como principal representante la Hmp de *E. coli*. La implicación de la Hmp en la resistencia a estrés nitrosativo se sospechó al comprobar que el promotor del gen *hmp* responsable de su síntesis, en *E. coli*, se inducía fuertemente en presencia de pequeñas cantidades de NO o especies relacionadas como el SNP (nitroprusiato sódico), GSNO (S-nitrosoglutatión) o nitrito (Poole *et al.*, 1996). Posteriormente, se demostró que cepas de *E. coli* que carecían de este gen eran hipersensibles al NO, y adicionalmente se verificó que la proteína Hmp purificada tenía la capacidad de transformar el NO a nitrato (Gardner *et al.*, 1998).

Estructuralmente las Hmp son proteínas monoméricas de unos 44 kDa que contienen tres dominios, un dominio globina, el cual contiene un grupo hemo *b* en el centro activo, un dominio oxidorreductasa, que recibe los electrones desde el NADH, y un dominio de unión a FAD, el cual transfiere los electrones al centro activo hemo a través del grupo FAD (Figura 2.5). Los dos últimos dominios están agrupados frecuentemente y se les denomina como el dominio flavorreductasa (Hernandez-Urzua *et al.*, 2003, Wu *et al.*, 2003).

En cuanto al mecanismo de acción de Hmp para la eliminación de NO se diferencian dos vías dependiendo de la disponibilidad de O₂. En condiciones aeróbicas, la Hmp transforma el NO en el inofensivo ion NO₃⁻, mediante la siguiente reacción estequiométrica; $2\text{NO} + 2\text{O}_2 + \text{NAD(P)H}^- \rightarrow 2\text{NO}_3^- + \text{NAD(P)} + \text{H}^+$. Clásicamente se ha pensado que el mecanismo de reacción era una dioxigenación, para lo cual el oxígeno reaccionaría con el grupo hemo en estado ferroso para luego reaccionar con el NO y así formar NO₃⁻ (Gardner *et al.*, 1998). Sin embargo, a las concentraciones fisiológicas a las que se encuentra el NO y el O₂ en el interior celular, el grupo hemo de la Hmp se une con mucha mayor afinidad por el NO que por el O₂, por lo que actualmente se acepta que el hemo se nitrosila primero, y este grupo nitrosilo (NO[•]) reacciona directamente con el O₂ para generar nitrato en una reacción llamada nitrosilación o denitrosilación, reacción opuesta a la dioxigenación en la que la forma oxidada del hemo se genera primero (Hausladen *et al.*, 2001). En condiciones de ausencia de oxígeno, se ha observado que la enzima Hmp es capaz de reducir NO a

N₂O anaeróticamente (Kim *et al.*, 1999). En estas condiciones el grupo nitrosilo unido al hemo de la Hmp se disocia, dimeriza y forma el N₂O, en un proceso de reducción. En ambos casos (denitrosilación y reducción), se requiere la formación de NO⁻ en el sitio activo de la Hmp, por lo que, ambos procesos ocurren gracias a la transferencia de un electrón desde los átomos de hierro ferroso del hemo al NO, pasando éste a hierro férrico. El estado ferroso del hemo se regenera por la transferencia de un electrón desde el dominio oxidorreductor de la proteína, el cual transfiere un electrón desde el NAD(P)H, al FAD y finalmente al hemo férrico del dominio globina (Stern & Zhu, 2014).

2.3.2.1.2. Hemoglobinas de dominio único

Las hemoglobinas de dominio único (sdHb) se parecen a las flavohemoglobinas pero carecen de los dominios oxidorreductasa y FAD, conteniendo únicamente un dominio globina con un grupo hemo *b* (Figura 2.5). La primera hemoglobina de este tipo en ser identificada y secuenciada fue la hemoglobina de *Vitreoscilla* (Vgb), cuya presencia se incrementa bajo condiciones microaeróbicas. Estas proteínas, al carecer de un dominio flavorreductasa, tienen que interactuar directamente con una oxidasa terminal, para regenerar el estado ferroso, por esta razón inicialmente se pensó que su función podría ser facilitar la utilización del oxígeno por la bacteria (Poole, 2005). Se empezó a atribuir a estas sdHb una función de detoxificación de NO cuando al expresar la proteína Vgb en un organismo heterólogo, ésta confería cierta protección al estrés nitrosativo (Wu *et al.*, 2003). Estudios llevados a cabo con la sdHb de *C. jejuni* (Cgb) también han desvelado su importancia en la resistencia al NO, ya que una cepa deficiente en Cgb es hipersensible a los agentes nitrosantes, como el GSNO o SNP, y compuestos que liberan NO, como el spermine NONOato. Además, la expresión de *cgb* se induce fuerte y específicamente por la exposición a estrés nitrosativo (Elvers *et al.*, 2004). Actualmente no se conoce con exactitud el mecanismo de acción, ya que no se ha localizado el sistema redox que recicla el hemo ferroso (Tinajero-Trejo *et al.*, 2013).

2.3.2.1.3. Hemoglobinas truncadas

Las hemoglobinas truncadas (tHb) se descubrieron posteriormente, están ampliamente extendidas y son entre 20 a 40 residuos más cortas que las de dominio único. Al igual que las sdHb, las hemoglobinas truncadas carecen del dominio flavorreductasa y únicamente tienen el dominio globina (Figura 2.5), pero se

diferencian en que una vez traducidas son manosiladas y ancladas a la pared celular (Arya *et al.*, 2013).

Estructuralmente presentan 4 hélices α organizadas de dos en dos formando una especie de sándwich. A pesar de que ciertas trHbs suministran O_2 a patógenos, otras están implicadas en la tolerancia a estrés por NO. En *Mycobacterium tuberculosis*, especie en la que la destoxificación de NO es un componente crítico para su virulencia (Chan *et al.*, 1992, Yang *et al.*, 2009), el mecanismo fundamental para tolerar el NO es la hemoglobina truncada HbN (Pathania *et al.*, 2002). En *Mycobacterium bovis*, HbN, protege la respiración aeróbica del efecto del NO e, *in vitro*, esta proteína oxida el NO a nitrato (Ouellet *et al.*, 2002). Adicionalmente, experimentos de expresión heteróloga de HbN en *Mycobacterium smegmatis* y *E. coli*, han demostrado el papel de estas hemoglobinas en la protección ante el NO (Pathania *et al.*, 2002). Se asume que la función *in vivo* de todas las hemoglobinas de dominio único y truncadas expresadas heterológamente dependen de la asociación con una reductasa del hospedador (Poole, 2005).

2.3.2.2. Óxido Nítrico reductasas

En condiciones de bajo oxígeno donde las hemoglobinas son menos activas, las enzimas con mayor relevancia en la eliminación de NO, son las óxido nítrico reductasas desnitrificantes (Nors). Estas enzimas tienen un papel más predominantemente fisiológico que de resistencia a estreses, ya que son un componente más de la ruta de la desnitrificación, pero, su papel en resistencia a estrés nitrosativo, tanto endógeno como exógeno, está demostrado (Anjum *et al.*, 2002, Mesa *et al.*, 2002, Wang *et al.*, 2011). Las Nors catalizan la reducción de NO a N_2O en la cara externa de la membrana citoplasmática (revisado por Hendriks *et al.*, 2000, Zumft, 2005, Suharti de Vries & Pouvreau, 2007, Richardson, 2011). Actualmente se han caracterizado tres tipos de Nor en bacterias: cNor, qNor y qCu_ANor (revisado por Zumft, 2005). Las Nor mejor conocidas son las cNor, que reciben electrones desde proteínas con citocromos *c*, mientras que las tipo qNor, reciben los electrones de las quinonas. Ambos tipos de Nor pertenecen a la superfamilia de las oxidasas hemo-cobre (HCOs). El centro catalítico para la reducción del NO de las enzimas Nor aloja un grupo activo hemo *b*::FeB dinuclear, que es reducido por otro grupo hemo *b* que se encuentra unido en la misma

subunidad (Daskalakis *et al.*, 2015). En las enzimas cNor, la subunidad catalítica NorB recibe electrones desde un citocromo hemo *c* de la subunidad NorC, sin embargo, las qNor son monómeros que reaccionan directamente con las quinonas.

Las enzimas cNor han sido bien caracterizadas en los organismos *Pa. denitrificans*, *Ps. stutzeri* y *Ps. aeruginosa*. Las subunidades estructurales, NorCB, están codificadas por los genes *norCB*, los cuales se cotranscriben con los genes accesorios *norD* y *norQ*, y eventualmente con los genes *norE* y *norF* (Zumft, 2005), y en los órdenes *Thermales* y *Aquificales* con el gen *norH*, importante para una eficiente desnitrificación (Bricio *et al.*, 2014). Las proteínas NorD y NorE son proteínas de membrana implicadas en el correcto ensamblaje del complejo NorCB (Butland *et al.*, 2001), además, NorE pertenece a una familia de citocromos *c* oxidasas, y la mutación de los genes *norE* y *norF* disminuye la actividad NO reductasa en *Pa. denitrificans* y *R. sphaeroides* (de Boer *et al.*, 1996, Hartsock & Shapleigh, 2010), y aunque, no son esenciales para la actividad Nor, son importantes bajo condiciones donde la actividad Nir endógena genera una prolongada exposición a NO (Bergaust *et al.*, 2014). Estructuralmente, el complejo NorBC de *Ps. aeruginosa* contiene 12 α -hélices transmembrana de la subunidad NorB, mientras que NorC se ancla a la membrana por un único segmento transmembrana (Hino *et al.*, 2010). Bioquímicamente, los protones necesarios para la reducción del NO son transferidos desde el lado periplásmico de la membrana (Bell *et al.*, 1992, ter Beek *et al.*, 2013). Adicionalmente, estudios de cristalografía de la cNor de *Ps. aeruginosa* demuestran que la estructura de NorB no presenta ningún canal de protones transmembrana, a diferencia de las HCOs translocadoras de protones, por lo que, esta enzima no actúa como bomba de protones y por tanto no se produce conservación de la energía (Hino *et al.*, 2010, Pisljakov *et al.*, 2012, Shiro *et al.*, 2012).

Como se ha comentado más arriba, las enzimas tipo qNor obtienen electrones desde el ubiquinol y menaquinol. Estructuralmente se parecen a la subunidad NorB de la cNor, diferenciándose en una extensión N-terminal con homología a la subunidad NorC, pero sin el motivo de unión a hemo *c*. La cristalización de la qNor de *Geobacillus stearothermophilus* ha revelado poseer un canal acuoso desde el citoplasma que podría funcionar para translocar protones (Matsumoto *et al.*, 2012), por lo que es

posible que la oxidación de quinol acoplada a la reducción de NO por la qNor sea electrogénica.

Un subgrupo inusual de qNor, las qCu_ANor, presente por ejemplo en *Ba. azotoformans*, contienen subunidad NorB en complejo con una subunidad con un sitio Cu_A (típico de óxido-reductasas HCOs), el cual hace a esta enzima capaz de recibir electrones desde el citocromo c₅₅₀ de membrana (Suharti de Vries & Pouvreau, 2007). En contraste, también se ha demostrado que en el género *Bacillus* estas qCu_ANor carecen de actividad oxidasa de menaquinonas, por lo que se sugiere el cambio de nomenclatura de qCu_ANor a Cu_ANor (Al-Attar & de Vries, 2015).

2.3.2.3. Flavorrubredoxinas

Aunque estructuralmente y mecánicamente son muy distintas de las óxido nítrico reductasas desnitrificantes (Nors), las flavorrubredoxinas también catalizan la reducción de NO a N₂O, y son de gran importancia en la destoxicación de NO en condiciones anaeróbicas. La flavorrubredoxina está codificada en muchas bacterias por el gen *norV*. Estas proteínas reciben su nombre debido a que están compuestas por un dominio que contiene un grupo FMN y otro dominio con un centro activo de hierro no hémico homólogo al presente en la familia de proteínas llamadas rubredoxinas (Gomes *et al.*, 2000). Su papel como proteínas destoxicadoras de NO se describió por primera vez en *E. coli*, que a pesar de carecer de la Nor de la desnitrificación, se vio que aún poseía actividad NO reductasa inducible por NO, la cual, era independiente de la Hmp y era sensible a O₂ (Gardner & Gardner, 2002). Los genes responsables para la actividad de esta enzima son *norV* y su compañero de operón *norW*, el cual codifica una oxidorreductasa que transfiere electrones desde el NADH a NorV gracias a su motivo FAD (Gardner *et al.*, 2002). Las cepas de *E. coli* que carecen de NorVW presentan una menor supervivencia en presencia de macrófagos en experimentos *ex vivo* (Baptista *et al.*, 2012), y en *Sa. Typhimurium* se ha visto que tiene un papel coordinado junto a Hmp y NrfA para resistir al NO bajo condiciones cambiantes de oxígeno en el medio (Mills *et al.*, 2008). Esto sugiere su implicación en el proceso de infección, aunque de todos modos esta hipótesis aún no se ha podido confirmar *in vivo* indicando un papel menos relevante de NorV, en comparación con Hmp, durante la patogénesis. Se propone, que debido a la sensibilidad de NorV al oxígeno y al estrés

oxidativo, la aparición de especies como el H_2O_2 durante el proceso inflamatorio puedan disminuir el papel de NorV durante la inflamación (Stern & Zhu, 2014).

2.3.2.4. NrfA

Una proteína que sorprende por su papel en la detoxificación de NO es la nitrito reductasa periplásmica dependiente de citocromo *c*, NrfA, ya descrita en detalle en el apartado 2.3.1.1.3. El papel principal de la NrfA es la reducción de nitrito a amonio con gasto de seis electrones. Este proceso, dependiendo de las circunstancias, puede resultar en un descenso indirecto del NO ambiental al prevenir la descomposición de nitrito debido al pH (Einsle, 2011). El mecanismo de reacción de la NrfA, como ya se ha descrito previamente, se piensa que ocurre en múltiples etapas involucrando transferencia de electrones desde sus cinco grupos hemo al sustrato, con la formación de NO e NH_2OH como intermediarios. Adicionalmente, el NO y el NH_2OH libres pueden ser directamente reducidos por la NrfA a NH_4^+ , lo que le confiere a esta enzima un papel protector frente a NO.

Una cepa de *E. coli* mutante para *nrfA* sufre una fuerte inhibición del crecimiento en presencia de NO (Poock *et al.*, 2002, Mills *et al.*, 2008), así como en la reducción de NO (Clarke *et al.*, 2008). Además de *E. coli*, la función de NrfA en la resistencia al NO se ha demostrado en las épsilon-proteobacterias *C. jejuni* y *W. succinogenes* (Pittman *et al.*, 2007, Kern *et al.*, 2011).

2.3.2.5. Hcp (Hybrid cluster protein)

La proteína Hcp fue inicialmente llamada prisma al pensar que contenía el grupo prostético del mismo nombre [6Fe-6S], posteriormente se vio que realmente contenía un grupo [4Fe-6S] junto a un inusual grupo [4Fe-2O-2S]. Como NorV, Hcp es frecuentemente codificada junto a una oxidorreductasa, Hcr, la cual regenera el estado redox del sitio activo (van den Berg *et al.*, 2000). Se pensó que podía tener un papel en la tolerancia a NO debido a que es controlado por un regulador transcripcional sensible a NO. En *Desulfovibrio vulgaris*, por ejemplo, una cepa carente de *hcp* es hipersensible a NO, y la delección de este gen junto a *nsrR* y *hmp* en *Sa. Typhimurium* provoca un retraso en el consumo de O_2 y NO (Figueiredo *et al.*, 2013). En cepas mutantes *hcp* de *E. coli* y *Clostridium perfringens* se han descrito defectos leves del

crecimiento en presencia únicamente de estrés por peróxidos, sugiriendo una función más amplia de Hcp más allá del estrés por NO (Briolat & Reysset, 2002, Almeida *et al.*, 2006). También, se ha sugerido un papel específico de Hcp en la detoxificación de NH_2OH , que es intermediario en la reducción del NO_2^- y NO a NH_4^+ por la NrfA. De hecho, la Hcp purificada de *E. coli* (Wolfe *et al.*, 2002) y *R. capsulatus* (Cabello *et al.*, 2004) poseen actividad hidroxilamina reductasa, y la sobreexpresión de *hcp* de *R. capsulatus* en *E. coli* permite que esta bacteria pueda crecer con NH_2OH (Cabello *et al.*, 2004).

2.3.2.6. Otros sistemas para detoxificar NO

Aunque la gran mayoría de los genes de respuesta a NO que han sido estudiados están implicados directamente en la eliminación de NO o RNS, existen otra serie de mecanismos importantes en la resistencia a NO sin que lo eliminen del medio. Un ejemplo es la proteína YtfE. Ésta fue la primera proteína con importancia en la resistencia al NO en condiciones anaeróbicas descrita en *E. coli* (Justino *et al.*, 2005). Esta proteína actúa reparando los grupos Fe-S dañados de proteínas como la fumarasa o la aconitasa, los cuales son sensibles al daño por NO. Una cepa mutante en *ytfE* se hace hipersensible al NO, y la enzima YtfE purificada tiene la capacidad de restaurar la funcionalidad de los grupos Fe-S dañados (Justino *et al.*, 2007).

Junto con YtfE, otros dos factores que parecen también reparar el daño de los grupos Fe-S generados por NO son DnrN en *Neisseria gonorrhoeae* y ScdA en *St. aureus*. ScdA es capaz de complementar las deficiencias que se generan al delecionar *ytfE* en *E. coli*, lo que indica que la reparación de grupos Fe-S es un importante y ampliamente distribuido mecanismo de resistencia a NO (Overton *et al.*, 2008).

Otra proteína relacionada con la función de reparación de grupos Fe-S es NnrS. Esta proteína de membrana dependiente de hemo-cobre, se le ha atribuido un papel importante en la tolerancia a NO en *Vibrio cholerae*, aunque su mecanismo de acción aún no se conoce. NnrS parece proteger preferentemente proteínas con grupos Fe-S como la aconitasa de la inhibición por NO (Stern *et al.*, 2013). El papel de NnrS en la detoxificación de NO ha sido recientemente demostrado en *Ensifer meliloti* tanto en

vida libre como asociado simbióticamente con *Medicago truncatula* (Blanquet *et al.*, 2015).

2.3.3. Regulación en respuesta a NO

Debido a la elevada toxicidad y reactividad del NO, las bacterias han desarrollado complejas cascadas de regulación que tras detectar el NO desencadenan una respuesta reguladora para eliminarlo o tolerarlo. Muchas de las proteínas que componen estas cascadas de regulación en respuesta a NO se encuentran conservadas en distanciados grupos filogenéticos (Rodionov *et al.*, 2005). El modo de detección del NO por estas proteínas se debe a las modificaciones conformacionales que ocurren al formarse un complejo de NO con los átomos de hierro que tienen todas estas proteínas en sus centros sensores, lo que desencadena la respuesta en la regulación génica. La mayoría de reguladores de respuesta a NO contienen un grupo [4Fe-4S] para detectarlo, aunque otros reguladores, se basan en diferentes mecanismos, también dependientes de hierro, como grupos hemo, diferentes grupos Fe-S o átomos de hierro no hémicos. Por otro lado, la respuesta a NO no se limita al estrés nitrosativo, sino que esta molécula interviene también en la regulación de otros procesos importantes del metabolismo bacteriano como son el metabolismo del hierro o en procesos de respiración anaeróbica como es el caso de la desnitrificación (revisado en Stern & Zhu, 2014).

A continuación, se enumeran los reguladores implicados en la respuesta a NO mejor estudiados en bacterias.

2.3.3.1. Reguladores de respuesta a NO

2.3.3.1.1. NnrR y DNR

Las proteínas NnrR (de sus siglas en inglés, Nitrite and nitric oxide reductase Regulator) y DNR (Dissimilative Nitrate Respiration regulator), aunque puntualmente pueden regular genes implicados en diferentes rutas metabólicas como la síntesis de hemo (Rompf *et al.*, 1998, Arai *et al.*, 2013), fundamentalmente se limitan a regular los genes de la desnitrificación *nir* y *nor* (Rodionov *et al.*, 2005, Trunk *et al.*, 2010, Arai *et al.*, 2013). Estas proteínas son miembros de la familia de reguladores transcripcionales tipo CRP/FNR y tienen la capacidad tanto de detectar como de traducir la señal del NO

a la expresión de ciertos genes (Fleischhacker & Kiley, 2011). NnrR y DNR fueron descritas por primera vez como reguladores sensibles a NO, NnrR en *R. sphaeroides* (Kwiatkowski & Shapleigh, 1996, Tosques *et al.*, 1996) y *Bradyrhizobium diazoefficiens* (Mesa *et al.*, 2003) y DNR en *Ps. aeruginosa* (Arai *et al.*, 1995). El mecanismo de acción de estas proteínas no está claro aún, DNR se ha podido cristalizar, pero únicamente sin grupo prostético (Giardina *et al.*, 2008, Giardina *et al.*, 2009), de todos modos, los datos obtenidos sugieren que es más probable que esta proteína contenga un grupo hemo en lugar de un grupo Fe-S o un hierro no hémico. Es más, se ha visto que DNR es capaz de unir hemo en experimentos *in vitro* (Rinaldo *et al.*, 2012), y mutaciones en las rutas de síntesis de hemo reducen la capacidad de DNR para activar la transcripción de los genes *nor* (Castiglione *et al.*, 2009).

Para el caso de NnrR, se ha demostrado que su actividad *in vivo* se induce por fuentes de NO, tanto fisiológicas, nitrato o nitrito, como artificiales, SNP (Van Spanning *et al.*, 1999, Hutchings & Spiro, 2000). NnrR es altamente sensible a la oxidación, posiblemente por la interacción directa con el oxígeno, lo que provoca una rápida inactivación. En condiciones anaeróbicas, NnrR modula su actividad dependiendo de la cantidad de NO que detecta en el medio. Al igual que con DNR, la mutación de la ruta de síntesis de hemo provoca un déficit de actividad de NnrR en *E. coli* (Lee *et al.*, 2006).

2.3.3.1.2. NorR

NorR fue uno de los primeros reguladores transcripcionales de respuesta a NO en ser descrito. Se identificó por primera vez en *Ralstonia eutropha*, donde *norR* se localiza al lado del gen que codifica para la qNor, *norB* (Busch *et al.*, 2005). NorR forma parte de la familia de reguladores transcripcionales tipo EBP (de sus siglas en inglés, enhancer-binding protein), y activan la expresión de promotores dependientes de σ^{54} (Bush & Dixon, 2012). En estos promotores, a diferencia de los dependientes de σ^{70} , se requiere la activación del factor σ^{54} con hidrólisis de ATP por una enzima EBP, esto permite la apertura de las hebras de ADN y la transcripción. Normalmente, estos reguladores contienen un dominio que regula la actividad ATPasa por la unión de un ligando de forma reversible, que en el caso de NorR es NO. En este dominio, NorR contiene un centro de hierro no hémico que en presencia de NO forma un complejo de hierro mononitrosilado que provoca la hidrólisis de ATP (Bush *et al.*, 2010). NorR se

une a la pequeña secuencia consenso GT-N₇-AC, para controlar la expresión de genes como *norVW* en *E. coli*, donde necesita hasta tres copias de esta secuencia consenso para su unión a ADN (Tucker *et al.*, 2010).

2.3.3.1.3. NsrR

NsrR es otro, bien conocido, regulador transcripcional de respuesta a NO para la expresión de genes implicados en la tolerancia a NO. NsrR fue descrito por primera vez como un regulador de los genes de la desnitrificación en *Nitrosomonas europaea* (Beaumont *et al.*, 2004), posteriormente se le atribuyó un importante papel en la regulación de genes de respuesta a NO en *E. coli* como son *hmp*, *ytfE* (Bodenmiller & Spiro, 2006), *hcp-hcr* y *nrf* (Filenko *et al.*, 2007).

NsrR actúa como represor y su delección resulta en la expresión constitutiva de los genes a los que regula. El sitio de unión de NsrR a ADN se ha descrito como dos secuencias de 11 nucleótidos ricas en A y T que forman un palíndromo. La fuerza con la que NsrR reprime la expresión de un promotor puede estar modulada por la afinidad con la que se une a su secuencia consenso (Chhabra & Spiro, 2015). NsrR contiene grupos Fe-S para detectar el NO, [2Fe-2S] en el caso de *Streptomyces coelicolor* (Tucker *et al.*, 2008) o *N. gonorrhoeae* (Isabella *et al.*, 2009) y [4Fe-4S] en *Ba. subtilis* (Yukl *et al.*, 2008). El NO al unirse al grupo Fe-S provoca la separación de NsrR de su secuencia consenso de ADN del promotor al que está regulando, permitiendo así la activación de la transcripción. En *E. coli* NsrR modula la expresión de *hmp* y el operón *nrf* donde se incluye la nitrito reductasa NrfA (Filenko *et al.*, 2007), y en bacterias desnitrificantes que carecen de NnrR, suple su papel coordinando la expresión de los genes *nor* y *nir* (Tucker *et al.*, 2010).

2.3.3.2. Otros reguladores implicados en estrés nitrosativo

Hay otros muchos reguladores transcripcionales implicados en la respuesta a estrés nitrosativo que no son sensores directos de NO (NssR, HcpR, entre otros) o que están implicados en otros aspectos importantes de la fisiología bacteriana como son el metabolismo del hierro (Fur) o metabolismo respiratorio (FNR).

NssR (de sus siglas en inglés, Nitrosative stress-sensing Regulator) es miembro de la familia de reguladores CRP/FNR. Esta proteína ha sido estudiada en *C. jejuni* donde

controla la expresión de la Cgb (Elvers *et al.*, 2005) y en *W. succinogenes* activando la expresión de genes de detoxificación de NO (*nrf*) y desnitrificación (*nap*, *nos*) (Kern & Simon, 2016). NssR actúa como activador y a diferencia de otros reguladores, el NO al unirse a NssR no parece afectar a su afinidad para unirse al ADN (Smith *et al.*, 2011), lo que sugiere un mecanismo de acción para regular sus genes diana diferente a los descritos anteriormente.

La proteína HcpR, también miembro de la familia CRP/FNR, fue descrita por primera vez como un posible regulador del gen *hcp* y genes implicados en la reducción de sulfato y nitrato, en un estudio *in silico* de bacterias sulforreductoras (Rodionov *et al.*, 2004, Rodionov *et al.*, 2005). Al gen *hcp* se le ha asignado un papel para la tolerancia del estrés nitrosativo, este regulador actúa como activador de la transcripción en respuesta a NO, sin embargo, el mecanismo de acción permanece desconocido y no se ha encontrado ningún ligando que se le una.

FNR (de sus siglas en inglés, Fumarate and Nitrate Reductase) es una de las proteínas que da nombre a la familia de reguladores CRP/FNR. Controla la actividad de más de 100 promotores y es fundamental para la transición entre el metabolismo aeróbico y anaeróbico, regulando genes involucrados en la utilización del carbono, el uso de aceptores alternativos de electrones o la síntesis de nucleótidos, entre otros (Constantinidou *et al.*, 2006, Grainger *et al.*, 2007). También, controla varios de los genes clave implicados en la tolerancia a NO como son *hcp* y *hmp* (Cruz-Ramos *et al.*, 2002, Corker & Poole, 2003). La implicación de FNR en el control del estrés nitrosativo es debido a que en las condiciones en las que FNR es activo, ausencia de oxígeno, ocurre la respiración de nitrato y nitrito, procesos que son importantes fuentes de NO. De hecho, se conoce la capacidad de la proteína FNR de responder a concentraciones fisiológicas de NO e inducir la expresión del gen *hmp* implicado en la síntesis de la flavohemoglobina (Cruz-Ramos *et al.*, 2002). Estudios recientes han demostrado la capacidad de los grupos [4Fe-4S] de FNR de reaccionar con el NO (Crack *et al.*, 2013).

Para el caso de Fur, regulador transcripcional dependiente de hierro, a pesar de tener un papel muy definido como regulador para la asimilación de hierro, también se ha demostrado su implicación en la respuesta a NO. Fur es un conservado regulador que

promueve la asimilación de hierro cuando la concentración de hierro intracelular baja. El hierro no hémico de su dominio sensor se pierde provocando la separación de la proteína del ADN y permitiendo así la transcripción de los genes para la importación de hierro. Pero no únicamente se une a genes implicados en la asimilación de hierro, en *Sa. Typhimurium* se ha visto que también se une al promotor del gen *hmp* (Crawford & Goldberg, 1998). Además, *hmp* y otros genes de respuesta a NO son altamente dependientes de la presencia o ausencia de Fur y del efecto de la quelación del hierro o del estado del hierro de la célula en general (Mukhopadhyay *et al.*, 2004). Fur detecta directamente el NO, sus átomos de hierro ferroso reaccionan con él formándose un complejo DNIC, lo que provoca la separación de Fur del ADN (D'Autreaux *et al.*, 2004).

2.4. Metabolismo de NO en rizobios

2.4.1. Simbiosis Rhizobium-Leguminosa

Leguminosae constituye la tercera familia con mayor diversidad de especies, incluyendo especies tan importantes en nutrición humana y animal como la soja, alubias, guisantes, lentejas, cacahuetes o las forrajeras alfalfa y trébol. La soja es la leguminosa más cultivada globalmente, debido a que contiene un 40% de proteína, el 21% en grasa y una alta concentración de isoflavonas en sus semillas. De hecho, los cultivos de soja contribuyen en un 77% del total del N₂ fijado en suelos de cultivo (16,4 Tg de N fijado), y un 11% de N₂ biológicamente fijado en el planeta (Herridge *et al.*, 2008).

Las leguminosas son también ampliamente conocidas por su habilidad de establecer asociaciones simbióticas con bacterias del suelo capaces de fijar N₂, conocidas globalmente como rizobios. Para la formación de la simbiosis, se produce un intercambio de señales moleculares entre los dos simbioses que conduce a la formación del nódulo, una estructura especializada donde la fijación de nitrógeno se lleva a cabo. En la simbiosis, la planta suministra sacarosa a las células hospedadoras de los rizobios, en la célula vegetal la sacarosa se transforma a ácidos dicarboxílicos que son suministrados a los bacteroides, las formas diferenciadas del rizobio, para producir la energía requerida para fijar nitrógeno atmosférico a amonio por la enzima

nitrogenasa, el cual es asimilado hasta amidas o ureidos (revisado por Graham & Vance, 2003, Udvardi & Poole, 2013).

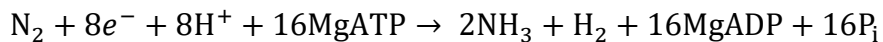
B. diazoefficiens es la especie más ampliamente empleada en inoculantes comerciales para cultivos de soja. *B. diazoefficiens* ocupa dos nichos distintos: el suelo en vida libre y en asociación simbiótica con *Glycine max* (soja), *Macroptilium atropurpureum* (siratro), *Vigna unguiculata* (caupi) y *Vigna radiata* (soja verde) (Göttfert *et al.*, 1990). *B. diazoefficiens* USDA 110, que fue aislada originalmente de nódulos de soja en Florida, Estados Unidos en 1957, ha sido universalmente empleada para investigación de su genética molecular, fisiología y ecología. El genoma de *B. diazoefficiens* USDA 110 está compuesto de un único cromosoma circular de unos 9,1 millones de pares de bases de longitud, no contiene plásmidos, pero sí presenta una región de 410 kb donde se concentran grupos de genes implicados en la fijación biológica del N₂ que se ha denominado isla simbiótica (Kaneko *et al.*, 2002). Hasta 2013, *B. diazoefficiens* USDA 110 se clasificó dentro de la especie *Bradyrhizobium japonicum*, cuya especie tipo es la USDA 6, sin embargo, diferencias morfofisiológicas, genéticas y genómicas entre ambas dio lugar a la reclasificación como *B. diazoefficiens* USDA 110 (Delamuta *et al.*, 2013).

La formación del nódulo depende de la planta hospedadora, y se pueden agrupar dentro de dos grupos, atendiendo a su estructura y morfología. El primer tipo son nódulos indeterminados, presentes en plantas de guisante, alfalfa o haba. Este tipo de nódulo presenta un meristemo persistente y secciones longitudinales bien diferenciadas según su grado de maduración. El segundo tipo de nódulos son determinados, se encuentran en plantas como la soja o la alubia y tienen forma globular. Estos nódulos poseen una zona central formada por células infectadas y sin infectar, luego una corteza interior de células pequeñas con espacios intercelulares grandes, rodeada por una capa de células estrechamente empaquetadas, la corteza exterior es de células grandes laxamente empaquetadas y grandes espacios intercelulares, y a veces están rodeados por una peridermis. El rizobio dentro de las células del nódulo se diferencia e induce la formación de numerosos sistemas enzimáticos nuevos (como la nitrogenasa o la oxidasa terminal de alta afinidad por oxígeno tipo citocromo *cbb₃*) y frecuentemente también cambia morfológicamente

convirtiéndose en células más grandes y extendidas. Por todo ello se emplea el término bacteroide para referirse al simbiote intracelular (revisado por Terpolilli *et al.*, 2012).

2.4.2. Nitrogenasa

Durante la diferenciación de la bacteria a bacteroide se produce la inducción de una serie de genes necesarios para la reducción de N_2 a NH_3 , los genes *nif* y *fix*. Los genes *nifH* y *nifDK* codifican el complejo enzimático molibdeno-nitrogenasa de todos los diazotrofos conocidos. Este complejo cataliza la reducción de N_2 a NH_3 con la estequiometría:



Los rizobios poseen la nitrogenasa mejor caracterizada (revisado por Eady *et al.*, 2016), compuesta por un complejo con dos unidades, la mayor, un heterotetrámero NifDK encargado de recibir los electrones desde la unidad menor, un homodímero compuesto por NifH. NifDK contiene el cofactor esencial de hierro-molibdeno [FeMoCo (MoFe₇S₉-homocitrato)] y un grupo [8Fe-7S], mientras el homodímero NifH contiene un grupo [4Fe-4S] y sitios de unión e hidrólisis de MgATP (Rubio & Ludden, 2008). Otro gen *nif* esencial es NifA, un regulador central de la fijación de N_2 en rizobios. Entre los genes *fix*, *fixABCX* son esenciales para la fijación de N_2 en *B. diazoefficiens*, *En. meliloti* o *Az. caulinodans* (Fischer, 1994). Su papel, sin embargo, no está aún claro, aunque se ha postulado que FixABCX podrían facilitar la transferencia de electrones desde el complejo piruvato deshidrogenasa a la nitrogenasa (Scott & Ludwig, 2004).

2.4.3. Control por oxígeno en el nódulo

Debido a que la nitrogenasa se inactiva a concentraciones atmosféricas de O_2 , dentro del nódulo, la tensión de O_2 se debe mantener a niveles de 5 a 30 nM (Appleby, 1984), extremadamente baja en comparación con la concentración de O_2 en la atmósfera (250 μ M). La sensibilidad al O_2 de la nitrogenasa se la confiere la exposición superficial del grupo [4Fe-4S] que está unido a las dos subunidades del dímero de NifH. Como es de esperar, la baja concentración de O_2 es la señal principal para la activación de los genes *nif* y *fix*.

La baja concentración de O₂ en el nódulo es objeto de un delicado equilibrio, teniendo en cuenta que debe de estar en balance con las necesidades de O₂ para sintetizar todo el ATP que demanda la actividad nitrogenasa, pero no llegar a niveles que la inactiven. Estas necesidades antagonistas se cubren gracias a la función de tres sistemas principalmente: i) la barrera de difusión de oxígeno que se compone de una compleja estructura implicada en ocluir el espacio intercelular en la parte media de la corteza, limitando la permeabilidad al O₂ (revisado por Minchin *et al.*, 2008); ii) el uso de leghemoglobina (Lb), un transportador de alta afinidad por O₂ de la planta, que amortigua el O₂ libre en torno a 7-11 nM, suficiente para mantener la respiración del bacteroide (Downie, 2005); iii) la oxidasa terminal *cbb₃* con alta afinidad de O₂ ($K_M = 7$ nM) codificada por los genes *fixNOQP* del bacteroide, que permite la respiración microaeróbica del bacteroide durante la fijación de N₂ (revisado por Delgado *et al.*, 1998; Preisig *et al.*, 1996).

2.4.4. Regulación

La microoxia es un requisito no sólo para la actividad de la nitrogenasa, sino para toda la inducción de la fijación de N₂ y la expresión de los genes relacionados con la simbiosis (*nif* y *fix*) (Fischer, 1994). La detección y la transducción de la “señal de bajo O₂” está mediada por proteínas reguladoras conservadas e integradas en redes propias de cada especie de rizobio (Fischer, 1994, Dixon & Kahn, 2004, Terpolilli *et al.*, 2012). En α -Proteobacteria, los genes *nif* y *fix* son dianas para la activación de su transcripción por la proteína inductora NifA en combinación del factor σ^{54} de la ARN polimerasa (codificado por *rpoN*) (Fischer, 1994, Dixon & Kahn, 2004). A su vez, la transcripción de los genes *nifA* y *fix* en rizobios es predominantemente controlado por el sistema de dos componentes FixL-FixJ de respuesta a O₂, claves en la regulación de la fijación de N₂ (Green *et al.*, 2009). El componente sensor de FixL contiene un dominio PAS (Per-Arnt-Sim), el cual se encuentra en un amplio rango de sensores incluyendo aquellos que responden a oxígeno, potencial redox, voltaje o luz (Taylor & Zhulin, 1999). En respuesta a bajo O₂ FixL se autofosforila, para luego ceder ese grupo fosfato a FixJ, cuya forma fosforilada es activa para unirse a ADN y regular la transcripción de sus genes diana. En presencia de oxígeno, el grupo hemo del dominio PAS de FixL se oxida provocando un cambio conformacional que inhibe su actividad quinasa (Gilles-

Gonzalez & Gonzalez, 2005, Rodgers & Lukat-Rodgers, 2005, Green *et al.*, 2009). FixL puede unir otros ligandos a hemo, como CO y NO, pero éstos no inhiben la actividad quinasa y posiblemente no tengan relevancia fisiológica. Análisis transcriptómicos han revelado que FixL influye sobre un amplio rango de procesos celulares (Bobik *et al.*, 2006, Mesa *et al.*, 2008).

En *B. diazoefficiens* la proteína FixL, a diferencia de otros rizobios, no posee una sección transmembrana y por tanto es una proteína soluble (Gilles-Gonzalez *et al.*, 1994, Rodgers, 1999), además, solamente es necesario un descenso moderado de la concentración de O₂, al 5%, para que se lleve a cabo la autofosforilación de FixL y la consecuente fosforilación de FixJ. La cascada FixLJ en *B. diazoefficiens* utiliza como intermediarios los reguladores tipo CRP/FNR, FixK₂ y FixK₁. El gen *fixK₂* es activado por FixJ y es indirectamente regulado negativamente por su producto (Nellen-Anthamatten *et al.*, 1998, Fernández *et al.*, 2016), a pesar de ello, las concentraciones de FixK₂ no varían significativamente en células crecidas en condiciones óxicas, microóxicas o anóxicas, pero está sujeto a una regulación postraduccional, por proteólisis y por ROS. La oxidación de un residuo único de cisteína cerca del dominio de unión a ADN provoca su inactivación. La regulación postraduccional podría prevenir que genes dependientes de FixK₂ se activen demasiado pronto durante la simbiosis (Mesa *et al.*, 2009). En condiciones microóxicas, FixK₂ controla un gran regulón incluyendo a *fixNOQP*, *fixGHIS*, genes implicados en la biosíntesis de hemo, genes de la desnitrificación (*nap*, *nirK*, *nnrR*), *rpoN₁* (que codifica al factor σ^{54}) y *fixK₁*, entre otros (Nellen-Anthamatten *et al.*, 1998, Mesa *et al.*, 2008). Parte sustancial del regulón de FixK₁ también pertenece, pero regulado opuestamente, al regulón de NifA, interconectándose así las cascadas de FixLJ/FixK₂-FixK₁ y NifA. Es más, los genes dependientes de *nifA* requieren del factor σ^{54} que forma parte del regulón de FixK₂ (Bauer *et al.*, 1998). Esta interconexión podría permitir una adecuada activación de los genes esenciales para la fijación de N₂, cuando la concentración de O₂ baja por debajo del 5%, la cascada FixLJ/FixK₂ se activa y, como parte de la respuesta, reprime la expresión de genes dependientes de NifA vía FixK₁, sin embargo cuando la concentración de O₂ cae a niveles microóxicos, inferiores al 0,5%, la acumulación de

proteína NifA activa es capaz de superar la represión de FixK₁, de este modo se consigue un ajuste fino de los genes de la fijación de N₂ (Mesa *et al.*, 2008).

2.4.5. Desnitrificación en Rizobios. *B. diazoefficiens* como organismo modelo

A pesar de que la presencia de la ruta de la desnitrificación entre los rizobios no es muy común, algunas de las especies de mayor interés agrícola contienen algunos de los genes en su genoma (revisado en Torres *et al.*, 2016). Únicamente, se ha descrito la presencia de todos los genes para la ruta completa de la desnitrificación en *En. Meliloti* (Torres *et al.*, 2011) y *B. diazoefficiens*, y solamente esta última tiene la capacidad de utilizar la desnitrificación para crecer en condiciones anóxicas reduciendo nitrato, proceso ampliamente investigado tanto en condiciones de vida libre como en simbiosis (revisado por Bedmar *et al.*, 2013). En *B. diazoefficiens*, se han aislado y caracterizado los genes de la desnitrificación *napEDABC* (Delgado *et al.*, 2003), *nirK* (Velasco *et al.*, 2001), *norCBQD* (Mesa *et al.*, 2002) y *nosRZDFYLX* (Velasco *et al.*, 2004), que codifican las enzimas nitrato reductasa periplásmica (Nap), nitrito reductasa de cobre (NirK), óxido nítrico reductasa tipo c (cNor) y óxido nitroso reductasa (Nos), respectivamente.

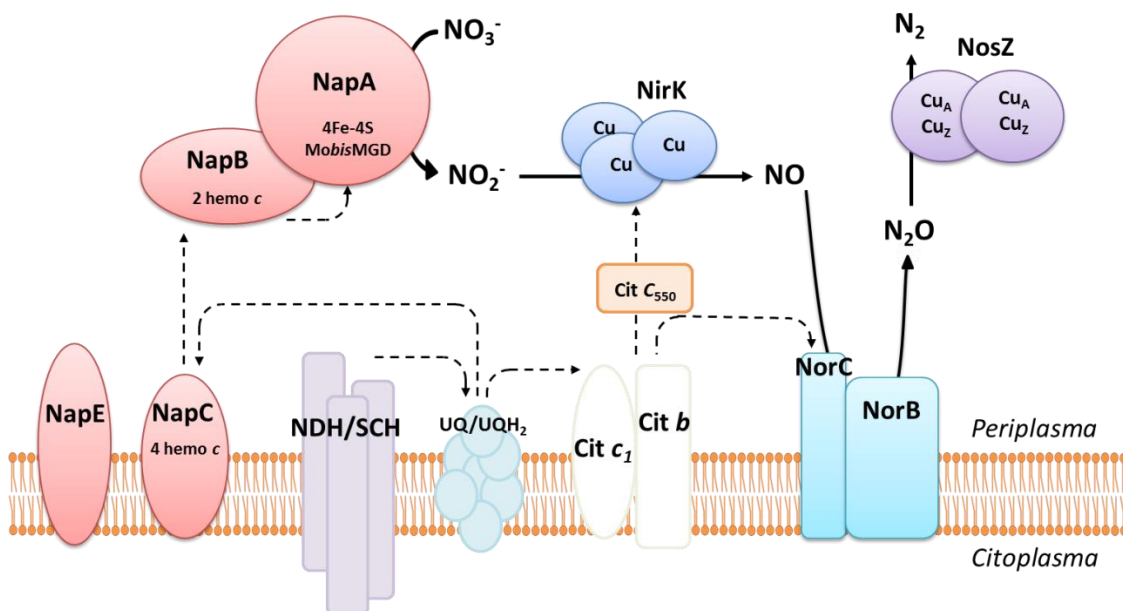


Figura 2.6. Representación esquemática de la ruta de la desnitrificación en *B. diazoefficiens*. UQ, ubiquinona, UQH₂, ubihidroquinona; NDH, NADH deshidrogenasa; SCH, succinato deshidrogenasa. Las líneas discontinuas indican el flujo de electrones. Adaptado de (Bueno *et al.*, 2008).

2.4.5.1. Nitrato reductasa periplásmica

La nitrato reductasa periplásmica (Nap) de *B. diazoefficiens* es codificada en su conjunto por los genes *napE*, *napD*, *napA*, *napB* y *napC*, responsables de la síntesis de proteínas de 7, 12, 95, 17 y 24 kDa, respectivamente. NapA es la subunidad catalítica, contiene un cofactor de molibdopterina y guanina, y un centro [4Fe-4S]. NapB es un citocromo con dos grupos hemo *c* que recibe electrones de NapC, un citocromo de membrana con cuatro grupos hemo *c*. NapE es una proteína transmembrana de función desconocida, y NapD es una proteína soluble que podría participar en la maduración del complejo NapAB (Figura 2.6; Delgado *et al.*, 2003). Una mutación en el gen *napA* da lugar a una cepa que carece de actividad nitrato reductasa periplásmica, por tanto, incapaz de crecer anaeróbicamente con nitrato (Delgado *et al.*, 2003). La secuenciación del genoma de *B. diazoefficiens* (Kaneko *et al.*, 2002) ha confirmado que no posee genes *nar*, responsables de la síntesis de la nitrato reductasa de membrana. Por lo tanto, Nap es la única enzima responsable de la respiración del nitrato y la que inicia la desnitrificación en *B. diazoefficiens* (Delgado *et al.*, 2003).

2.4.5.2. Nitrito reductasa de cobre

En *B. diazoefficiens* se ha identificado el gen *nirK* que codifica una proteína de 34 kDa y cuya identidad con otras nitrito reductasas de tipo Cu oscila entre el 78% de *Alcaligenes faecalis* y el 68% de *R. sphaeroides*. La secuencia en el extremo N-terminal posee el motivo (S/T)RRXFLK característico de metaloproteínas periplásmicas que se exportan mediante el sistema Tat (del inglés, twin arginine translocation). Una cepa deficiente en *nirK* es incapaz de crecer en anaerobiosis con nitrato, careciendo de actividad nitrito reductasa respiratoria y acumulando nitrito en el medio (Velasco *et al.*, 2001). El citocromo soluble *c₅₅₀* de *B. diazoefficiens* es el intermediario en el transporte electrónico entre el complejo *bc₁* y la nitrito reductasa respiratoria NirK (Figura 2.6; Bueno *et al.*, 2008).

2.4.5.3. Óxido Nítrico Reductasa tipo c

La óxido nítrico reductasa tipo c (cNor) de *B. diazoefficiens* es codificada por los genes *nor* que se distribuyen dentro del operón *norCBQD*, que codifica proteínas de 17, 41, 29 y 70 kDa, respectivamente. La secuencia aminoacídica de NorC y NorB presenta entre el 49% y el 85% de identidad, respectivamente, con las enzimas Nor de *Ps.*

stutzeri, *Ps. aeruginosa*, *Pa. denitrificans*, *R. sphaeroides*, *Pseudomonas* sp. G-179 y *Al. faecalis*. NorC es un citocromo *c* asociado a la membrana, capaz de unirse a la proteína NorB que, a su vez, es homóloga a la subunidad I (FixN) de la oxidasa terminal *cbb3* de distintas bacterias. Los productos de los genes *norQ* y *norD* tienen funciones desconocidas, aunque se han implicado en el ensamblaje y maduración de la enzima. Cepas mutantes para los genes *norC* o *norB*, son incapaces de crecer en condiciones desnitrificantes. Bajo estas condiciones, estas mutantes acumulan NO (Mesa *et al.*, 2002).

2.4.5.4. Óxido Nitroso Reductasa

La óxido nitroso reductasa de *B. diazoefficiens* es codificada por los genes *nos* que se agrupan en un operón de siete genes, *nosRZDFYLX*, que codifican proteínas de 85, 72, 49, 33, 28, 19 y 39 kDa, respectivamente. Los seis primeros genes del operón son fundamentales para la reducción de N_2O a N_2 , y prácticamente se encuentran en todos los procariontes con esta capacidad (revisado por Zumft & Körner, 2007). Las proteínas NosZ tienen un alto grado de similitud entre diferentes especies, son homodímeros y actúan como subunidad catalítica en la reducción del N_2O . La estructura de NosZ contiene dos centros de cobre, Cu_A y Cu_Z , actuando este último como sitio de unión del N_2O durante su reducción. Por otro lado, NosR y NosX son flavoproteínas que podrían estar implicadas en el transporte electrónico desde la reserva de quinonas a NosZ. NosDFY constituyen un transportador tipo ABC necesario para la biosíntesis del grupo Cu_Z . Por último, el gen *nosL*, puede codificar una chaperona implicada en el transporte de cobre y ensamblaje del grupo Cu_Z a NosZ. Cepas mutantes de *B. diazoefficiens* para los genes *nosR* y *nosZ* son capaces de crecer bajo condiciones desnitrificantes, sin embargo, acumulan grandes cantidades de óxido nitroso (Velasco *et al.*, 2004).

2.4.5.5. Regulación de la desnitrificación en *B. diazoefficiens*. Respuesta a NO

Como en muchos otros desnitrificantes, en *B. diazoefficiens* la expresión de los genes de la desnitrificación, además de ciertos citocromos importantes para esta ruta, como el c_{550} , ocurre en condiciones limitantes de oxígeno y en presencia de nitrato u otro óxido de nitrógeno derivado (revisado por Bedmar *et al.*, 2005, Delgado *et al.*, 2007). La percepción y transducción de las señales que van a activar la desnitrificación, está

mediada por las cascadas regulatorias FixLJ-FixK₂-NnrR y RegSR-NifA (revisado por Bueno *et al.*, 2012, Torres *et al.*, 2014).

Cepas de *B. diazoefficiens* mutantes en los genes *fixL*, *fixJ* y *fixK₂* no son capaces de crecer a expensas de la desnitrificación (Nellen-Anthamatten *et al.*, 1998). FixK₂ induce la expresión de los genes *nap*, *nirK*, *nor* y *nos* (Velasco *et al.*, 2001, Mesa *et al.*, 2002, Robles *et al.*, 2006), y adicionalmente los reguladores *rpoN1*, *fixK₁* y *nnrR* (Nellen-Anthamatten *et al.*, 1998, Mesa *et al.*, 2003, 2008). En la región promotora de todos los genes de la desnitrificación de *B. diazoefficiens* se localizan secuencias tipo caja FNR (5'-TTGAT-N₄-GTCAA-3'), a las que FixK₂ podría unirse para activar la transcripción. De hecho, esa unión se ha demostrado para los genes *nap*, *nirK* y *nos* mediante experimentos de transcripción *in vitro* (Bueno *et al.*, 2017).

NnrR expande la cascada FixLJ-FixK₂ en un nivel adicional de control para la máxima inducción de los genes de la desnitrificación en respuesta posiblemente a NO. La proteína NnrR de *B. diazoefficiens* contiene 236 aminoácidos, y comparte del 47% al 78% de identidad con otros reguladores transcripcionales de la familia CRP-FNR (Mesa *et al.*, 2003). NnrR carece del motivo de cisteína, característico de las proteínas tipo FNR que responden a redox, pero sí presenta el motivo HXXSR de unión a ADN típico del grupo NnrR de la familia CRP-FNR. La forma en la que NnrR de *B. diazoefficiens* detecta el NO aún no se conoce, aunque posiblemente sea gracias a un grupo hemo. Se ha demostrado, por experimentos de calorimetría, que NnrR es capaz de unirse específicamente a la caja FNR presente en el promotor de los genes *nor* en condiciones anaeróbicas, y experimentos de expresión indican que el NO es el único óxido de nitrógeno que induce a los genes *nor*. Adicionalmente, una cepa mutante *nnrR* pierde por completo la expresión de los genes *nor* (Bueno *et al.*, 2017), y por consecuencia, es incapaz de crecer en anaerobiosis con nitrato (Mesa *et al.*, 2003), posiblemente debido a la acumulación de NO hasta niveles citotóxicos. El NO también induce la expresión del gen *nirK*, sin embargo, a diferencia de los genes *nor*, también requiere la presencia de NO₂⁻ y NnrR no es capaz de unirse a la región promotora del gen *nirK* (Bueno *et al.*, 2017).

Además de la cascada FixLJ-FixK₂-NnrR, la cascada RegSR/NifA también está implicada para la máxima inducción de los genes de la desnitrificación bajo concentraciones muy bajas de oxígeno, menores al 0,5% (Bueno *et al.*, 2010, Torres *et al.*, 2014). Ambas cascadas están ligadas debido a que la transcripción de NifA depende del factor sigma alternativo σ^{54} , codificado por *rpoN1*, cuya expresión a su vez depende de FixK₂. Se ha demostrado que NifA induce la expresión de los genes *nap*, *nirK* y *nor* (Bueno *et al.*, 2010). RegR es capaz de interactuar directamente con la región promotora de los genes *nor* y *nos*, (Torres *et al.*, 2014).

2.4.6. Metabolismo de NO en nódulos de soja

La baja tensión de oxígeno presente en los nódulos, pero la alta demanda energética obliga a los bacteroides a mantener un tipo de respiración con alta afinidad por oxígeno, gracias a la oxidasa terminal *cbb₃*, codificada por el operón *fixNOQP*. Sin embargo, numerosos estreses ambientales, como encharcamiento, salinidad o sequía, entre otros, pueden provocar la disminución de la concentración de O₂ en nódulo por debajo de los requerimientos de la *cbb₃*. Dado que los bacteroides de *B. diazoefficiens* poseen la maquinaria enzimática necesaria para desnitrificar, bajo ese tipo de estreses, este proceso podría generar ATP para la nitrogenasa, o simplemente aumentar la supervivencia de los bacteroides.

Por otro lado, la desnitrificación en bacteroides podría ser un mecanismo de detoxificación, mediante la eliminación de compuestos citotóxicos, como el nitrito y el NO. Estos compuestos, que pueden producirse por el bacteroide como intermediarios de la reducción de nitrato y la desnitrificación, o por la planta como productos de la cNR o enzimas tipo NOS, pueden dañar a la nitrogenasa (Shimoda *et al.*, 2009) o unirse a la Lb y formar complejos nitrosil-leghemoglobina (LbNO) afectando de esta forma a la fijación de N₂ (Kanayama *et al.*, 1990).

Se ha demostrado que los genes de la desnitrificación se expresan en nódulos de plantas de soja. En plantas cultivadas dependiendo exclusivamente de la fijación de N₂ se detectó expresión de los genes de la desnitrificación mediante actividades β -galactosidasa, siendo la propia microaerobiosis del nódulo suficiente para su expresión. Sin embargo, la adición de KNO₃ a la solución nutritiva de las plantas no

incrementó su expresión, por lo que, al contrario de lo observado en vida libre, en simbiosis es la limitación de oxígeno, y no la presencia de nitrato, el principal factor implicado en la expresión de dichos genes (Mesa *et al.*, 2004).

Fisiológicamente, la inoculación de plantas de soja con cepas de *B. diazoefficiens* mutantes para los genes *nirK* o *norC*, no muestran diferencias significativas en condiciones de crecimiento normales y a expensas de la fijación biológica de nitrógeno. Sin embargo, al añadirle KNO₃ al medio, el número y el peso seco de los nódulos de las cepas mutantes fue inferior a los de la cepa silvestre (Mesa *et al.*, 2004). Posteriormente se ha demostrado, que el nitrato junto al encharcamiento induce la formación de NO en los nódulos de soja el cual es producido fundamentalmente por la desnitrificación en los bacteroides (Meakin *et al.*, 2007, Sanchez *et al.*, 2010, Inaba *et al.*, 2012). Este NO contribuye a la formación de complejos nitrosil-leghemoglobina (LbNO) y la represión de la expresión de los genes *nifH* y *nifD* (Sanchez *et al.*, 2010). Recientemente, se ha demostrado que el nitrato y el encharcamiento también incrementa la producción del potente gas invernadero N₂O por los nódulos de soja (Tortosa *et al.*, 2015).

3

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

La simbiosis rizobio-leguminosa se caracteriza por llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno en unos órganos denominados nódulos. En el interior de los nódulos los rizobios se diferencian en formas especializadas, denominadas bacteroides, que reducen el N_2 atmosférico a NH_4^+ , una forma nitrogenada asimilable por la planta, gracias a la actividad nitrogenasa. La enzima nitrogenasa es extremadamente sensible al oxígeno, sin embargo, los bacteroides necesitan oxígeno para respirar y obtener la energía necesaria para satisfacer la gran demanda energética requerida por el proceso de fijación de N_2 . Los nódulos han desarrollado una serie de mecanismos para proteger a la nitrogenasa de la inactivación por oxígeno y a su vez, satisfacer los requerimientos energéticos de la misma tales como: i) la existencia de una barrera de difusión al oxígeno en el córtex (revisado por Minchin *et al.*, 2008; Kim *et al.* 1999), ii) el uso de la leghemoglobina de la planta (Downie, 2005) y iii) la síntesis en los bacteroides de la oxidasa *cbb₃* de alta afinidad por O_2 codificada por los genes *fixNOQP* (revisado por Delgado *et al.*, 1998). La actividad nitrogenasa también puede inhibirse por la presencia de compuestos citotóxicos como el nitrito y el óxido nítrico (NO). Estos compuestos, pueden producirse por la planta como productos de la nitrato reductasa vegetal (cNR) o enzimas tipo óxido nítrico sintasa (NOS) entre otras fuentes (Glyan'ko, 2015) o por el microsimbionte que también puede contribuir a la producción de NO_2^- o NO a través del proceso de desnitrificación (Sánchez *et al.*, 2010).

Estudios realizados en el Grupo del Metabolismo del Nitrógeno del Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín han demostrado, mediante el uso de espectroscopías UV-visible, de fluorescencia y de resonancia paramagnética y electrónica (EPR), que la hipoxia y el nitrato inducen la formación de NO en nódulos de soja, el cual puede unirse a la leghemoglobina y dar lugar a la formación de complejos nitrosil-leghemoglobina (LbNO) (Meakin *et al.*, 2007, Sánchez *et al.*, 2010). Por otro lado, en estos estudios se ha demostrado la importancia del proceso de desnitrificación de los bacteroides en la formación de NO y LbNO en nódulos de soja, así como el efecto inhibitorio del NO sobre la actividad de la nitrogenasa y sobre la expresión del gen *nifH* responsable de su síntesis, por lo que es

necesaria la presencia de sistemas de destoxificación del NO en los nódulos. En este sentido, se ha propuesto a la enzima óxido nítrico reductasa (Nor) de los bacteroides como el principal mecanismo de eliminación de NO de los nódulos (Sánchez *et al.*, 2010). Sin embargo, estudios realizados por Meakin y colaboradores (2006), sugerían la existencia en los nódulos de otros sistemas de destoxificación de NO además de la Nor, dado que bacteroides mutantes para esta enzima, no mostraban diferencias en la capacidad de consumir NO, ni los nódulos acumulaban más complejos LbNO, que los inoculados por la cepa silvestre (Meakin *et al.*, 2006).

Además de las óxido nítrico reductasas, las hemoglobinas bacterianas son reconocidos sistemas implicados en la destoxificación de NO. En bacterias, se han descrito tres tipos de hemoglobinas; flavohemoglobinas, hemoglobinas de dominio único y hemoglobinas truncadas, todas con papeles importantes en la eliminación de NO (revisado por Poole, 2005). La búsqueda en el genoma de *Bradyrhizobium diazoefficiens* de posibles hemoglobinas permitió la identificación de un gen (blr2807) que codifica una hemoglobina a la que se le denominó Bjgb. Esta proteína mostró una homología del 37% y 32% con las hemoglobinas de dominio único Vgb y Cgb de *Vitreoscilla stercoraria* y *Campylobacter jejuni*, respectivamente. Además, el análisis de secuencia reveló que Bjgb contiene unos residuos de histidina (His⁸¹) y fenilalanina (Phe⁴²) claves en el funcionamiento de las hemoglobinas (Sánchez *et al.*, 2011). Curiosamente, el gen *bjgb* se encuentra incluido dentro de un grupo de genes que codifican proteínas posiblemente implicadas en la asimilación de nitrato y nitrito, tales como un transportador de nitrato tipo ABC, (blr2803-blr2805), una proteína de extrusión de nitrito (blr2806), una flavoproteína (blr2808) y la subunidad grande de una nitrato reductasa asimilativa (blr2809) (Sánchez *et al.*, 2011). Cerca de estos genes, se encuentra otro clúster (bll4571-73) que contiene un gen que codifica una nitrito reductasa asimilativa (NirA) y genes para un regulador de respuesta a NO₃⁻/NO₂⁻ (NasS-NasT). Sin embargo, al inicio de esta Tesis Doctoral se desconocía la implicación de estas proteínas en la asimilación de nitrato y nitrito, así como el papel de Bjgb en el metabolismo del NO.

De acuerdo a estos antecedentes, para la realización de esta Tesis Doctoral se plantearon los siguientes objetivos.

1. Establecer el papel de los genes blr2803-blr2809 y bli4571-4573 de *B. diazoefficiens* en la asimilación de nitrato y nitrito.
2. Establecer el papel de la hemoglobina de dominio único (Bjgb) de *B. diazoefficiens* en el metabolismo del NO.
3. Estudiar la relación entre la asimilación de nitrato y la detoxificación de NO en *B. diazoefficiens*. Identificar y caracterizar los posibles mecanismos de regulación implicados.



1. To establish the role of blr2803-blr2809 and bli4571-4573 genes of *B. diazoefficiens* in nitrate and nitrite assimilation.
2. To establish the role of the single-domain hemoglobin (Bjgb) of *B. diazoefficiens* in NO metabolism.
3. To study the relationship between nitrate assimilation and NO detoxification in *B. diazoefficiens*. To identify and characterize the possible regulatory mechanisms involved.

4

MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

4.1.1. Cepas bacterianas

Las cepas de *Bradyrhizobium diazoefficiens* y *Escherichia coli*, junto con sus características más relevantes, se indican en la siguiente tabla (Tabla 4.1).

Cepa	Características relevantes	Fuente o referencia
Bacteria		
<i>E. coli</i>		
DH5α	λ ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(r κ m κ) supE44 thi-1 gyrA relA1	Bethesda Research Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD
S17.1	Sm ^r Spc ^c ; hsdR (RP4-2 kan::Tn7 tet::Mu; integrado en el cromosoma)	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
<i>B. diazoefficiens</i>		
USDA 110	Cm ^r ; cepa silvestre	US Department of Agriculture, Beltsville, MD, USA
110spc4	Spc ^c ; derivado de USDA 110	(Regensburger & Hennecke, 1983)
4000 (narU)	Cm ^r ; Δ blr2806 (Mutación por deleción en fase)	Este trabajo
4001 (bjgb)	Cm ^r ; Δ blr2807 (Mutación por deleción en fase)	Este trabajo
4002 (flp)	Cm ^r ; Δ blr2808 (Mutación por deleción en fase)	Este trabajo

Cepa	Características relevantes	Fuente o referencia
4003 (<i>nasA</i>⁻)	Cm ^r ; Δblr2809 (Mutación por deleción en fase)	Este trabajo
4004 (<i>nrtABC</i>₁⁻)	Cm ^r ; Δblr2803-5 (Mutación por deleción en fase)	Este trabajo
4011 (<i>nirA</i>⁻)	Cm ^r ; Δbll4571 (Mutación por deleción en fase)	Este trabajo
GRPA1 (<i>napA</i>⁻)	Cm ^r Spc ^r Sm ^r ; <i>napA</i> ::Ω	(Delgado <i>et al.</i> , 2003)
GRPA1-4003 (<i>napA</i>⁻ <i>nasA</i>⁻)	Cm ^r Spc ^r Sm ^r ; <i>napA</i> ::Ω Δblr2809 (Mutación por deleción en fase)	Este trabajo
2499	Cm ^r Tc ^r ; <i>PnorC</i> :: <i>lacZ</i>	Este trabajo
4001-2499	Cm ^r Tc ^r ; Δblr2807 (Mutación por deleción en fase) <i>PnorC</i> :: <i>lacZ</i>	Este trabajo
4003-2499	Cm ^r Tc ^r ; Δblr2809 (Mutación por deleción en fase) <i>PnorC</i> :: <i>lacZ</i>	Este trabajo
GRPA1-2499	Cm ^r Spc ^r Sm ^r Tc ^r ; <i>napA</i> ::Ω <i>PnorC</i> :: <i>lacZ</i>	Este trabajo
GRPA1-4003-2499	Cm ^r Spc ^r Sm ^r Tc ^r ; <i>napA</i> ::Ω Δblr2809 (Mutación por deleción en fase) <i>PnorC</i> :: <i>lacZ</i>	Este trabajo
4009	Cm ^r Tc ^r ; WT <i>PnarK</i> :: <i>lacZ</i>	Este trabajo
4012-4009	Cm ^r Tc ^r ; Δbll4572 (Mutación por deleción en fase) <i>PnarK</i> :: <i>lacZ</i>	Este trabajo
4013-4009	Cm ^r Tc ^r ; Δbll4573 (Mutación por deleción en fase) <i>PnarK</i> :: <i>lacZ</i>	Este trabajo
4018	Cm ^r Tc ^r ; USDA 110 <i>PnirA</i> :: <i>lacZ</i>	Este trabajo

Cepa	Características relevantes	Fuente o referencia
4012-4018	Cm ^r Tc ^r ; Δbll4572 (Mutación por deleción en fase) <i>PnirA::lacZ</i>	Este trabajo
4013-4018	Cm ^r Tc ^r ; Δbll4573 (Mutación por deleción en fase) <i>PnirA::lacZ</i>	Este trabajo
4001-pDB4014	Cm ^r ; Δblr2807 (Mutación por deleción en fase), pDB4014	Este trabajo
4002-pDB4015	Cm ^r ; Δblr2808 (Mutación por deleción en fase), pDB4015	Este trabajo
4003-pDB4017	Cm ^r ; Δblr2809 (Mutación por deleción en fase), pDB4017	Este trabajo
LP4488	Km ^r ; <i>ntrC::aphII</i>	Este trabajo
N50-97	Spc ^r ; 110 <i>spc4</i> Δ <i>rpoN</i> _{1/2}	(Kullik <i>et al.</i> , 1991)
LP4488-4009	Cm ^r Tc ^r ; LP4488 <i>PnarK-lacZ</i>	Este trabajo
LP4488-4018	Cm ^r Tc ^r ; LP4488 <i>PnirA-lacZ</i>	Este trabajo
110 <i>spc4</i> -4009	Cm ^r Tc ^r ; 110 <i>spc4</i> <i>PnarK-lacZ</i>	Este trabajo
110 <i>spc4</i> -4018	Cm ^r Tc ^r ; 110 <i>spc4</i> <i>PnirA-lacZ</i>	Este trabajo
N50-97-4009	Cm ^r Tc ^r ; N50-97 <i>PnarK-lacZ</i>	Este trabajo
N50-97-4018	Cm ^r Tc ^r ; N50-97 <i>PnirA-lacZ</i>	Este trabajo

Tabla 4.1. Cepas bacterianas.

4.1.2. Plásmidos

A continuación, se muestran los plásmidos empleados y desarrollados durante el desarrollo de este trabajo (Tabla 4.2).

Plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
pGEM-T Easy	Ap ^r ; <i>lacZ</i> , vector de clonación	Promega

Plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
pK18mobsacB	Km ^r ; <i>lacZ sacB mob</i> ⁺ vector suicida movilizable, derivado de pUC18	(Schafer <i>et al.</i> , 1994)
pG18mob2	Gm ^r ; <i>mob</i> ⁺ vector suicida movilizable	(Kirchner & Tauch, 2003)
pSUP3535	Tc ^r ; vector para la fusión <i>lacZ</i>	(Mesa <i>et al.</i> , 2003)
pTE3	Tc ^r ; derivado pLAFR1 con el promotor <i>trp</i> , para la complementación de mutantes	(Egelhoff <i>et al.</i> , 1985)
pDB4000	Km ^r ; (pK18mobsacB) blr2806 (<i>nark</i>) construcción para la mutación en fase	Este trabajo
pDB4001	Km ^r ; (pK18mobsacB) blr2807 (<i>bjgb</i>) construcción para la mutación en fase	Este trabajo
pDB4002	Km ^r ; (pK18mobsacB) blr2808 (<i>flp</i>) construcción para la mutación en fase	Este trabajo
pDB4003	Km ^r ; (pK18mobsacB) blr2809 (<i>nasA</i>) construcción para la mutación en fase	Este trabajo
pDB4004	Km ^r ; (pK18mobsacB) blr2803-5 (<i>nrtABC</i> ₁) construcción para la mutación en fase	Este trabajo
pDB4011	Km ^r ; (pK18mobsacB) bll4571 (<i>nirA</i>) construcción para la	Este trabajo

Plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
	mutación en fase	
pDB4012	Km ^r ; (pK18 <i>mobsacB</i>) bll4572 (<i>nasS</i>) construcción para la mutación en fase	Este trabajo
pDB4013	Km ^r ; (pK18 <i>mobsacB</i>) bll4573 (<i>nasT</i>) construcción para la mutación en fase	Este trabajo
pMFL4488	Km ^r ; (pG18 <i>mob2</i>) blr4488 (<i>ntrC</i>) construcción para la complementación	Este trabajo
pBG602Ω	Spc ^r Sm ^r Km ^r ; (pK18 <i>mobsacB</i>) <i>napA::Ω</i> , construcción para la complementación	(Delgado <i>et al.</i> , 2003)
pJNOR43M2	Km ^r Tc ^r (pSUP202) <i>norC::aphII</i> -PSP, construcción para la complementación	(Mesa <i>et al.</i> , 2002)
pDB4014	Tc ^r ; pTE3:: <i>blr2807</i> , construcción para la complementación	Este trabajo
pDB4015	Tc ^r ; pTE3:: <i>blr2808</i> , construcción para la complementación	Este trabajo
pDB4017	Tc ^r ; pTE3:: <i>blr2809</i> , construcción para la complementación	Este trabajo
pRJ2499	Tc ^r ; (pSUP3535) <i>PnorC::lacZ</i>	(Mesa <i>et al.</i> , 2003)

Plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
pDB4009	Tc ^r ; (pSUP3535) PnarK::lacZ	Este trabajo
pDB4018	Tc ^r ; (pSUP3535) PnirA::lacZ	Este trabajo

Tabla 4.2. Plásmidos.

4.1.3. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos empleados se enumeran en la siguiente tabla (Tabla 4.3).

Oligonucleótido	Secuencia de ADN (5' → 3')	Diana para endonucleasa
Mutagénesis		
blr2806_up_For	CGGGATCCCTGGGTGATGCACAATCTCA	BamHI
blr2806_up_Rev	CCGCTCGAGGCCAGTCTGAAATCCAGGTC	XhoI
blr2806_down_For	GCTCTAGACTCGAGCCTGACCTGGTGGTTCTAC	XbaI/XhoI
blr2806_down_Rev	CCCAAGCTTCGAGCACGAGCTTGAATA	HindIII
blr2807_up_For	CGGAATTCCTGGATCATGGCGTACCTCT	EcoRI
blr2807_up_Rev	GCTCTAGAGCTCTGCTGGATGAGGGTAA	XbaI
blr2807_down_For	GCTCTAGAGCGCTGTCCGGCTACATGATTT	XbaI
blr2807_down_Rev	CCCAAGCTTGTCTGCATGACGTCGTTGAC	HindIII
blr2808_up_For	CGGAATTC AAGATTTCATCGGCTTCCT	EcoRI
blr2808_up_Rev	CGGGATCC TCACTCACAAGGCATCTCCT	BamHI
blr2808_down_For	CGGGATCC GCGATCCGTACCGACATGAT	BamHI
blr2808_down_Rev	CCCAAGCTTGT CGAAGCCCGACGTGTT	HindIII
blr2809_up_For	CGGAATTCGGTCTGCTCGGGTTGGAG	EcoRI
blr2809_up_Rev	CGGGATCC GCTTGGTGGTCCGGAGCTT	BamHI

Oligonucleótido	Secuencia de ADN (5' → 3')	Diana para endonucleasa
blr2809_down_For	CGGGATCCCGCCAGTGAAGCAGGTGAAG	<i>Bam</i> HI
blr2809_down_Rev	CCCAAGCTTGC GCGTTCCTTGAGATGATA	<i>Hind</i> III
blr2803_up_For	CGGGATCCTTCCGAAGGCGGAGATACG	<i>Bam</i> HI
blr2803_up_Rev	GCTCTAGAGACAATTGACGGCGGCTGAGG	<i>Xba</i> I
blr2805_down_For	GCTCTAGATTATGAGCGTCATCGCTTCG	<i>Xba</i> I
blr2805_down_Rev	AAACTGCAGGACAACGTCGGAATGAACAG	<i>Pst</i> I
bll4571_up_For	GCGGAATTCGTCGATGCCGAGGTGATCC	<i>Eco</i> RI
bll4571_up_Rev	GCGGGTACCGGCTCAAGAGCCTGCTCTG	<i>Kpn</i> I
bll4571_down_For	GCGGGTACCTTGCCGATGCACAGGTGTC	<i>Kpn</i> I
bll4571_down_Rev	GCGTCTAGAGCGCGAACACGCCAAAGC	<i>Xba</i> I
bll4572_up_For	GCGGAATTCTCCGGCGTGCTATGGATG	<i>Eco</i> RI
bll4572_up_Rev	GCGGGTACCATCGACCAGCGGAATGAAC	<i>Kpn</i> I
bll4572_down_For	GCGGGTACCGAAGTCGGTCGCTGGAAGG	<i>Kpn</i> I
bll4572_down_Rev	GCGTCTAGAGCTCGGCGGCATTGTC	<i>Xba</i> I
bll4573_up_For	GCGGGATCCCAAGTACGGCGCCTCCATGTTCC	<i>Bam</i> HI
bll4573_up_Rev	GCGTCTAGAGGCCCGGATCGGGCTTTC	<i>Xba</i> I
bll4573_down_For	GCGTCTAGAGCGTCGGAGATGCTGAAATG	<i>Xba</i> I
bll4573_down_Rev	GCGAAGCTTACCACGTCCGGATTCTTG	<i>Hind</i> III
Fusiones promotores-<i>lacZ</i>		
blr2806- <i>lacZ</i> _For	TACCTGCAGAAGCTTCACCAGCACCACCTATCTGA	<i>Pst</i> I/ <i>Hind</i> III
blr2806- <i>lacZ</i> _Rev	TACCTGCAGAAGTCTTGCCAGTCGCATTCC	<i>Pst</i> I

Oligonucleótido	Secuencia de ADN (5' → 3')	Diana para endonucleasa
<i>nirA-lacZ_For</i>	AAACTGCAGGCTTCTGCTCGTCGGTAAAGTC	<i>PstI</i>
<i>nirA-lacZ_Rev</i>	AAAGAATTCGCGATGGCCGTGTTCAAGG	<i>EcoRI</i>
<i>ntrC5' FW</i>	AGCCGCGCAAGACCACCTTC	
<i>ntrC5' RV</i>	TGCCGGTGAGCCTGACCTCA	
<i>ntrC3'-SphI FW</i>	TAGCATGCCTCTATCCGCAGGACGTGAT	<i>SphI</i>
<i>ntrC3'-HindIII RV</i>	AAAAAGCTTGCTCCGATAGACCTGGATGT	<i>HindIII</i>
Complementaciones		
<i>blr2807_For</i>	AAACTGCAGAGGCAGACCGAAACAGAC	<i>PstI</i>
<i>blr2807_Rev</i>	AAAGGATCCAGCGGTTCACTCACAAGG	<i>BamHI</i>
<i>blr2808_For</i>	AAACTGCAGGTCCGGCTACATGATTTCCGAG	<i>PstI</i>
<i>blr2808_Rev</i>	AAAGGATCCCCTCATATCGAGCTGCCTTGTC	<i>BamHI</i>
<i>blr2809_For</i>	AAACTGCAGCAAGGCGGCTTGACAAGG	<i>PstI</i>
<i>blr2809_Rev</i>	AAAGGATCCAAGAGCCGACCGCTAACC	<i>BamHI</i>
RT-PCR		
a1	CAGCACCTATCTGAAGT	
a2	GCCAGTCTGAAATCCAGGTC	
b1	AAGGATTTTCATCGGCTTCCT	
b2	GCTCTGCTGGATGAGGGTAA	
c1	GCTGTCCGGCTACATGATTT	
c2	CGAGCACGAGCTTGAATA	
d1	CGATCCGTACCGACATGAT	

Oligonucleótido	Secuencia de ADN (5' → 3')	Diana para endonucleasa
d2	CAGCTTGTTGGCGACATAGT	
e1	GCCAGTGAAGCAGGTGAAG	
e2	AGCCGCGCCAATGCAGAAGA	
f	CAGCTTGTTGGCGACATAGT	
g	GACAGCGAACCAACGAGAGG	
RACE		
Adaptor	GACTCGAGTCGACATCG	<i>XhoI/SalI</i>
(dT)17-Adaptor	GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTT	<i>XhoI/SalI</i>
SP1 blr2806	GACAGCGAACCAACGAGAGG	
SP2 blr2806	TACCTGCAGAAGTCTTGCCAGTCGCATTCC	<i>PstI</i>
SP1 bli4571	AGAAGATGCCGTAGTAGC	
SP2 bli4571	GCGTCTAGAGCTCGGCGGCATTGTC	<i>XbaI</i>

Tabla 4.3. Oligonucleótidos.

4.1.4. Medios de cultivo

La composición, preparación y uso de los diferentes medios empleados durante el desarrollo de esta tesis se describen a continuación (Tabla 4.4).

Medio de cultivo	Composición por litro dH ₂ O	Utilidad
<i>E. coli</i> (37°C)		
LB (Luria-Bertani, Miller 1972)	NaCl, 5 g; triptona, 10 g; extracto de levadura, 5 g	Medio de cultivo de rutina para <i>E. coli</i> .

Medio de cultivo	Composición por litro dH ₂ O	Utilidad
SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression, Douglas Hanahan 1983)	NaCl, 5 g; triptona, 20 g; extracto de levadura, 5g; KCl, 1,186 g; MgSO ₄ ·7H ₂ O, 2,467 g; MgCl ₂ , 0,952 g; *glucosa, 2,467 g. pH 7	Medio empleado para obtener mayor rendimiento de transformación.
<i>B. diazoefficiens</i> (30°C)		
PSY (Peptone, Salt and Yeast, Regensburger y Hennecke 1983)	KH ₂ PO ₄ , 0,3 g; Na ₂ HPO ₄ , 0,3 g; CaCl ₂ ·H ₂ O, 0,05 g; MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0,1 g; extracto de levadura, 1 g; peptona, 3 g; **solución (100x) de elementos traza, 10 ml; *L-arabinosa, 0,1%. pH 7	Medio de cultivo de rutina para <i>B. diazoefficiens</i>
YEM (yeast extract manitol, Vincent 1970)	Manitol, 5 g; NaCl, 0,1 g; extracto de levadura, 1 g; K ₂ HPO ₄ , 0,5 g; MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0,2 g. pH 7	Medio de cultivo de rutina para <i>B. diazoefficiens</i> Medio empleado en precultivos de células para inducciones y para determinar el crecimiento de las cepas en microaerobiosis
Bergersen (Bergersen 1977)	K ₂ HPO ₄ , 0,23 g; MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0,1 g; glicerol, 4 ml; glutamato sódico, 1,1 g; **solución (100x) de elementos traza, 10 ml. pH 7	Medio mínimo para <i>B. diazoefficiens</i>

Medio de cultivo	Composición por litro dH ₂ O	Utilidad
BN3	Medio Bergersen sustituyendo el glutamato sódico por 10 mM de KNO ₃	Medio empleado para determinar el crecimiento de las cepas dependiendo de la fuente de nitrógeno y para la realización de inducciones en tales condiciones
BN2	Medio Bergersen sustituyendo el glutamato sódico por 1 mM de NaNO ₂	Medio empleado para determinar el crecimiento de las cepas dependiendo de la fuente de nitrógeno y para la realización de inducciones en tales condiciones
BGN3	Medio Bergersen adicionado con 10 mM de KNO ₃	Medio empleado para determinar el crecimiento de las cepas dependiendo de la fuente de nitrógeno y para la realización de inducciones en tales condiciones
Evans	Manitol, 10 g; NH ₄ Cl, 1,07 g; NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O, 1,56 g; KCl, 0,745 g; Na ₂ SO ₄ , 0,284 g; MgCl ₂ ·6H ₂ O, 0,254 g; ácido cítrico, 0,42 g; **solución (100x) de elementos traza, 5 ml. pH 7	Medio mínimo para <i>B. diazoefficiens</i>

Tabla 4.4. Medios de cultivo.

Para la realización de medios de cultivo sólidos se adicionó 15 g de agar bacteriológico por litro de medio después de haber medido el pH.

Todos los medios de cultivo se esterizaron en autoclave a 121°C durante 20 minutos, adicionando, en caso necesario y después de autoclavarse, los antibióticos, *la arabinosa para el medio PSY o la glucosa para el medio SOC y los medios de recombinación durante la realización de cepas mutantes.

**Solución de elementos traza (100x): H₃BO₃, 1g; ZnSO₄·7H₂O, 0,1 g; CuSO₄·5H₂O, 0,05 g; MnCl₂, 0,05 g; Na₂MoO₄·2H₂O, 0,01 g; FeCl₃, 0,1 g; dH₂O, 1 litro.

4.1.5. Antibióticos

La adición de antibióticos a los medios de cultivo se realizó a partir de soluciones concentradas de los mismos en agua desionizada y posterior esterilización con unidades de filtración Minisart NML (Sartorius) de 0,2 µm de tamaño de poro. En el caso de las soluciones de tetraciclina y de cloramfenicol no fue necesaria la esterilización por filtración ya que se empleó alcohol o una mezcla hidroalcohólica para disolver los citados antibióticos. La concentración final de los distintos antibióticos fue la que se indica en la Tabla 4.5.

Antibiótico		Concentración (µg/ml)		
		<i>B. diazoefficiens</i>		<i>E. coli</i>
		Líquido	Sólido	Líquido y sólido
Espectinomicina	Spc	100	200	25
Sulfato de estreptomicina	Sm	100	200	25
Tetraciclina*	Tc	25	100	10
Sulfato de kanamicina	Km	100	200	25
Ampicilina	Ap	-	-	200
Cloramfenicol**	Cm	20	20	50
Gentamicina	Gm			10

Tabla 4.5. **Antibióticos.** *La solución concentrada de Tc se preparó en metanol:agua (1:1) o metanol absoluto dependiendo de la concentración de la misma (1 o 10 mg/ml, respectivamente). **Para la solución concentrada de Cm se utilizó etanol.

4.1.6. Materiales químicos y bioquímicos

Las soluciones y tampones empleados en las diferentes técnicas usadas durante este trabajo se enumeran en la siguiente relación (Tabla 4.6)

Solución	Composición	Utilidad
RNasa A	2 mg/ml de RNasa A en Tris 10 mM pH 7,4, NaCl 0.1M, glicerol 20% y hervido durante 10 minutos para eliminar DNAsas	Eliminación de RNA de muestras.
Solución ácida de sulfato ferroso	13,5 g FeSO ₄ ·7 H ₂ O, 36 ml H ₂ O, 4 ml H ₂ SO ₄ (concentrado)	Producción de óxido nítrico
Solución de ONPG	Tampón fosfato: Sol. A → Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O (0,1 mM), 1,245 g/70 ml. Sol.B → NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (0,1 mM), 0,689g/50 ml, 39 ml. Mezclar 61 ml de A y 39 ml de B. ONPG 4 mg/ml.	Actividad β-galactosidasa
Tampón de carga de DNA 6x	Sacarosa, 40%, azul de bromofenol, 0,025%	Electroforesis en geles de agarosa
Tampón de lavado	Tris-HCl, 40 mM; KCl, 150 mM. pH 7	Lavado de células previa a su lisado en prensa de French
Tampón de lisado	Tampón de lavado adicionado con AEBSF, 1 mM; DNAsal, 20 µg/ml.	Solución para rotura de células en prensa de French
Tampón TBE 5x	Tris-HCl, 450 mM; borato, 450 mM; EDTA, 10 mM. pH 8	Electroforesis en geles de agarosa
Tampón TE	Tris-HCl, 10 mM; EDTA, 1 mM. pH 8	Preparación muestras ADN

Solución	Composición	Utilidad
Solución de lavado miniprep <i>B. diazoefficiens</i>.	NaCl 1M; Sarcosil 1%	Miniprep <i>B. diazoefficiens</i>
Solución MAXI	Tris-HCl 25 mM; glucosa 50 mM; EDTA 10 mM. pH 8	Miniprep <i>B. diazoefficiens</i>
Solución de lisis miniprep <i>B. diazoefficiens</i>	NaOH 0,2 M; SDS 1%	Miniprep <i>B. diazoefficiens</i>
Solución de neutralizado miniprep <i>B. diazoefficiens</i>	Acetato sódico 3 M, calibrado a pH 4,8 con ácido acético glacial	Miniprep <i>B. diazoefficiens</i>
Solución TENS	NaOH, 0.1 M; SDS, 0.5%; RNAsaA, 1 µl en TE	Miniprep TENS de <i>E. coli</i>
Solución de neutralizado miniprep <i>E. coli</i>	Acetato sódico 3 M, calibrado a pH 5,2 con ácido acético glacial	Miniprep TENS de <i>E. coli</i>
Sulfanilamida	Sulfanilamida, 10 g en 200 ml de ácido clorhídrico concentrado (12 N). Enrasar a 1 l con agua desionizada. Conservar a 4°C y resguardados de la luz	Determinación de nitrito
NNEDA	Acido N-naftil-etilén-diamino, 200 mg/l (0,77 mM). Conservar a 4°C y resguardados de la luz	Determinación de nitrito
Mezcla NR	Tampón Tris-HCl 20 mM, KNO ₃ 20 mM, metil viológeno 0,4 mM. pH 7,5	Determinación de actividad nitrato reductasa (NR)

Solución	Composición	Utilidad
Mezcla NiR	Tampón Tris-HCl 20 mM, NaNO ₂ 0,2 mM, metil viológeno 0,4 mM. pH 7,5	Determinación de actividad nitrito reductasa (NiR)
Tampón Z	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 60 mM; NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 40 mM; KCl 10 mM; MgSO ₄ 1mM. pH 7,0. El día que se va a utilizar β-mercaptoetanol 50 mM.	Actividad β-galactosidasa
ONPG	2-nitrofenil-β-D-galactopiranosido, 4 mg/ml de tampón fosfato	Actividad β-galactosidasa
TFB1	Acetato potásico 30 mM; MnCl ₂ ·4H ₂ O 50 mM; RbCl 100 mM; CaCl ₂ ·2H ₂ O 10 mM; Glicerol 15%. pH 5,8	Preparación células competentes de <i>E. coli</i>
TFB2	MOPS 10 mM; RbCl 10 mM; CaCl ₂ ·2H ₂ O 75 mM; Glicerol 15%. pH 6,8. Preservar de la luz	Preparación células competentes de <i>E. coli</i>
Gel de resolución SDS-PAGE 14%	H ₂ O _d , 1,31 ml; Tris-HCl 1,5M pH 8,8, 1,25 ml; acrilamida 30% (37,5:1), 2,34 ml; SDS 10%, 50 μl; APS 10% (fresco), 31,25 μl; TEMED 6,6 M, 2,5 μl	SDS-PAGE
Gel de empaquetado SDS-PAGE 4%	H ₂ O _d , 0,91 ml; Tris-HCl 0,5M pH 6,8, 0,375 ml; acrilamida 30% (37,5:1), 0,2 ml; SDS 10%, 15 μl; APS 10% (fresco), 30 μl; TEMED 6,6 M, 1,25 μl	SDS-PAGE
Tampón de desarrollo SDS-PAGE	Glicina 14.41 g/l; Tris-Base 3.03 g/l; SDS 1 g/l	Electrolito para el desarrollo de electroforesis SDS-PAGE
Tampón de carga SDS-PAGE	Tris-HCl, 125 mM; SDS 4%; DTT 0,1 M; Glicerol 20%; azul de bromofenol 0.02%. pH 6,8	SDS-PAGE

Solución	Composición	Utilidad
Solución Comassie	Etanol, 50%; ácido acético, 10%; azul de bromofenol, 0,25%.	Tinción de geles de poliacrilamida
Solución de desteñido	Metanol, 25%; ácido acético, 10%.	Desteñido de geles de poliacrilamida
Tampón de transferencia	Tris-HCl, 250 mM; glicina, 190 mM; metanol, 20%	Lavado membranas de nitrocelulosa
Solución de Parada	Fenol, 10%; en etanol. pH 8	Extracción de ARN
Solución D	Isotiocianato de guanidina, 4 M; citrato sódico, 25 mM; sarcosyl, 0,5%; agua-DEPC hasta 50 ml. pH 7. Autoclavar	Extracción de ARN
Solución de Lisis ARN	Mezcla 10:1:10 de solución D, acetato sódico 2 M (pH 4) y fenol saturado con agua-DEPC o con Tris-ClH (pH 8)	Extracción de ARN
Solución DNAsa	Inhibidor de ARNasas, 20 U; DTT, 0,1 M; MgCl ₂ , 1M; DNAsa (libre de RNAsa), 10 U; agua-DEPC hasta 25 µl	Extracción de ARN

Tabla 4.6. Soluciones y reactivos.

4.2. Métodos Microbiológicos

4.2.1. Conservación de cepas bacterianas

Para la conservación prolongada de las distintas cepas se han utilizado criotubos que contenían alícuotas de cultivos en fase logarítmica de crecimiento, adicionados con glicerol estéril a una concentración final del 50%. Para los cultivos se inocularon 10 ml de LB, para *E. coli*, o 20 ml de PSY, para *B. diazoefficiens*, adicionados de sus correspondientes antibióticos con una sola colonia aislada procedente de una placa fresca. Los cultivos incubados a 37°C durante una noche para *E. coli* o a 30°C durante 4 o 5 días para *B. diazoefficiens*, se centrifugaron y lavaron una vez con medio sin antibiótico. Los pellets se resuspendieron con 2,25 ml de medio sin antibiotico y se

alicuotaron en tres criotubos independientes, uno de uso individual conservado a -20°C y dos para la colección del grupo a -80°C.

Para el transporte y envío de cepas bacterianas a otros laboratorios se inocularon criotubos con medio de cultivo sólido en pico de flauta, LB o PSY para *E. coli* o *B. diazoefficiens* respectivamente, suplementado con antibióticos.

4.2.2. Cultivo de células de *B. diazoefficiens*

4.2.2.1. Precultivos e inoculación

Todos los cultivos de células de *B. diazoefficiens* se iniciaron, de forma rutinaria, a partir de cultivos sólidos de PSY o YEM suplementado con antibióticos y con colonias independientes y claramente no contaminados, desde los que se inocularon matraces que contenían 20 o 50 ml de medio PSY líquido, que a su vez, se emplearon para inocular (dilución 1:100) matraces de mayor capacidad, si fuera necesario. Las células se incubaron aeróbicamente a 30°C, sin agitación para los cultivos sólidos durante 4-7 días, y en un agitador orbital (170 rpm), para cultivos líquidos, durante 4 días hasta alcanzar un $DO_{600} \approx 1$.

Para la inoculación de los diferentes cultivos, los precultivos fueron centrifugados y lavados con el medio de destino, los pellets fueron resuspendidos en un pequeño volumen para crear una suspensión de células concentradas a la que se le midió la DO_{600} haciendo diluciones. La inoculación de los cultivos se realizó a DO_{600} inicial 0,1, y de 0,2 a 0,4 para las inducciones.

4.2.2.2. Cultivos aeróbicos

A partir de precultivos líquidos en PSY o YEM, se inocularon tubos de 20 ml con 3 ml o matraces de 250 ml con 50 ml de medio PSY, YEM, Bergersen, BN3, BN2 o BGN3. Para asegurar la aerobiosis de los cultivos los recipientes fueron tapados de forma no hermética, en un agitador orbital a 170 rpm y a 30°C. La evolución en el crecimiento se monitorizó midiendo en un espectrofotómetro la DO_{600} de los tubos directamente o de alícuotas de los matraces extraídas en condiciones estériles, frente a un blanco de medio sin inocular.

4.2.2.3. Cultivos anaeróbicos

En microbiología, el término anaerobiosis se emplea para indicar la forma de cultivo en la que se procura eliminar la mayor parte del oxígeno disponible, no para indicar la ausencia total de oxígeno. Para ellos, se emplearon dos aproximaciones, una en la que la eliminación del oxígeno se produce por el propio consumo del cultivo, y otra en la que se gasea el medio de incubación con N₂ hasta que la concentración de O₂ en el interior de los frascos es menor de 0,1%. Para crear anaerobiosis por el propio consumo de oxígeno del cultivo se emplearon tubos de 17 ml o botes de 250 ml llenos de medio hasta su máxima capacidad y se cerraron herméticamente. En cambio, para crear anaerobiosis por gaseo se emplearon tubos de 17 ml o matraces de 500 ml con medio a un quinto de su capacidad y provistos de un tapón de goma para poder gasearlos con N₂ hasta que la concentración de O₂ fue inferior al 0,1%. Para calcular el tiempo de gaseo por recipiente se pasó el flujo procedente del interior del frasco a través de un analizador de O₂ (Servomex 572B). Para evitar posibles contaminaciones durante el proceso de gaseado, se emplearon filtros Minisart NML (Sartorius) de 0,2 µm de tamaño de poro. Una vez estandarizados los tiempos adecuados para obtener una concentración de O₂ inferior a 0,1%, no fue necesario el uso del analizador de oxígeno.

Los tubos, botes o matraces con medio fueron inoculados de manera que la DO₆₀₀ inicial de los cultivos fuera de 0,1. Las células se incubaron con agitación (170 rpm) a 30°C durante 8 a 10 días hasta alcanzar fase estacionaria, en curvas de crecimiento, o de 1 a 4 días, fase exponencial, para análisis de puebas enzimáticas.

4.2.2.4. Cultivos microaeróbicos

Para el cultivo microaeróbico de *B. diazoefficiens* se utilizaron tubos de 17 ml o matraces de 500 ml provistos de tapón de goma y manteniendo la proporción 1:5 entre medio y fase gaseosa. La atmósfera gaseosa del recipiente se reemplazó por una mezcla gaseosa de 2% de O₂ en N₂ gaseando durante el mismo tiempo que se empleó para crear condiciones anaeróbicas, dependiendo del volumen de la atmósfera del recipiente. Las condiciones microaeróbicas del cultivo se mantuvieron reemplazando cada día la atmósfera por la mezcla microaeróbica fresca. Estos cultivos se inocularon a DO₆₀₀ inicial 0,1 y se incubaron con agitación (170 rpm) a 30°C durante 8 a 10 días

hasta alcanzar fase estacionaria, en curvas de crecimiento, o de 1 a 4 días, fase exponencial, para análisis de puebas enzimáticas.

4.2.2.5. Incubación de células en microaerobiosis y anaerobiosis con nitrato

Cuando se emplearon cepas mutantes de *B. diazoefficiens* incapaces de crecer o con un grave defecto de crecimiento, para el análisis de diferentes actividades enzimáticas, las muestras se obtuvieron con el mismo procedimiento descrito para cultivos aeróbicos, microaeróbicos o anaeróbicos, pero, inoculando a una OD₆₀₀ más elevada a la realizada para una curva de crecimiento. Dependiendo del ensayo, la inoculación se realizó a OD₆₀₀ de 0,2 a 0,4.

4.2.2.6. Determinación del número de unidades formadoras de colonias (UFC/ml)

Para la realización de ensayos de mortandad celular o la verificación de curvas de crecimiento de las distintas cepas de *B. diazoefficiens* se llevó a cabo en contaje de unidades contadoras de colonias. Para ello se tomaron alícuotas de 100 µl de la suspensión celular y se realizó una serie de diluciones 1/10 con el mismo medio de cultivo estéril, normalmente hasta alcanzar la dilución -7. De todas las diluciones se depositaron gotas de 10 µl por cuatuplicado en placas de PSY o YEM suplementados con los antibióticos correspondientes. Se dejaron secar las gotas y se incubaron las placas a 30°C hasta la aparición de colonias. Se seleccionaron las diluciones donde se podían diferenciar colonias aisladas para contarlas. Los resultados, después de resolver las diluciones, se expresan como UFC/ml.

4.2.3. Obtención de las fracciones soluble (citosol) y particulada (membranas) de *B. diazoefficiens*

La obtención de citosol y membranas de *B. diazoefficiens* se llevó a cabo mediante rotura de las células por diferencia de presión mediante el uso de una prensa de French (SLM). Los cultivos celulares de *B. diazoefficiens* se centrifugaron a 8.000 g (10 min, 4°C) y se lavaron con tampón de lavado (Tabla 4.6). El pellet resultante se resuspendió en 2 ml de tampón de lisado (Tabla 4.6). Previamente a la rotura de las células, la célula de la prensa se preenfrió manteniéndola en una cámara frigorífica o metiéndola en hielo. Asegurarse que la bola de nylon de la llave de la prensa está en

buenas condiciones y proceder al ensamblaje de la célula de la prensa, que consta de pistón, embolo, tapa, llave y grifo. Aplicar la suspensión celular en la célula de la prensa y proceder al lisado de las bacterias aplicando una presión constante de 120 MPa y dejando salir la suspensión lentamente por el grifo. Repetir el proceso otras dos veces.

Centrifugar el extracto de células resultante a 8.000 *g* (10 min, 4°C) para sedimentar las células que no se hayan roto. Recoger el sobrenadante y recentrifugar a 250.000 *g* (1 h, 4°C). El sobrenadante resultante se consideró como la fracción soluble (citosol). Resuspender el sedimento translúcido en 100 µl de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5 con ayuda de un asa de plástico, ésta se considera la fracción particulada (membranas).

4.2.4. Generación de cepas mutantes por delección en fase sin marcador

Para la generación de cepas de *B. diazoefficiens* mutantes en fase por delección se empleó el plásmido suicida pK18*mobsacB* portando una construcción con dos regiones de aproximadamente 600 pb colindantes al gen que se desea deleccionar. Cada una de las regiones incluye una pequeña porción del gen, que corresponden al inicio 5' y al final 3', la suma de estas dos porciones debe de resultar en un número de pb múltiplo a 3, para así no romper el marco abierto de lectura. De esta manera se asegura que con la delección no se van a generar proteínas aberrantes al variar el marco de lectura, y por otro lado no se elimina ningún elemento 5'- o 3'-UTR del transcripto, con la finalidad de evitar efectos polares sobre otros genes.

Para la construcción de los diferentes plásmidos derivados de pK18*mobsacB*, se amplificaron por PCR (ver apartado 4.4.4) ambos fragmentos de ADN necesarios para cada construcción empleando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (Thermo). Las dos parejas de oligonucleótidos necesarias para la amplificación de ambos fragmentos de ADN son portadoras, en sus extremos 5', de la secuencia diana para endonucleasas de restricción compatibles con su clonación en pK18*mobsacB* (Tabla 4.3). La correcta inserción de ambos fragmentos de PCR en el plásmido suicida se verificó mediante PCR, perfil de restricción y secuenciación.

Para la delección del gen de interés empleando el plásmido indicado (Tabla 4.2), se realizó una estrategia de recombinación doble con la finalidad de la sustracción de la

región cromosómica deseada. Para ello, empleando la cepa donadora de *E. coli* S17.1 portadora del plásmido indicado, se introdujo el plásmido en la cepa parental de *B. diazoefficiens* USDA 110, o una de las cepas mutantes en el caso de realizar una cepa mutante múltiple (ver apartado 4.4.13). Se seleccionan los clones transconjugantes por resistencia a kanamicina. Los clones seleccionados se transfieren en estría a una placa nueva de PSY Km. Por PCR se verifica la recombinación correcta del plásmido, comprobando a su vez si la recombinación ha ocurrido con el fragmento 5' o 3'. Una vez comprobados los clones, se induce la recombinación doble sembrando en estriado los clones seleccionando en una placa de PSY adicionada con glucosa al 10%, debido a la sensibilidad a glucosa que confiere el plásmido pK18*mobsacB*, únicamente los clones que pierdan el plásmido podrán crecer en presencia de glucosa. Esperar hasta la aparición de colonias, transferir los clones con una misma punta por colonia a dos placas independientes de PSY, una con kanamicina y otra sin kanamicina. Comprobar si se ha conseguido la delección del gen, amplificándolo por PCR en los clones que han crecido en ausencia de kanamicina, pero no en su presencia. Se recomienda realizar varias comprobaciones por PCR, con diferentes combinaciones de oligonucleótidos para verificar la correcta delección del gen de interés.

4.3. Métodos Analíticos

4.3.1. Determinación de actividad nitrato reductasa (NR)

La determinación de actividad nitrato reductasa en cultivos celulares se realizó empleando la metodología descrita por (Delgado *et al.*, 1989). Para ello, centrifugar el cultivo a 8.000 *g* (10 min, 4°C) y lavarlo con Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), determinar la presencia de nitrito en el sobrenadante del lavado y repetir hasta no detectar nitrito. Resuspender el cultivo celular con Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), guardar una alícuota de suspensión celular para cuantificar proteína (ver apartado 4.3.7) y proceder como sigue.

- 1.- Mezclar 250 μ l de mezcla NR (Tabla 4.6) con 200 μ l de suspensión o extracto celular (0,3 - 0,5 mg de proteína).
- 2.- Iniciar la reacción adicionando 50 μ l de ditionito sódico 46 mM en Tris-HCl 500 mM pH 7,5. Mezclar con suavidad e, inmediatamente, colocar los tubos a 30°C.

3.- Mantener la reacción a 30°C durante 15-30 minutos, tiempo en el que no debe desaparecer la coloración azul de la mezcla de reacción. La reacción se detiene agitando los tubos hasta la desaparición del color azul. Los controles se obtienen agitando las mezclas de reacción vigorosamente en el momento de la adición del ditionito sódico para su completa oxidación.

Una vez detenida la reacción, en ausencia completamente de la coloración azul de los tubos, se procedió a la determinación del nitrito presente en cada tubo (ver apartado 4.3.3). Los resultados son expresados como nmoles de nitrito generados por min^{-1} y mg de proteína⁻¹.

4.3.2. Determinación de actividad nitrito reductasa (NiR)

La determinación de actividad nitrito reductasa en cultivos celulares se realizó cuantificando la desaparición de nitrito en el medio de reacción, de acuerdo al procedimiento descrito por Delgado *et al.*, 1992. Para ello, centrifugar el cultivo a 8.000 g (10 min, 4°C) y lavarlo con Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), determinar la presencia de nitrito en el sobrenadante del lavado y repetir hasta no detectar nitrito. Resuspender el cultivo celular con Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), guardar una alícuota de suspensión celular para cuantificar proteína (ver apartado 4.3.7) y proceder como sigue.

1.- Mezclar 250 μl de mezcla NiR (Tabla 4.6) con 200 μl de suspensión o extracto celular (0,3 - 0,5 mg de proteína).

2.- Iniciar la reacción adicionando a la mezcla 50 μl de ditionito sódico 144 mM disuelto en NaHCO_3 300 mM. Mezclar suavemente de forma manual y colocar los tubos a 30°C.

3.- Mantener la reacción a 30°C durante 15-30 minutos, tiempo en el que no debe desaparecer la coloración azul de la mezcla de reacción. La reacción se detiene agitando los tubos hasta la desaparición del color azul. Los controles se obtienen agitando las mezclas de reacción vigorosamente en el momento de la adición del ditionito sódico para su completa oxidación.

Una vez detenida la reacción, en ausencia completamente de la coloración azul de los tubos, se procedió a la determinación del nitrito presente en cada tubo (ver apartado

4.3.3). Los resultados son expresados como nmoles de nitrito consumidos por min^{-1} y mg de proteína⁻¹.

4.3.3. Determinación de nitrito

Para la valoración del nitrito se utilizó la reacción de diazotación de Griess-Yllosway que emplea la sulfanilamida y el ácido N-naftil-etilén-diamino (NNEDA) como reactivos. A un volumen de muestra se adicionan volúmenes iguales de sulfanilamida y de NNEDA (Tabla 4.6). Agitar e incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos. A continuación, determinar la absorbancia a DO_{540} y ajustar a una curva patrón preparada a partir de concentraciones conocidas de NaNO_2 .

4.3.4. Determinación de óxido nitroso

La producción de óxido nitroso (N_2O) se determinó mediante cromatografía gaseosa. Se tomaron muestras de 1 ml del espacio gaseoso de los frascos que contenían cultivos celulares y se inyectaron en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo 5890, equipado con un detector de conductividad térmica y una columna metálica (180 cm x 3,2 mm) empaquetada con Porapak Q de 80-100 mesh. La temperatura del horno, inyector y detector fue de 60°C . Como gas portador se empleó helio a un flujo de 55 ml/minuto. Los picos de N_2O se indentificaron por comparación con el correspondiente patrón. Igualmente la concentración de N_2O en las muestras se calculó por referencia a la curva patrón que se construyó con volúmenes conocidos de N_2O . La concentración total de N_2O presente en el recipiente de cultivo se calculó extrapolando la concentración del espacio de cabeza con la solubilidad del N_2O en el medio y la temperatura, aplicando la ley de Henry (Sander, 1999).

4.3.5. Determinación de óxido nítrico

La detección de NO para la determinación de su consumo y producción se realizó mediante amperimetría (Serpe & Zhang, 2006), usando un electrodo Apollo 4000 (World Precision Instruments, Inc., USA) montado con una membrana selectiva para NO.

4.3.5.1. Preparación del sistema electrodo-membrana

La membrana selectiva para NO se suministra montada en una funda que impermeabiliza al electrodo de cualquier líquido, así como de gases disueltos, excepto el NO. Para su montaje o cambio de membrana se realizan los siguientes pasos:

1.- Con el electrodo conectado, retirar la funda protectora o la membrana antigua, desenroscándola del electrodo. Sumergir el electrodo en agua desionizada, al menos durante 15 minutos, la señal debe subir hasta salir de escala durante este paso.

2.- Introducir 100 μ l de electrolito para electrodos de NO (World Precision Instruments, Inc., USA) en el interior de la funda de membrana, para ello utilizar el aplicador suministrado con el electrodo, con cuidado de no formar burbujas. Acoplar la rosca de la funda de membrana con cuidado de no dañar la membrana.

3.- Secar el electrodo con papel, en este momento la señal vuelve a valores bajos. Introducir el electrodo en la funda de membrana y enroscar hasta que el electrodo presione con suavidad la membrana. La presión excesiva del electrodo contra la membrana puede llegar a dañarla.

4.- Montar el electrodo con la funda en la cámara de anaerobiosis, para ello insertar la rosca de metacrilato sobre la funda de membrana y a continuación insertar una arandela de goma. Enroscar la rosca de metacrilato en la cámara de anaerobiosis hasta asegurar la estanqueidad del sistema.

5.- Añadir agua desionizada hasta que el sistema electrodo-funda quede sumergido y esperar hasta que la señal se estabilice.

5.- Verificar la integridad de la membrana sustituyendo el agua por una solución de NaCl 1 M. Si la membrana está dañada la señal subirá hasta salir de escala, si la integridad de la membrana es buena, la señal no debe alterarse con respecto a cuando estaba sumergido en agua.

4.3.5.2. Calibración del sistema

4.3.5.2.1. Calibración con una solución acuosa de NO

Una solución acuosa saturada en NO fue generada como se indica en (Bricio *et al.*, 2014). Para ello, se prepara un tubo de 5 ml Vacutainer (BD), para pruebas bioquímicas, con 3 ml de agua-HCl pH3, y un tubo de 17 ml con 0,25 g de NaNO₂ cerrado herméticamente con un tapón de goma. A éste último, se le extrae todo el aire posible con una bomba de vacío, y a continuación, se inyectan 3 ml de solución ácida de sulfato ferroso (Tabla 4.6), que reacciona con el nitrito para generar una gran cantidad de NO gaseoso. Con precaución, extraer 8 ml de gas desde el tubo de 17 ml para inyectarlos en el tubo con la solución de agua-HCl, que se utiliza finalmente como solución saturada de NO (1,91 mM a 20°C).

Cantidades crecientes, desde 10 µl, de la solución saturada de NO, son inyectadas en la cámara del electrodo, previamente preparada con 1,66 ml de tampón fosfato 25 mM a pH 7,4, 100 µl de una mezcla de enzimas con glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* (40 U·ml⁻¹) y catalasa hepática bovina (250 U·ml⁻¹; Sigma), 90 µl de succinato sódico 1 M y 100 µl de glucosa 320 mM, que se dejan actuar durante 5 min para crear condiciones anóxicas.

4.3.5.3. Determinación de consumo de NO

Previamente a la determinación, 300 ml de cultivo de *B. diazoefficiens* inducido anaeróbicamente se centrifuga 8.000 g (10 min, 4°C) y se lava dos veces con tampón fosfato 25 mM a pH 7,4. El sedimento final de células se resuspende en 2 ml de tampón fosfato 25 mM a pH 7,4. La tasa de consumo de NO se determina como se describe a continuación:

1.- Sobre la cámara del electrodo añadir 760 µl de tampón fosfato 25 mM a pH 7,4, 900 µl de suspensión celular, 100 µl de una mezcla de enzimas con glucosa oxidasa de *As. niger* (40 U·ml⁻¹) y catalasa hepática bovina (250 U·ml⁻¹; Sigma), 90 µl de succinato sódico 1 M y 100 µl de glucosa 320 mM. Cerrar la cámara y dejar incubando a 30°C durante 5 min para generar condiciones anóxicas y atemperar las células.

2.- Añadir 50 µl de la solución saturada de NO y registrar la respuesta amperométrica hasta que todo el NO es consumido.

3.- Para calcular la tasa de consumo de NO hay que tener en cuenta el descenso de NO registrado en la cámara durante un minuto en el que éste sea lineal.

Los datos son expresados como nmoles de NO consumidos por h⁻¹ y mg de proteína⁻¹

4.3.6. Determinación de actividad β-galactosidasa

La actividad β-galactosidasa se determinó siguiendo la metodología que se describe a continuación (Sambrook & Russell, 2001).

1.- Tomar alícuotas de 2 ml de cultivo en tubos de microcentrífuga, centrifugar a 13000 rpm durante 3 minutos, eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en 2 ml de medio de cultivo nuevo. Pasar 300 μl a un pocillo de placa elisa y medir DO₅₉₅. El resto conservar en hielo.

2.- Pasar 1,5 ml de cultivo a un tubo de ensayo, a continuación, añadir 2 ml de tampón Z, 100 μl de cloroformo y 250 μl de SDS al 0,1% en tampón Z. Agitar en vortex durante 15 s, la solución debe ponerse turbia y blanquecina. Incubar a 30°C durante 5 a 10 min para templar la reacción y separar las dos fases.

3.- Tomar cuatro alícuotas de 750 μl de la fase acuosa superior, de la cual 300 μl corresponden a cultivo, y poner en tubos de microfuga independientes.

4.- Adicionar 150 μl de la solución de ONPG a cada tubo. Iniciar el cronometraje de la reacción, mezclar ligeramente e incubar los tubos a 30°C hasta que alcancen un color amarillo moderado. Adicionar 350 μl de Na₂CO₃ 1M para detener la reacción, anotando el tiempo transcurrido.

5.- Centrifugar a 13000 r.m.p. durante 5 minutos y con cuidado de no arrastrar restos celulares pasar 300 μl de cada tubo a diferentes pocillos de la placa elisa y medir a DO₄₂₀ y DO₅₅₀.

La actividad β-galactosidasa se expresa en unidades Miller (U), de acuerdo con la fórmula:

$$U = \frac{\{1000 \times (DO_{420} - DO_{550})\}}{\{t(\text{minutos}) \times V(\text{ml}) \times DO_{595}\}}, \text{ donde } DO_{420} \text{ y } DO_{550} \text{ son los valores de DO de la}$$

solución de la reacción y DO₅₉₅ son de la alícuota de cultivo que se toma al inicio del experimento; t= tiempo de incubación; V= volumen de cultivo (para este protocolo 300 μl, si la

actividad β -galactosidasa fuera muy baja o el cultivo tuviera una DO_{600} muy baja se puede tomar una alícuota mayor de cultivo y concentrarla por centrifugación, si se hace esta operación se debe considerar las diluciones que se hacen y restificarlas en los valores de V de cultivo o/y en la DO_{595}).

La actividad β -galactosidasa también se puede expresar teniendo en cuenta la concentración

$$\text{de proteína: } U/mg \text{ prot.} = \frac{\{1000 \times (DO_{420} - DO_{550})\}}{\{0,0045 \times t(\text{minutos}) \times V(\text{ml}) \times [\text{prot.}] (\text{mg/ml})\}}$$

donde 0,0045 es la absorbancia de 1 nmol de ONPG.

4.3.7. Determinación de proteína

4.3.7.1. Reactivo de Bio-Rad

Para la determinación de la concentración de proteína en extractos celulares y cultivos, se empleo el reactivo de Bradford 5X (Bio-Rad). En el caso de células enteras es necesario realizar el tratamiento previo de lisis que se describe a continuación:

1.- Tomar alícuotas de la muestra y adicionar 1 volumen de NaOH 1 M. Agitar en vórtex y hervir durante 20 minutos. Centrifugar a 12.000 rpm durante 5 min para eliminar los restos celulares. Tomar alícuotas de 25 a 50 μ l de las muestras y completar con agua destilada hasta un volumen final de 500 μ l. Una vez lisadas las células el protocolo es común para todo tipo de muestras.

2.- Tomar alícuotas de las muestras convenientemente diluídas y completar con agua destilada hasta un volumen final de 800 μ l.

3.- Adicionar 200 μ l de reactivo de Bradford (Bio-Rad).

4.- Agitar en vórtex e incubar entre 2 y 60 min. La concentración de proteína se calcula después de registrar los valores de absorbancia de las muestras a DO_{595} frente a un blanco que contiene 800 μ l de agua y 200 μ l del reactivo de Bradford.

La concentración de proteína se calculó mediante interpolación respecto a una curva patrón que se preparó con albúmina sérica bovina (Sigma).

4.3.8. Detección de citocromos tipo *c* en membranas de *B. diazoefficiens*

La detección de proteínas de membrana de *B. diazoefficiens* que contienen grupos hemo *c*, se realizó mediante la técnica de detección de actividad peroxidasa intrínseca a estos citocromos, descrita en (Delgado *et al.*, 2003).

4.3.8.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS)

Para la realización de geles de poliacrilamida y electroforesis de proteínas se ha empleado el material incluido en sistema Mini-Protean Tetra Handcast (Bio-Rad). Los geles empleados son de 1 mm de grosor con una concentración de poliacrilamida del 14% para el gel de resolución y del 4% para el de empaquetado (Tabla 4.6). Para la realización de los geles, entre los cristales montados sobre sus soportes y comprobada la estanqueidad, se vertió 4,5 ml de la solución del 14% de poliacrilamida justo después de añadir el APS y TEMED, para nivelar el gel se le añade encima 1 ml de isopropanol. Transcurridos 45 min, se elimina el isopropanol, se lava con abundante agua y se vierte 1 ml de la solución de poliacrilamida al 4% justo después de añadir el APS y TEMED, con cuidado de no introducir burbuja poner el peine para hacer los pocillos.

El sistema de electroforesis se monta encajando dos geles enfrentados en el casete formando un vaso, el sistema se introduce en la cubeta de electroforesis y se rellena con tampón de desarrollo (Tabla 4.6) hasta el borde superior de los cristales, y el vaso hasta la marca. El sistema debe de quedar montado de forma que los geles formen parte del circuito eléctrico entre el ánodo y el cátodo del sistema.

20 µg de proteínas de membrana mezclados con tampón de carga (Tabla 4.6) se cargan por carril, cargando 5 µl de marcador de peso molecular PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo) en uno de los carriles. La electroforesis se desarrolla a 20 mA hasta que el frente llega al final del gel.

4.3.8.2. Transferencia a membranas de nitrocelulosa

Para la detección de citocromos *c*, las proteínas del gel de poliacrilamida son transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Previamente, la membrana se lava durante 5 min en tampón de transferencia (Tabla 4.6), y además se empapan en el mismo tampón dos esponjas del sistema de electroforesis Miniprotean II (Bio-Rad) y

dos trozos de papel Whatman 3MM. Con estos elementos, se prepara un “sándwich” compuesto por una esponja, un trozo de papel Whatman, el gel de poliacrilamida, la membrana de nitrocelulosa, otro trozo de papel Whatman y otra esponja. La composición se empaqueta y se coloca en la cubeta de electroforesis, teniendo en cuenta que las proteínas migrarán hacia el polo positivo. La transferencia tiene lugar a 10 mA durante 3 h. Finalmente la membrana con las proteínas se lava con tampón fosfato 100 mM pH 7,5 adicionado con NaCl 100 mM.

4.3.8.3. Detección de citocromos tipo c

Para la detección de los citocromos c adheridos a la membrana de nitrocelulosa, ésta se incubó durante 3 minutos con 600 µl de la mezcla de reactivos SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo). La emisión de luz se detectó, colocando una película fotográfica (Hyperfilm β-max, Amersham) durante 15 minutos. La película se revela con líquidos revelador y fijador (Tetenal) según las instrucciones del producto. La película se escanea y analiza con el programa ImageLab (Bio-Rad).

4.4. Métodos de Biología Molecular

4.4.1. Obtención de ADN total de *B. diazoefficiens*.

4.4.1.1. Lisados por calor

Para el cribado por PCR de los diferentes candidatos, tanto de *E. coli* como de *B. diazoefficiens*, se obtuvieron preparaciones de ADN total mediante lisado de preparaciones celulares por calor.

1.- En tubos de microcentrífuga con 500 µl de agua ultrapura se resuspende una pequeña cantidad de células procedentes de cultivos sólidos o 25 µl de cultivo líquido en fase estacionaria de crecimiento. Centrifugar a 13.000 rpm durante 1 minuto y descartar sobrenadante.

2.- Resuspender el sedimento de células en 200 µl de agua ultrapura y hervir durante 10 min.

Antes de su utilización, las preparaciones se deben enfriar en hielo. Las muestras pueden conservarse durante una semana a 4°C. Emplear un volumen de lisado celular equivalente al 10% de la mezcla de reacción de PCR.

4.4.1.2. Método comercial

Cuando se requiere mayor pureza en las preparaciones de ADN total, ya sea por efecto de inhibición de la reacción de PCR al utilizar lisados por calor, o por la utilización de los productos de PCR para secuenciación o clonaje, se emplea el método comercial de Realpure Spin plantas y hongos (Real), siguiendo los siguientes pasos.

1.- Centrifugar 50 ml de cultivo de *B. diazoefficiens* en fase exponencial a 8.000 g (10 min, 4°C). Descartar el sobrenadante.

2.- Resuspender el sedimento de células en 1 ml de Tampón de Extracción, añadir 200 µl de Solución PVP y homogeneizar con vórtex. Añadir 200 µl de Solución SDS y homogeneizar con vórtex. Centrifugar a 13.000 rpm durante 5 min y pasar el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga nuevo.

3.- Añadir 200 µl de Solución de Precipitado e incubar durante 3 min en hielo. Centrifugar a 13.000 rpm durante 5 min y pasar el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga nuevo.

4.- Añadir un volumen de Solución de Lisis con proteinasa K, mezclar e incubar a 70°C durante 10 min. Adicionar 300 µl de isopropanol y trasvasar la mezcla a una columna suministrada por el kit. Centrifugar a 12.000 rpm y eliminar el líquido eluyente.

5.- Añadir 500 µl de Solución de Deshibición, centrifugar y eliminar eluyente. Realizar dos lavados con 500 µl de Solución de Lavado y finalmente centrifugar la columna sin adicionar nada durante 2 min a máxima velocidad.

6.- Eluir, en un tubo nuevo, con 50 µl de agua ultrapura precalentada a 70°C, dejando que se hidrate la columna durante un min y luego centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min. Cuantificar la concentración de ADN con el Nanodrop (ver apartado 4.4.8).

4.4.2. Obtención de ADN plasmídico de *E coli* (minipreps)

4.4.2.1. Método TENS

La extracción de ADN plásmido de *E. coli* para el cribado de candidatos correctos durante el proceso de clonaje de fragmentos de ADN en plásmidos, se realiza como se detalla a continuación.

1.- Inocular, con la cepa de *E. coli*, 3 ml de medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes e incubar a 37°C durante una noche. Centrifugar las células en tubos de microcentrífuga a 13.000 rpm durante un minuto y descartar el sobrenadante.

2.- Resuspender el sedimento de células en 300 µl de solución TENS (Tabla 4.6), a continuación, añadir 150 µl de ácido acético 3 M a pH 5,2 e inmediatamente después agitar en vórtex durante 5 s. Centrifugar a 13.000 rpm durante 10 min y traspasar el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga nuevo.

3.- Añadir 1 ml de etanol absoluto frío, mezclar y centrifugar durante 5 min. Descartar el sobrenadante y realizar un lavado con 200 µl de etanol al 70% frío.

4.- Secar el sedimento durante 10 min al vacío, y resuspender en 100 µl de agua ultrapura. Adicionar 1 µl de solución RNAsa (Tabla 4.6).

Para realizar digestiones de ADN por endonucleasas de restricción o amplificación por PCR, adicionar el equivalente al 10% del volumen de reacción.

4.4.2.2. Método comercial

Mayor pureza en las preparaciones de ADN plasmídico es necesaria cuando las muestras se destinan a secuenciación, se emplean para pasos subsecuentes de clonación o el método TENS no permite purezas o concentraciones de ADN necesarias para el cribado de candidatos en ciertos clonajes. El método comercial empleado durante este trabajo ha sido QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

1.- Inocular, con la cepa de *E. coli*, 3 ml de medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes e incubar a 37°C durante una noche. Centrifugar las células en tubos de microcentrífuga a 13.000 rpm durante un minuto y descartar el sobrenadante.

2.- Resuspender el sedimento de células en 250 µl de Solución P1. A continuación, añadir 250 µl de Solución P2, y por último, 350 µl de Solución N3 y agitar inmediatamente. Centrifugar a 13.000 rpm durante 10 min y aplicar el sobrenadante a una columna suministrada por el kit. Centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min y descartar el eluyente.

3.- Añadir 500 µl de Solución PB a la columna y centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min, descartar el eluyente. Añadir 750 µl de Solución PE a la columna y centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min, descartar el eluyente. Finalmente, centrifugar la columna sin añadir nada a máxima velocidad durante 1 min para eliminar los restos de etanol.

4.- Hidratar el ADN con 50 µl de agua ultrapura durante 1 min y eluir centrifugando sobre un tubo de microcentrífuga nuevo a 13.000 rpm durante 1 min. Cuantificar la concentración de ADN con el Nanodrop (ver apartado 4.4.8).

4.4.3. Obtención de ADN plasmídico de *B. diazoefficiens*

Para la comprobación de la presencia de plásmidos que se introducen en *B. diazoefficiens* mediante conjugación con *E. coli*, se ha realizado el aislamiento de ADN plasmídico según el protocolo que se se detalla a continuación:

1.- Inocular, con la cepa de *B. diazoefficiens*, 20 ml de medio PSY suplementado con los antibióticos correspondientes. Incubar a 30°C hasta que alcance la fase exponencial tardía de crecimiento. Centrifugar 5 ml de cultivo en tubos de microcentrífuga y eliminar el sobrenadante.

2.- Resuspender el sedimento de células en 500 µl de solución de lavado (Tabla 4.6), y lavar dos veces con esta solución. Resuspender el sedimento en 200 µl de solución MAXI (Tabla 4.6). Adicionar 400 µl de solución de lisis (Tabla 4.6) y mezclar por inversión de los tubos. Esperar de 10 a 15 min hasta que se observe una lisis adecuada.

3.- Adicionar 200 µl de solución de neutralizado (Tabla 4.6). Mezclar por inversión, e incubar en hielo durante 15 min. Centrifugar a 13.000 rpm durante 3 min, recoger el sobrenadante en un tubo nuevo y adicionar un volumen de isopropanol. Centrifugar a 13.000 rpm durante 15 min y descartar el sobrenadante.

4.- Adicionar 1 ml de etanol al 70% y centrifugar a 14.000 rpm durante 2 min. Eliminar el sobrenadante y secar el precipitado al vacío.

5.- Resuspender el precipitado en 20 µl de de agua ultrapura.

Debido al bajo número de copias de los plásmidos en *B. diazoefficiens*, es difícil, por regla general, detectarlo en geles de agarosa. Por ello, el ADN obtenido se empleó

para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α , y a partir de las cuales se obtuvo mayor cantidad de ADN plasmídico (ver apartado 4.4.2).

4.4.4. Amplificación de ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR se ha empleado con múltiples objetivos, como son, obtención de fragmento de ADN para su clonación en vectores, comprobación de la correcta construcción de plásmidos, comprobación y diferenciación de cepas recombinantes, experimentos de RT-PCR, localización del inicio de la transcripción y comprobación de contaminación de muestras de ARN por ADN.

Dependiendo de la finalidad de la reacción de PCR, se han empleado las siguientes DNA polimerasas: i) EuroTaq (Euroclone) para reacciones de PCR rutinarias como: comprobación de clones, verificación de la especificidad de oligonucleótidos, o la verificación de ausencia de ADN en muestras de ARN; ii) Phusion (Thermo) para reacciones de PCR donde se requiere la máxima fidelidad de la secuencia de ADN amplificada, se emplea para obtención de fragmentos de ADN que van a ser utilizados para su clonaje en vectores; iii) *Pfu* (Thermo) para la amplificación de fragmentos de ADN grandes o, en ciertos casos cuando no se obtiene éxito con la polimerasa Phusion, en sustitución de esta.

La mezcla de reacción con las diferentes polimerasas, para una reacción de 20 μ l, se detalla a continuación (Tabla 4.7):

	EuroTaq	Phusion	<i>Pfu</i>
Tampón	2 μ l	4 μ l	2 μ l
MgCl₂ (50 mM)	0,6 μ l	-	-
dNTP (10 mM)	0,4 μ l	0,4 μ l	0,4 μ l
Oligonucleótido A (10 μM)	2 μ l	1,6 μ l	2 μ l
Oligonucleótido B (10 μM)	2 μ l	1,6 μ l	2 μ l
ADN polimerasa (5 U/μl)	0,1 μ l	0,1 μ l	0,1 μ l

	EuroTaq	Phusion	Pfu
ADN molde	100 ng	20 ng	100 ng
DMSO (opcional)	1 μ l	-	-
Agua	Hasta 20 μ l	Hasta 20 μ l	Hasta 20 μ l

Tabla 4.7. Mezcla de reacción para PCR.

Para llevar la reacción se emplean los termocicladores con tapa calefactable Mastercycler 5333 (Eppendorf), GeneAmp 2400 (PerkinElmer) y Px2 (Thermo). El programa de amplificación se diseña según las especificaciones de la polimerasa, como se detalla a continuación (Tabla 4. 8):

		EuroTaq	Phusion	Pfu
Desnaturalización	X 1	95°C – 5 min	98°C – 30 s	95°C – 3 min
Desnaturalización	X 30	95°C – 30 s	98°C – 10 s	95°C – 30 s
Anillamiento		Tm-5°C – 30 s	Tm – 30 s	Tm-5°C – 30 s
Extensión		72°C – 1 min/Kb	72°C – 30 s/Kb	72°C – 2 min/Kb
Extensión	X 1	72°C – 10 min	72°C – 10 min	72°C – 10 min
Almacenamiento	∞	4°C	4°C	4°C

Tabla 4. 8. Programas para reacciones de PCR.

4.4.5. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La separación y visualización de fragmentos de ADN, ya sean procedentes de una PCR, miniprep o digestión, se realiza mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa preparada en TBE 0,5x (Tabla 4.6), también empleado como tampón de desarrollo. El sistema utilizado para realizar la electroforesis es Mini-Sub Cell GT Cell (Bio-Rad). La concentración de agarosa, para electroforesis de rutina es del 0,7%, incrementándose al 1% para la diferenciación de fragmentos menores de 500 pb. Para cargar las muestras en los geles de agarosa, éstas se mezclaron con tampón de carga 6x (Tabla

4.6). La electroforesis se desarrolla, rutinariamente, a 100 V, hasta que el frente alcanza 3/4 partes de la longitud del gel.

Para la visualización de las muestras, el tampón de carga incorpora GelRed (Biotium) al 2%, un fluoróforo intercalante del ADN que emite luz a una longitud de onda de 605 nm al estar unido a ADN y ser excitado por luz ultravioleta (250 nm). Para el revelado de los geles se ha empleado el sistema GelDoc XR (Bio-Rad) y el software de análisis de imagen Quantity One (Bio-Rad) e ImageLab (Bio-Rad).

4.4.6. Purificación de fragmentos de PCR

En caso de utilizar un fragmento de ADN procedente de una PCR, para su digestión por endonucleasas de restricción o su clonación directa en un vector, es necesario purificar el ADN para eliminar restos de tampón, oligonucleótidos, dNTPs o el ADN molde.

4.4.6.1. Purificación de fragmentos de PCR

En caso que de que, como resultado de la PCR, se obtenga un único producto, éste puede ser purificado utilizando el kit QIAquick PCR Purification (Qiagen), siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante:

1.- Adicionar el producto de PCR con 5 volúmenes de Tampón PB, mezclar y verificar que la mezcla, con indicador de pH, permanece amarilla. Echar la mezcla en una columna suministrada por el Kit y centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min. Desechar el eluyente.

2.- Lavar con 750 µl de Tampón PE, centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min y desechar el eluyente. Volver a centrifugar la columna a máxima velocidad durante 1 min para eliminar restos de etanol. Adicionar 30 µl de Tampón EB, dejar hidratar el ADN durante 1 min y eluir el producto, sobre un tubo de microcentrífuga nuevo, centrifugando a 13.000 rpm durante 1 min. Cuantificar la concentración de ADN con el Nanodrop (ver apartado 4.4.8).

4.4.6.2. A partir de geles de agarosa

En caso que de que, como resultado de la PCR o de una digestión con endonucleasas de restricción, se obtenga múltiples productos, selectivamente, puede ser purificado uno de ellos mediante extracción de una banda desde un gel de agarosa. Para ello se

emplea el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen), siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante:

1.- Cortar y extraer el trozo de agarosa que contiene la banda que se desea purificar y depositarla en un tubo de microcentrífuga tarado. Adicionar 3 μ l de Tampón GC por mg de agarosa e incubar 50°C durante 10 min, hasta que la agarosa se haya disuelto completamente. Verificar que la mezcla, con indicador de pH, permanece amarilla. Aplicar la mezcla en una columna suministrada por el Kit y centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min. Desechar el eluyente.

2.- Adicionar 0,5 ml de Tampón QC, centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min y desechar el eluyente. Lavar con 750 μ l de Tampón PE, centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min y desechar el eluyente. Volver a centrifugar la columna a máxima velocidad durante 1 min para eliminar restos de etanol. Adicionar 30 μ l de Tampón EB, dejar hidratar el ADN durante 1 min y eluir el producto, sobre un tubo de microcentrífuga nuevo, centrifugando a 13.000 rpm durante 1 min. Cuantificar la concentración de ADN con el Nanodrop (ver apartado 4.4.8).

4.4.7. Aislamiento de ARN total de células de *B. diazoefficiens*

La extracción de ARN total de cultivos de *B. diazoefficiens* inducidos en diferentes condiciones, así como su purificación de restos de ADN y proteínas se realizó como se detalla a continuación.

1.- Para detener la actividad celular de los cultivos, en tubos de centrífuga RNAsa free (Labcon) se mezcló 35 ml de cultivo con 5 ml de Solución de Parada (Tabla 4.6) y se centrifugó a 8.000 *g* (10 min, 4°C). Eliminar el sobrenadante, el pellet de células, si es necesario, se puede congelar en nitrógeno líquido y guardarlo a -80°C hasta su utilización.

2.- Resuspender el sedimento celular en 1,4 ml de Solución de Lisis e incubar a 60°C durante 10 min, agitando periódicamente. Adicionar 0,28 ml de cloroformo y agitar vigorosamente en vórtex. Centrifugar a 10.000 *g* (10 min, 4°C), pasar el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga.

3.- Adicionar 0,66 ml de isopropanol frío, e incubar a -20°C durante 15 min. Centrifugar a 13.000 rpm durante 15 min. Descartar sobrenadante y lavar el sedimento con etanol al 70%. Resuspender el sedimento de ARN con agua ultrapura adicionada al 0,1% con DEPC (Dietil dicarbonato). Cuantificar la concentración de ARN con el Nanodrop (ver apartado 4.4.8), y comprobar su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa.

4.- Eliminar los restos de ADN tratando las muestras de ARN, añadiendo hasta 60 µg de ARN en un tubo de microcentrífuga con 25 µl de Solución DNAsa (Tabla 4.6), e incubar a 37°C durante 1 h. Volver a comprobar por electroforesis en gel de agarosa la integridad de ARN. Verificar la ausencia total de ADN realizando una reacción de PCR tomando 1 µl de la muestra de ARN, debe de no amplificar ningún producto.

5.- Extraer el ARN con 1 volumen de mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (Ambion), centrifugar a 13.000 rpm (5 min, 4°C) y extraer la fracción superior acuosa. Precipitar el ARN adicionando el 10% de acetato sódico 3M pH 4,8 y dos volúmenes de etanol absoluto. Mantener a -80°C durante una noche, centrifugar a 13.000 rpm durante 15 min. Descartar sobrenadante y lavar el sedimento con etanol al 70%. Resuspender el sedimento de ARN con agua ultrapura adicionada al 0,1% con DEPC. Cuantificar la concentración de ARN con el Nanodrop (ver apartado 4.4.8), y comprobar su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa.

4.4.7.1. Reverso transcripción

La obtención de ADN complementario, se realizó mediante reacción de reverso transcripción. Para ello se empleó la enzima SuperScript II (Invitrogen).

1.- En un tubo de PCR depositar 5 µg de ARN total, junto a 2 µl de un oligonucleótido (10 µM), específico o aleatorio, y 1 µl de dNTPs (10 mM), y enrasar a 12 µl con agua ultrapura. Incubar a 65°C durante 5 min, y pasar a hielo.

2.- Añadir 4 µl de Tampón de Reacción 5X, 2 µl de Solución de DTT y 1 µl de Solución RNaseOUT (40 U/µl; Invitrogen). Incubar a 42°C, en el caso de usar oligonucleótidos específicos, o a 25°C durante 2 min.

3.- Añadir 1 µl de reverso transcriptasa, y realizar el ciclo de incubación, 25°C 10 min, 42°C 50 min y 70°C 15 min.

4.- Eliminar el ARN de la muestra por lisis alcalina añadiendo 15 μ l de NaOH 1 M, e incubar a 65°C durante 30 min, a continuación neutralizar el pH añadiendo 15 μ l de HCl 1 M. Purificar el cDNA como si fuera un producto de PCR (apartado 4.4.6.1). Añadir alícuotas de 15 μ l ácido acético 3 M pH 5,2 hasta que el indicador de pH del Tampón PB sea amarillo.

En caso de emplear oligonucleótidos aleatorios se puede cuantificar la concentración de ADN con el Nanodrop (ver apartado 4.4.8), sin embargo, la concentración de ADN obtenida por oligonucleotidos específicos es demasiado baja para cuantificar por Nanodrop.

4.4.8. Determinación de la concentración de ADN y ARN

La concentración de ADN y ARN en soluciones acuosas fue determinada mediante espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 260 nm. Para ello se empleó el equipo NanoDrop ND-1000 (Thermo), el cual realiza un barrido del espectro UV desde 220 a 350 nm. Para realizar la medida, previamente se debe seleccionar el tipo de ácido nucleico que se desea medir, ARN o ADN de cadena doble o sencilla. Una vez limpio el pedestal, el sistema nos pedirá que pongamos una gota de agua para ajustar el equipo, a continuación, se realiza el blanco, para ello colocar sobre el pedestal una gota de entre 1 y 2 μ l de la solución donde esté diluido el ácido nucleico de la muestra, ya sea agua o Tampón TE, y pulsar el botón correspondiente a blanco. Una vez hecha la línea base, se carga sobre el pedestal de 1 a 2 μ l de muestra y se pulsa el botón de medida. El sistema nos mostrará el espectro de absorbancia de la muestra, junto al dato de concentración en ng/ μ l y los datos de A_{260} , A_{280} y los ratios 260/280 y 260/230. Estos dos ratios nos indican el grado de pureza de la muestra, el ratio 260/280 debe de estar próximo a 1,8 en muestras de ADN y 2 en muestras de ARN, si es considerablemente menor indica una posible contaminación por proteínas o disolventes orgánicos cuyo pico de absorción es próximo a 280 nm. El ratio 260/230 debe situarse en torno a 1,8 – 2,2, y también nos puede indicar la presencia de contaminantes co-purificados en la muestra.

Los datos de concentración de ácidos nucleicos pueden ser validados en una electroforesis en gel de agarosa, comparando la intensidad de banda con las del

marcador de concentraciones conocidas de ADN GeneRuler 1 Kb Plus DNA (Thermo), ya sea directamente o con el software ImageLab (Bio-Rad).

4.4.9. Secuenciación de ADN

La verificación de los fragmentos de ADN clonados en los diferentes plásmidos, se realizó secuenciando la parte de interés de éstos mediante el método Sanger. Para ello se han empleado los servicios de secuenciación del centro. Siguiendo sus instrucciones, en primer lugar, para la purificación de las diferentes muestras se ha empleado agua ultrapura. Las mezclas de secuenciación, se prepararon echando a un tubo de microcentrífuga de 500 µl, de 400 a 800 ng de ADN plasmídico, o de 10 a 80 ng de producto de PCR, 6,4 pmoles de un único oligonucleótido desde el que se inicia la lectura (6,4 µl de oligonucleótido 10 µM) y completar hasta 12 µl con agua ultrapura.

Los resultados fueron analizados con los programas FinchTV y CloneManager.

4.4.10. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

La digestión de ADN se empleó tanto para la clonación en vectores, como para la verificación de las construcciones comparando el patrón de digestión con el teórico simulado con el software CloneManager.

Se han empleado las enzimas endonucleasas de restricción FastDigest (Thermo) siguiendo las indicaciones del producto. A continuación, se muestran las características más importantes de cada enzima (Tabla 4.9).

Nombre	Diana	Tiempo reacción (min)		Inactivación
		Plásmidos 1 µg	PCR 0,2 µg (pb prot.)	
BamHI	G/GATCC	5	5 (2)	5 min/80°C
BglII	A/GATCT	20	30 (3)	---
BstXI	CCANNNNN/NTGG	5	5 (4)	5 min/80°C
EcoRI	G/AATTC	5	20 (2)	5 min/80°C
EcoRV	GAT/ATC	5	5 (2)	---

Nombre	Diana	Tiempo reacción (min)		Inactivación
		Plásmidos 1 µg	PCR 0,2 µg (pb prot.)	
<i>HindIII</i>	A/AGCTT	5	20 (3)	10 min/80°C
<i>KpnI</i>	GGTAC/C	5	5 (3)	5 min/80°C
<i>MreI</i>	CG/CCGGCG	5	5 (3)	5 min/80°C
<i>MunI (MfeI)</i>	C/AATTG	5	5 (3)	---
<i>NcoI</i>	C/CATGG	5	10 (3)	15 min/65°C
<i>NdeI</i>	CA/TATG	5	60 (3)	5 min/65°C
<i>NheI</i>	G/CTAGC	15	5 (5)	5 min/65°C
<i>NotI</i>	GC/GGCCGC	30	5 (2)	5 min/80°C
<i>NsiI</i>	ATGCA/T	5	5 (3)	15 min/65°C
<i>PstI</i>	CTGCA/G	5	30 (3)	---
<i>SacI</i>	GAGCT/C	5	30 (1)	5 min/65°C
<i>SalI</i>	G/TCGAC	5	≥60 (3)	10 min/65°C
<i>SmaI</i>	CCC/GGG	5	5 (1)	5 min/65°C
<i>SpeI</i>	A/CTAGT	5	5 (1)	---
<i>SphI (PaeI)</i>	GCATG/C	5	5 (5)	5 min/65°C
<i>SspI</i>	AAT/ATT	5	5 (2)	5 min/65°C
<i>TasI</i>	/AATT	5 *(65°C)	5 (3) *(65°C)	---
<i>XbaI</i>	T/CTAGA	5	5 (2)	20 min/65°C
<i>XhoI</i>	C/TCGAG	5	5 (2)	5 min/80°C

Tabla 4.9. **Endonucleasas de restricción.** Enzimas empleadas durante la Tesis Doctoral. Se muestra la secuencia diana indicando el sitio de corte en la hebra 5' - 3'. Entre paréntesis se indican las bases protectoras necesarias en el extremo 5' para el corte de fragmentos de PCR. * *TasI* requiere la incubación a 65°C.

La reacción de restricción se realiza en tubos de microcentrífuga con hasta 1 µg de ADN plasmídico o 0,2 µg de ADN de PCR, 1 µl de Tampón de reacción, con o sin tampón de carga incorporado, 0,5 µl de endonucleasa y hasta 10 µl de agua ultrapura. Se pueden realizar reacciones con varias endonucleasas, siempre que el volumen de enzimas no supere el 10% del volumen de reacción. Las reacciones se incuban a 37°C durante el tiempo requerido (Tabla 4.9).

En caso de utilizar el fragmento digerido para su clonación, las endonucleasas deben ser inactivadas, para ello se trataran térmicamente, si es posible (Tabla 4.9), o se realizará una extracción fenólica para eliminar las enzimas. Para ello, adicionar un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y agitar con vórtex durante 10 s, a continuación centrifugar a 13.000 rpm durante 5 min y recoger la parte superior acuosa. Añadir 5 volúmenes de etanol absoluto e incubar a -80°C durante una hora o a -20°C durante una noche para que el ADN precipite. Centrifugar a 13.000 rpm durante 5 min, eliminar el sobrenadante y lavar con 200 µl de etanol al 70% frío. Secar la muestra al vacío e hidratar con 10 µl de agua ultrapura.

4.4.11. Ligación de fragmentos de restricción en vectores de clonación

4.4.11.1. Ligación a vectores de clonación

La ligación entre un fragmento de ADN y un vector digeridos con enzimas de restricción compatibles se realizó usando una relación molecular de al menos 1:3 de vector:inserto, independientemente de que los extremos a ligar sean romos o cohesivos. En un tubo de microfuga, adicionar:

- x µl de vector*
- y µl de inserto*
- 1 µl de ligasa (T4 DNA ligase, 1 U/µl. Roche)
- 1 µl de tampón de la ligasa 10x
- H₂O ultrapura hasta 10 µl.

Mezclar suavemente y centrifugar (1 pulso). Incubar a temperatura ambiente durante 1 h o a 4°C durante toda la noche. *Se ha de mantener la proporción vector:inserto en relación (moles) 1:3. La cantidad x + y debe ser de unos 100 ng.

4.4.11.2. Desfosforilación de vectores clonación

Para evitar la posible religación y la ligación entre dos moléculas del vector digerido, el mismo se puede desfosforilar mediante tratamiento con fosfatasa alcalina según el protocolo que se detalla continuación. Con el vector digerido con las enzimas de restricción adecuadas, preparar la reacción de defosforilación en un tubo de microfuga:

- Hasta 1 µg de vector digerido
- 1 µl de tampón de la fosfatasa alcalina 10x
- 0,5 µl de fosfatasa alcalina de camarón (Shrimp Alkaline Phosphatase, SAP, 1 U/µl. Thermo)
- H₂O ultrapura hasta 10 µl

Mezclar suavemente y centrifugar (1 pulso). Incubar a 37°C durante 30 min para extremos 5' protuberantes o 60 min para extremos 3' protuberantes o romos. Detener la reacción por inactivación por calor incubando 15 min a 65 °C.

4.4.12. Transformación de células de *E. coli*

4.4.12.1. Preparación de células competentes con RbCl

La preparación de células competentes de *E. coli* se ha realizado según la técnica descrita por Hanahan (Hanahan, 1983), de acuerdo con el siguiente protocolo.

- 1.- Con un preinóculo, de 5 ml en LB, de células de *E. coli* crecidas durante una noche, inocular un matraz con 100 ml de medio LB precalentado a 37°C e Incubar a 37°C hasta que el cultivo alcance un DO₆₀₀ de 0,4-0,6 (fase logarítmica). Detener el crecimiento colocando el cultivo en hielo durante 15 minutos.
- 2.- Centrifugar el cultivo, en tubos estériles, a 8.000 g (10 min, 4°C). Descartar el sobrenadante.

3.- Resuspender suavemente el sedimento celular en 30 ml de solución TFB1 estéril y fría a 4°C. Incubar en hielo durante 15 minutos. Centrifugar a 8.000 *g* (10 min, 4°C). Descartar el sobrenadante.

4.- Resuspender en 4 ml de solución TFB2 fría, y repartir en alícuotas de 100 µl en tubos de microcentrífuga preenfriados a 4°C. Guardar las alícuotas a -80°C.

Debido a la delicadeza de las células competentes, para evitar la lisis celular, todos los pasos se deben realizar en frío y sin estrés mecánico, pipeteando con delicadeza y sin emplear el vórtex. La conservación de las células de *E. coli* competentes a una temperatura superior de -80°C puede resultar en un descenso acusado del número de células transformadas.

4.4.12.2. Transformación de células competentes de *E. coli*

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:

1.- Descongelar las alícuotas de 100 µl de células competentes guardadas a -80°C manteniéndolas en hielo (15 a 20 min).

2.- Adicionar 100 ng de ADN de ligación o 25 ng de plásmido purificado que se pretenda emplear para transformar. Mezclar mediante agitación suave e incubar en hielo durante 30 min.

3.- Calentar (choque térmico) a 42°C durante 45 s. Dejar en hielo otros 5 minutos.

4.- Adicionar 4 volúmenes de medio LB. Incubar a 37°C con agitación durante 1 h. Preparar mientras tanto placas Petri con medio LB suplementado con los correspondientes antibióticos. Si se lleva a cabo una selección por color se puede adicionar al medio 40 µl de 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-Gal) a 20 mg/ml de dimetilformamida y 4 µl de 1-Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), 200 mg/ml

5.- Sembrar las placas con las células transformadas. Incubar a 37°C durante una noche.

4.4.13. Transferencia de ADN a células de *B. diazoefficiens* mediante conjugación

La transferencia de ADN a cepas de *B. diazoefficiens* se realizó mediante conjugación biparental con la cepa donadora *E. coli* S17.1 con el plásmido que se deseaba transferir, siguiendo estos pasos.

1.- Cultivar la cepa receptora (*B. diazoefficiens*) en un matraz con 20 o 50 ml de PSY suplementado con los antibióticos correspondientes hasta alcanzar la fase exponencial tardía de crecimiento, 4 o 5 días.

Un día antes de que la cepa receptora (*B. diazoefficiens*) llegue a fase exponencial tardía cultivar la cepa donadora (*E. coli* S17.1) en un tubo con 3 ml de LB suplementado con los antibióticos correspondientes durante una noche.

2.- Inocular un nuevo tubo de 3 ml de LB más antibióticos con 150 µl del cultivo de la cepa donadora (*E. coli* S17.1) y dejar crecer hasta fase logarítmica, aproximadamente 3 horas.

3.- Preparar una placa de PSY sin antibióticos.

4.- Centrifugar 5 ml del receptor (*B. diazoefficiens*) y, a continuación, 1 ml del donador (*E. coli* S17.1). Eliminar el sobrenadante. Lavar 2 veces con 1 ml de medio PSY.

5.- Resuspender el pellet en 100 µl de PSY y adicionar la mezcla resultante en el centro de la placa de PSY sin antibióticos, dejar secar la gota e incubar durante 48 horas a 30°C.

6.- Preparar dos placas de PSY con los antibióticos adecuados para la selección de los transconjugantes, siempre deben llevar cloranfenicol 15 µg/ml para evitar el crecimiento de *E. coli*.

7.- Recoger la gota con el asa de siembra y resuspende en 1 ml PSY sin antibiótico dentro de un tubo de microcentrífuga con ayuda de la pipeta.

8.- Sembrar 30 y 200 µl de la suspensión celular en las placas de PSY suplementado con los antibióticos adecuados para la selección de los transconjugantes. Incubar a 30°C hasta la aparición de colonias (8 a 10 días).

Las colonias obtenidas se siembran en estría en placas con los mismos antibióticos para su posterior verificación.

4.4.14. Ensayo de Co-transcripción (RT-PCR)

La identificación de la expresión de varios genes como unidad poliestrónica se realizó mediante amplificación por PCR de regiones intergénicas, sobre una librería de cDNA, obtenidas en condiciones en las que los genes de interés se expresen, según la metodología descrita en (Sambrook & Russell, 2001).

La obtención de ADNc (ver apartado 4.4.7.1), se realiza con oligonucleótidos específicos, que anillan a una distancia no superior a las 2 Kb de la región intergénica que se quiera comprobar. En caso de querer verificar un grupo de genes superior a las 2 Kb, se deben verificar los resultados con muestras de ADNc sintetizado con un oligonucleótido proximal a la región intergénica que no se haya podido amplificar. La obtención de ADNc se puede realizar con oligonucleótidos aleatorios, siempre que las regiones intergénicas no sean excesivamente grandes, debido a que esta metodología para la obtención de ADNc da como resultado fragmentos cortos que podrían dar falsos negativos cuando se amplifican por PCR.

La co-transcripción de dos genes, se confirma por un resultado positivo en la reacción de PCR (ver apartado 4.4.4). Como controles, por un lado, se realiza una reacción de PCR tomando como muestra ADN genómico, en la cual debemos obtener un producto claro y único, en caso contrario, la pareja de oligonucleótidos debe ser sustituida. Como control negativo, durante la obtención de ADNc, a un duplicado de las muestras no se le añade enzima reverso transcriptasa. Estas muestras, durante la reacción de PCR no deben originar ningún producto, en caso contrario, indicaría contaminación por ADN de las muestras de ARN.

4.4.15. Identificación del inicio de la transcripción (RACE)

Para la identificación del inicio de la transcripción del operón *narK* y el gen *nirA*, se realizó la técnica 5'-RACE (de sus siglas en inglés, rapid amplification of cDNA ends), descrita en (Sambrook & Russell, 2001).

Primeramente, se deben diseñar dos oligonucleótidos por promotor que se desea caracterizar. El primero (SP1) (Tabla 4.3) va a ser empleado para la reacción de transcripción inversa (apartado 4.4.7.1), debe estar situado relativamente próximo al supuesto inicio de la transcripción, 500 pb aproximadamente, y tener una longitud de

entre 20 y 30 nucleótidos. Para la obtención de ADN complementario también se pueden emplear oligonucleótidos aleatorios. El segundo oligonucleótido (SP2) (Tabla 4.3) debe diseñarse hacia 5' de SP1, en torno a unas 300 pb del supuesto inicio de la transcripción, e incorporar la secuencia diana para una enzima de restricción, que se empleará como adaptador. Una vez obtenido el ADNc con el oligonucleótido SP1, realizar los siguientes pasos.

1.- Añadir, al extremo 3' del ADNc, una cola de múltiples adeninas. Para ello, en un tubo de microcentrífuga añadir 11,5 µl de ADNc, 4 µl de dATP 1mM, 4 µl de tampón de reacción y 1,5 µl de enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (Thermo). Incubar la reacción a 37°C durante 15 min, y detener la reacción por choque térmico a 70°C durante 10 min. Purificar el producto con el kit de purificación de fragmentos de PCR (ver apartado 4.4.6.1).

2.- Con el producto de la purificación, realizar una reacción de PCR (ver apartado 4.4.4) utilizando simultáneamente los tres oligonucleótidos, (dT)₁₇-adaptor-primer, adaptor primer y SP2 (Tabla 4.3). El programa de PCR (Tabla 4.10) se realiza en dos etapas, la primera de cinco ciclos, con una temperatura de anillamiento de 48°C, idónea para para la unión del oligonucleótido (dT)₁₇ a la cola de adeninas del ADNc. La segunda parte del programa, con una temperatura adecuada para el anillamiento del oligonucleótido adaptor y SP2, 55°C.

Desnaturalización	X 1	95°C – 5 min
Desnaturalización		95°C – 30 s
Anillamiento	X 5	48°C – 30 s
Extensión		72°C – 45 s
Desnaturalización	X 30	95°C – 30 s
Anillamiento		55°C – 30 s
Extensión		72°C – 45 s

Extensión	X 1	72°C – 10 min
Almacenamiento	∞	4°C

Tabla 4.10. Programa PCR RACE.

3.- Purificar el producto con el kit de purificación de fragmentos de PCR (ver apartado 4.4.6.1). Digerir el producto y clonarlo en un vector de clonación, utilizando las enzimas cuyas secuencias diana se incluye en los oligonucleótidos SP2 y adaptor (Tabla 4.3), alternativamente se puede clonar el producto sin digerir, en el plásmido pGEM-T easy vector (Tabla 4.2; Promega). Transformar el producto de la ligación en células de *E. coli* DH5 α (ver apartado 4.4.12), seleccionar candidatos, según el tipo de selección del plásmido hospedador. Extraer el ADN plasmídico (ver apartado 4.4.2.2) y secuenciarlo (ver apartado 4.4.9).

El inicio de la transcripción se estableció como el nucleótido que aparece inmediatamente después de la serie repetida de adeninas. Al menos tres clones diferentes, indicando el inicio de la transcripción en el mismo nucleótido, son necesarios para considerarlo correcto.

4.5. Análisis bioinformáticos

En la siguiente tabla se relacionan las herramientas bioinformáticas empleadas en el transcurso de esta Tesis Doctoral (Tabla 4.11).

Programa	Descripción	Referencia
BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)	Programa de alineamiento de secuencias, ADN, ARN o proteínas, para compararla con la base de datos del NCBI.	(Altschul <i>et al.</i> , 1990)
Clustal W	Programa para el alineamiento múltiple de secuencias.	(Thompson <i>et al.</i> , 1994)
ExpASy (Expert Protein Analysis System)	Servidor de proteómica, para el análisis de secuencias y estructuras proteicas.	(Gasteiger <i>et al.</i> , 2003)

Programa	Descripción	Referencia
Clone Manager	Programa de simulación de estrategias de clonación, operaciones enzimáticas y representación gráfica de plásmidos	Sci-Ed Software
RegPrecise	Base de datos de factores de transcripción y sus secuencias diana.	(Novichkov <i>et al.</i> , 2013)
RNA fold	Servidor para la predicción de estructura secundaria de cadenas sencillas de ADN o ARN.	(Lorenz <i>et al.</i> , 2011)
Mfold	Servidor para la predicción de estructura secundaria de cadenas sencillas de ADN o ARN.	(Zuker, 2003)
Quantity One	Software de adquisición de imagen de los equipos de Bio-Rad	Bio-Rad
ImageLab	Software de análisis de imagen de geles	Bio-Rad

Tabla 4.11. Programas bioinformáticos.

5

RESULTS

CHAPTER I

An integrated biochemical system for nitrate
assimilation and nitric oxide detoxification
in *Bradyrhizobium diazoefficiens*

5.1. Chapter I. An integrated biochemical system for nitrate assimilation and nitric oxide detoxification in *Bradyrhizobium diazoefficiens*

5.1.1 Abstract

Rhizobia are recognised to establish N₂-fixing symbiotic interactions with legume plants. *Bradyrhizobium diazoefficiens*, the symbiont of soybeans, can denitrify and grow under free-living conditions with nitrate (NO₃⁻) or nitrite (NO₂⁻) as sole nitrogen source. Unlike related bacteria that assimilate NO₃⁻, genes encoding the assimilatory NO₃⁻ reductase (*nasC*) and NO₂⁻ reductase (*nirA*) in *B. diazoefficiens* are located at distinct chromosomal loci. The *nasC* gene is located with genes encoding an ABC-type NO₃⁻ transporter (NrtABC), a major facilitator family NO₃⁻/NO₂⁻ transporter (NarK), flavoprotein (Flp) and single-domain haemoglobin (Bjgb). However, *nirA* clusters with genes for a NO₃⁻/NO₂⁻ responsive regulator (NasS-NasT). Here we demonstrate NasC and NirA are key for NO₃⁻ assimilation and that growth with NO₃⁻, but not NO₂⁻ requires *flp*, implying Flp may function as electron-donor to NasC. In addition, *bjgb* and *flp* encode a nitric oxide (NO) detoxification system that functions to mitigate cytotoxic NO formed as a by-product of NO₃⁻ assimilation. Additional experiments reveal NasT is required for NO₃⁻ responsive expression of the *nark-bjgb-flp-nasC* transcriptional unit and the *nirA* gene, and that NasS is also involved in the regulatory control of this novel bipartite assimilatory NO₃⁻/NO₂⁻ reductase pathway.

5.1.2 Introduction

Fixation of atmospheric dinitrogen (N₂) by plant-associated symbiotic soil bacteria, collectively termed rhizobia, is a significant agricultural process that reduces dependence on synthetic nitrogen (N) containing fertilisers in crop production. This protects water quality and human health as well as the wider environment. In addition to N₂-fixation, the soybean endosymbiont *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110 is capable of growing anaerobically with the water-soluble nitrate (NO₃⁻) anion, as an alternative terminal electron acceptor to oxygen (O₂), which is reduced to N₂ gas by

respiratory denitrification. During this process, several free N-containing intermediates are produced, including: i) the oxyanion nitrite (NO_2^-) (Kim *et al.* 1999), ii) the gaseous cytotoxic free-radical nitric oxide (NO), and iii) the potent and long-lived greenhouse gas nitrous oxide (N_2O). In *B. diazoefficiens*, the denitrification apparatus is encoded by the *napEDABC*, *nirK*, *norCBQD* and *nosRZDFYLX* genes, which express the periplasmic NO_3^- reductase (NapABC), copper-containing NO_2^- reductase (NirK), cytochrome-c NO reductase (NorCB) and N_2O reductase (NosZ) enzymes, respectively (Bedmar *et al.*, 2005). This bacterium is distinguished by the ability to denitrify under both free-living and symbiotic conditions (Delgado *et al.*, 2007, Sánchez *et al.*, 2011, Bedmar *et al.*, 2013).

Several reports suggest that rhizobial denitrification is the main driver for production and release of the environmentally damaging agents NO and N_2O from alfalfa and soybean nodules (Meakin *et al.*, 2007, Sánchez *et al.*, 2010, Horchani *et al.*, 2011, Inaba *et al.*, 2012). NO is a highly reactive and well-studied ozone-depleting agent, while N_2O is increasingly recognised as a powerful greenhouse gas with an estimated 300-fold higher radiative potential for global warming, molecule for molecule, compared to carbon dioxide (Bates *et al.*, 2008, Crutzen *et al.*, 2008, Ravishankara *et al.*, 2009). Importantly, in active root nodules, NO also acts as a potent inhibitor of nitrogenase, the central enzyme of symbiotic N_2 -fixation (Kato *et al.*, 2010, Sánchez *et al.*, 2010). Under free-living denitrifying conditions, the *B. diazoefficiens* proteins NirK and NorCB are physiologically important for the synthesis and detoxification of NO, respectively (Bedmar *et al.*, 2005). However, several studies suggest the involvement of other sinks for NO that are distinct from the recognised denitrification pathway in nodules (Meakin *et al.*, 2006, Sánchez *et al.*, 2010). For example, in related bacteria, NO may be oxidised to NO_3^- , or reduced to N_2O by cytoplasmic detoxification enzymes. These systems include single-domain haemeoglobins (sdHbs), truncated haemeoglobins (trHbs), flavohaemeoglobins (FHbs) and flavorubredoxin (FIRd) (Poole, 2005, Pittman *et al.*, 2007, Mills *et al.*, 2008, Pullan *et al.*, 2008, Spiro, 2011).

Following sequencing of the *B. diazoefficiens* USDA 110 genome (Kaneko *et al.*, 2002), several studies have investigated the involvement of a putative bacterial single-domain haemoglobin, termed Bjgb, in NO-detoxification, under free-living conditions (Cabrera

et al., 2011, Sánchez *et al.*, 2011). This bacterial haemoglobin is encoded by the open reading frame (ORF) blr2807 and resides within a cluster of other uncharacterised ORFs (blr2803-09) predicted to encode components of a NO_3^- assimilation (Nas) pathway, including:

1. An ABC-type NO_3^- transport system (blr2803-05)
2. A major-facilitator superfamily (MFS)-type $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ transporter (blr2806)
3. An FAD-dependent NAD(P)H oxidoreductase (blr2808)
4. The catalytic subunit of the assimilatory NO_3^- reductase (blr2809), termed NasC.

The genome also contains, at a distinct locus on the chromosome:

5. A putative ferredoxin-dependent assimilatory NO_2^- reductase NirA (bll4571)
6. A $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ responsive regulatory system NasS-NasT (bll4572-73)

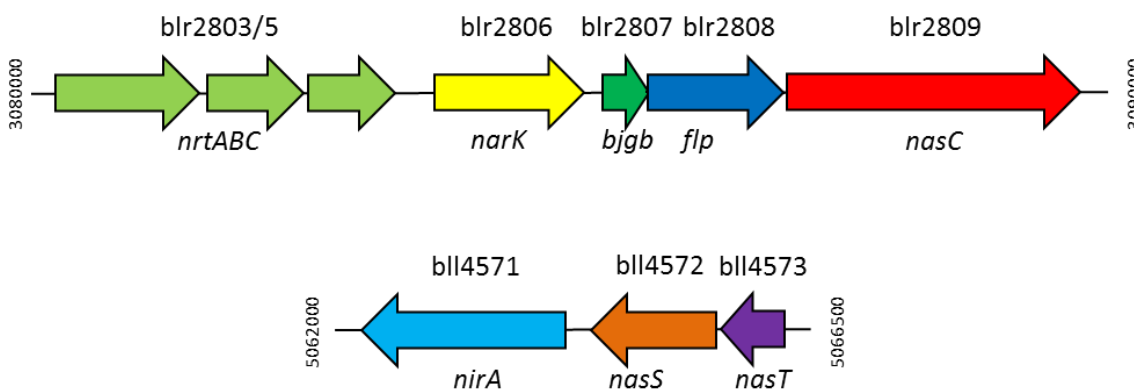


Figure 5.1.1. **Organisation of regulatory and structural genes for the assimilatory $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ reductase pathway in *B. diazoefficiens*.** This figure shows a schematic representation of the blr2803-5, blr2806-09 and bll4571-73 ORFs investigated in this study

The gene for the assimilatory NO_3^- reductase in *B. diazoefficiens* was previously termed NasA (Cabrera *et al.*, 2011, Sánchez *et al.*, 2011), but here we unify the gene nomenclature for α -proteobacteria. The putative *nirA* gene lies immediately downstream of genes reported to code for a $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ responsive regulatory system (NasS-NasT), similar to that characterised in the model NO_3^- -utilising soil bacterium *Paracoccus denitrificans* PD1222 (Luque-Almagro *et al.*, 2013, Sánchez *et al.*, 2014). However, to date, a role for the proteins encoded at blr2803-09 and bll4571-73 loci in $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ assimilation, and conceivably NO management in *B. diazoefficiens* remains to be established.

Although the biochemical components for Nas systems may be highly modular, in related α -proteobacteria such as *Pa. denitrificans* and *Rhodobacter capsulatus* E1F1, genes encoding regulatory and structural elements for the NO_3^- assimilation pathway are typically found together (Pino *et al.*, 2006, Gates *et al.*, 2011). For example, in *Pa. denitrificans* the genes required for import and reduction of NO_3^- and/or NO_2^- are encoded by *nasABGHC* and the *nasTS* genes required for $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ responsive regulatory control are found immediately upstream (Luque-Almagro *et al.*, 2011). Here, the assimilatory $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ reductase apparatus includes a: $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ transporter (NasA), NO_2^- reductase (NasB), ferredoxin (NasG), NO_2^- transporter (NasH), and NO_3^- reductase (NasC). Notably, the *nasG* gene is highly conserved in $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ assimilation gene clusters, which is consistent with a key role for the NasG ferredoxin in mediating electron flux from the NADH-oxidising site in NasB to the sites of NO_3^- and NO_2^- reduction in NasC and NasB, respectively, in order to prevent intracellular accumulation of NO_2^- (Luque-Almagro *et al.*, 2011). In *Pa. denitrificans*, the RNA-binding protein NasT has been recently shown to positively and directly regulate *nas* expression (i.e. *nasABGHC*) by interacting with the *nasA*-leader mRNA. The $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ -binding sensor NasS controls NasT activity, and the NasS and NasT proteins co-purify as a stable heterotetrameric regulatory complex, NasS-NasT in the absence of inducer (Luque-Almagro *et al.*, 2013). The NasS-NasT system from *B. diazoefficiens* has been characterised by Sanchez *et al.*, and shown to regulate expression of *napE* and *nosZ* genes for the dissimilatory denitrification pathway (Sánchez *et al.*, 2014).

The processes and enzymes for rhizobial denitrification have been well studied (Bedmar *et al.*, 2005, Delgado *et al.*, 2007, Sánchez *et al.*, 2011, Bedmar *et al.*, 2013), however the biochemical apparatus for $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ assimilation by plant-associated rhizobia has yet to be characterised. In this work, we demonstrate a dual role for the *blr2806-09* and *bll4571-73* loci for $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ assimilation and NO management in *B. diazoefficiens*.

5.1.3 Experimental approaches

5.1.3.1 Bacterial strains, plasmids and growth conditions

The bacterial strains, plasmids and primers used in this study are listed in Table 4.1. Gene deletion and transcriptional reporter construction used previously established methods (Delgado *et al.*, 2003, Robles *et al.*, 2006), with key modifications as outlined below. *B. diazoefficiens* strains were grown routinely under aerobic conditions at 30°C in peptone-salts-yeast extract (PSY) medium supplemented with 0.1% (w/v) L-arabinose (Regensburger & Hennecke, 1983). Growth curves under different N-sources were performed in Bergersen minimal medium (Bergersen, 1977) supplemented with 10 mM KNO₃ (BN3), 1 mM NaNO₂ (BN2), or 10 mM KNO₃ plus 6.5 mM L-glutamate (BGN3) as sole N-sources and incubated aerobically or anaerobically. Anaerobic conditions were reached by incubating the cells in completely filled glass serum tubes. Growth was followed by measuring attenuation (*D*) of cell cultures at 600 nm.

To test growth inhibition by nitrosative stress, cells were grown in Bergersen minimal medium with 6.5 mM L-glutamate (BG) as sole N-source and incubated under microaerobic conditions in serum tubes sealed with rubber septa. The headspace of these tubes was filled with a gas mixture of 2% (v/v) oxygen and 98% (v/v) N₂, and was replaced with fresh gas mixture every 24 h. Nitrosative stress was induced by adding 1 mM sodium nitroprusside (SNP) or spermine NONOate to the cultures 24 h after inoculation. To test cell survival after nitrosative stress induction, cells were grown to early stationary growth phase under the same conditions as for growth inhibition experiments (final *D* value at 600 nm was ~0.5). Then, 1 mM SNP or spermine NONOate was added to the cultures (replica cultures were not subjected to nitrosative stress as controls). Cell cultures were incubated at 30°C and 0.1 ml samples were taken periodically, serially diluted in growth medium and plated into PSY-agar. Colonies were counted after incubation for 7 days under aerobic conditions. The capacity for colony formation of control cells was considered as 100% survival.

To induce the expression of NorCB as a cellular marker for NO, *B. diazoefficiens* was grown in Bergersen minimal where glycerol was replaced with 10 mM succinate as carbon source (BS) (Torres *et al.*, 2011, Torres *et al.*, 2014). The medium was

supplemented with 10 mM KNO₃ as sole N-source (BSN3). In these experiments, the headspace was filled with 2% (v/v) O₂ and 98% N₂ (v/v). In contrast to microaerobic growth conditions, the atmosphere for cultures was not replaced. As such, cells consumed the O₂ present and reached anoxic conditions after 24 h incubation.

Antibiotics were added to *B. diazoefficiens* cultures at the following concentrations (µg.ml⁻¹): chloramphenicol 20, tetracycline 100, spectinomycin 200, streptomycin 200 and kanamycin 200. *E. coli* strains were cultured in Luria-Bertani (LB) medium (Sambrook & Russell, 2001) at 37°C including tetracycline 10, spectinomycin 20, streptomycin 20, kanamycin 25 and ampicillin at 200 µg.ml⁻¹. *E. coli* S17-1 served as the donor for conjugative plasmid transfer (Simon *et al.*, 1983).

5.1.3.2 Construction of *B. diazoefficiens narK-lacZ* and *nirA-lacZ* transcriptional fusions

For construction of transcriptional fusion reporter plasmids (see section 4.4), DNA fragments for the *narK* (520 bp) and *nirA* (563 bp) promoter regions were amplified using primers *narK-lacZ_For-narK-lacZ_Rev* and *nirA-lacZ_For-nirA-lacZ_Rev*, respectively (see Tabla 4.3). Fragments were digested with *PstI* or *PstI-EcoRI* and cloned into the *lacZ* fusion vector pSUP3535 (Fischer, HM, unpublished data), which is derived from pSUP202 (Simon *et al.*, 1983) to give plasmids pDB4009 and pDB4018, respectively (see Tabla 4.2 for details). The correct orientation of cloned inserts was verified by sequencing.

Transcriptional fusion plasmids pDB4009 and pDB4018 were integrated by homologous recombination into the chromosome of wild-type *B. diazoefficiens* USDA 110, and *nasS* and *nasT* mutants to produce strains 4009, 4012-4009, 4013-4009, 4018, 4012-4018, and 4013-4018 detailed in Tabla 4.1. Correct recombination was checked by PCR analysis of genomic DNA isolated from each strain.

5.1.3.3 Growth conditions for β-galactosidase activity assay of *narK-lacZ*, *nirA-lacZ* and *norC-lacZ* fusions

Strains 4009, 4012-4009, 4013-4009, 4018, 4012-4018, and 4013-4018 containing the *narK-lacZ* or *nirA-lacZ*, respectively (Tabla 4.1) were grown aerobically in PSY medium. Cells were harvested by centrifugation at 8,000 *g* for 10 min, washed twice with

nitrogen free Bergersen medium and cultured aerobically in the same medium, or in BN3 medium, for 48 h (until a *D* value of ~0.5 at 600 nm was obtained). To measure β -galactosidase activity from the *norC-lacZ* fusion, plasmid pRJ2499 was integrated by homologous recombination into the chromosome of *bjgb*, *nasC*, *napA*, and *nasC;napA* mutants to produce strains 4001-2499, 4003-2499, GRPA1-2499 and GRPA1-4003-2499, respectively (Tabla 4.1). In order to induce expression of *nor* genes, cells were cultured in BSN3 medium with 2% (v/v) initial O₂ concentration.

5.1.3.4 Construction and complementation of *B. diazoefficiens* mutants

For general issues see section 4.4 of Methods. Genomic and plasmid DNA isolation was carried out using the REALPURE Genomic DNA purification Kit (Real) and Qiagen Plasmid Kit (Qiagen), respectively. Custom oligonucleotide primers were supplied by Sigma, PCR was performed using the High Fidelity DNA polymerase Phusion enzyme (Thermo) and DNA digestions were carried out using Fast Digest enzymes (Thermo). All mutants constructed in this work were made by in-frame deletion of the corresponding gene using the mobilizable pK18*mobsacB* suicide vector that conferred kanamycin resistance and sucrose sensitivity to the host (Tabla 4.1). To generate mutant strains, upstream and downstream regions of relevant target genes were amplified by PCR using the gene-specific primer sets detailed in Tabla 4.3.

For the *narK* deletion mutant, upstream (834bp) and downstream (981bp) DNA fragments flanking *blr2806* were amplified by PCR using *blr2806_up_For-blr2806_up_Rev* and *blr2806_down_For-blr2806_down_Rev* primer pairs (Tabla 4.3). The 981bp fragment was inserted into pK18*mobsacB* as an *XbaI-HindIII* fragment that contained a new unique *XhoI* restriction site immediately downstream of the *XbaI* site. Subsequently, the 834bp fragment was inserted into this plasmid as a *BamHI-XhoI* fragment yielding plasmid pDB4000. Double recombination of pDB4000 with the *B. diazoefficiens* genome led to the replacement of the wild type *blr2806* gene encoding a 459 aa protein for an in-frame truncated version encoding 38 aa.

To generate *bjgb* and *nasT* deletion mutants, upstream and downstream regions flanking *blr2807* (824 and 884bp fragments) and *bll4573* (696 and 736bp fragments) were amplified by PCR using gene-specific primer pairs, i.e. *blr2807_up_For-*

blr2807_up_Rev and blr2807_down_For-blr2807_down_Rev for blr2807, and bll4573_up_For-bll4573_up_Rev and, bll4573_down_For-bll4573_down_Rev for bll4573 (Tabla 4.3). The PCR products containing the upstream regions of blr2807 and bll4573 were inserted separately into pK18*mobsacB* as *EcoRI-XbaI* fragments and subsequently the downstream PCR products were inserted into the respective plasmids as *XbaI-HindIII* DNA fragments yielding plasmids pDB4001 and pDB4013 (Tabla 4.1). Double recombination of pDB4001 and pDB4013 with the *B. diazoefficiens* genome led to the replacement of the blr2807 gene encoding a 142 aa protein and the bll4573 gene encoding a 196 aa protein for in-frame truncated versions encoding a 33 aa and 27 aa, respectively.

To generate the *flp* and *nasC* mutants, upstream and downstream regions of blr2808 (983 and 856bp) and blr2809 (829 and 840bp) were amplified by PCR using gene-specific primer pairs blr2808_up_For-blr2808_up_Rev and blr2808_down_For-blr2808_down_Rev for blr2808, and bll2809_up_For-bll2809_up_Rev and bll2809_down_For-bll2809_down_Rev for bll2809 (Tabla 4.3). The PCR product containing the upstream regions of blr2808 and blr2809 were cloned into separate pK18*mobsacB* plasmids as *EcoRI-BamHI* fragments and subsequently the downstream DNA regions were inserted into the relevant plasmid as *BamHI-HindIII* fragments to give pDB4002 and pDB4003. Double recombination of either pDB4002 or pDB4003 with the *B. diazoefficiens* genome led to the replacement of the blr2808 gene (encoding a 418aa protein) or the blr2809 gene (encoding a 901aa protein) for in-frame truncated versions encoding a 37 aa or 27 aa peptide, respectively.

The *ntrABC* mutant was generated by double recombination of *B. diazoefficiens* USDA 110 genomic DNA with plasmid pDB4004 (Tabla 4.1). To generate pDB4004, the upstream region of blr2803 (773bp) and the downstream region of blr2805 (721bp) were amplified by PCR using primer pairs blr2803_up_For-blr2803_up_Rev and blr2805_down_For-blr2805_down_Rev (Tabla 4.3). Firstly, the PCR product containing the upstream region was digested with *BamHI* and *XbaI* restriction enzymes and cloned into pK18*mobsacB*. Then, the PCR product corresponding to the downstream region was inserted into the plasmid as an *XbaI-PstI* fragment to give plasmid pBD4004

(Tabla 4.1). Double recombination of pBD4004 with the *B. diazoefficiens* genome replaced blr2803-05 genes for an in-frame truncated version encoding a 31 aa peptide.

The *nirA* and *nasS* mutants were generated by double recombination of *B. diazoefficiens* USDA 110 genomic DNA with plasmids pDB4011 and pDB4012 respectively. To generate pDB4011 and pDB4012, the upstream and downstream regions of bll4571 (641 and 692bp) and bll4572 (687 and 664bp) were amplified by PCR using the primer pairs bll4571_up_For-bll4571_up_Rev and bll4571_down_For-bll4571_down_Rev for bll4571, and bll4572_up_For-bll4572_up_Rev and bll4572_down_For-bll4572_down_Rev for bll4572 (Tabla 4.3). PCR products containing the upstream regions were cloned first into pK18*mobsacB* as *EcoRI-KpnI* DNA fragments. Then, amplified downstream regions were inserted into the plasmid as *KpnI-XbaI* fragments yielding plasmids pDB4011 and pDB4012 (Tabla 4.1). Finally, double recombination replaced bll4571 and bll4572 genes (encoding 625 aa and 388 aa proteins, respectively) for in-frame truncated versions encoding 17 aa and 23 aa peptides, respectively.

All plasmids constructed for mutagenesis were sequenced and transferred via conjugation into *B. diazoefficiens* USDA 110 using *E. coli* S17-1 as donor strain. Double recombination events were favoured by first selecting single recombinants for kanamycin resistance and screening candidates by PCR. Then, selected clones containing the plasmid co-integrated in the genome were grown in PSY-agar medium supplemented with sucrose 10% (w/v) to select for double recombinants. Sucrose resistant colonies were checked for kanamycin sensitivity. Double recombinants were confirmed by PCR.

B. diazoefficiens GRC131-4001 containing a double mutation in *bjgb* and *norC* was generated by transferring plasmid pJNOR43M2 (Mesa *et al.*, 2002) via conjugation into the *B. diazoefficiens* *bjgb* mutant (Tabla 4.1). Double recombinants were selected for kanamycin resistance and tetracycline sensitivity. The correct replacement of the wild-type *norC* gene by kanamycin resistance gene (*aphII*) insertion was checked by PCR.

B. diazoefficiens GRPA1-4003 containing a double mutation in *napA* and *nasC* was generated by transferring plasmid pBG602Ω (Delgado *et al.*, 2003) via conjugation into

the *B. diazoefficiens nasC* mutant (Tabla 4.1) using *E. coli* S17-1 as donor strain. Double recombination events were favoured by growth on agar plates containing sucrose. Mutant strains resistant to spectinomycin/streptomycin, but sensitive to kanamycin were checked by PCR for correct replacement of the wild-type fragment by the Ω interposon.

The *bjgb*, *flp*, and *nasC* strains were complemented with pDB4014, pDB4015, pDB4017 expression constructs containing the corresponding intact genes (Tabla 4.1). For this, *bjgb*, *flp*, and *nasC* genes were amplified by PCR using primer sets blr2807_For-blr2707_Rev, blr2808_For-blr2808_Rev and blr2809_For-blr2809_Rev (Tabla 4.3). DNA fragments containing the relevant open reading frame and Shine-Dalgarno sequence were cloned separately into pTE3 vector (Egelhoff *et al.*, 1985). All complementation constructs were sequenced and transferred via conjugation into the relevant *B. diazoefficiens* mutant using *E. coli* S17-1 as donor strain. Complemented strains 4001-pDB4014, 4002-pDB4015 and 4003-pDB4017 (Tabla 4.1) were confirmed by plasmid extraction and checked by restriction analyses and PCR.

5.1.3.5 Analysis of gene expression by RT-PCR

Total RNA was isolated from *B. diazoefficiens* cells grown anaerobically to a *D* of ~ 0.4 (at 600 nm) in BN3 medium, as previously described (Hauser *et al.*, 2007). First strand cDNA synthesis was performed with the SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) according to the supplier's guidelines, using 1 μ g of total RNA and primer e (Tabla 4.3). cDNA generated was used for amplification of putative intergenic regions between blr2805 and blr2809, using primers pairs a1-a2 to d1-d2 (Tabla 4.3), essentially as described by Sambrook and Russell (2001). In negative controls, reverse transcriptase was omitted and for positive controls PCR was performed with *B. diazoefficiens* USDA 110 genomic DNA as template.

5.1.3.6 β -Galactosidase assays

β -galactosidase activity was determined using permeabilised cells from at least three independently grown cultures assayed in triplicate for each strain and condition, as previously described see section 4.3.6 (Miller, 1972). The absorbance data at 420 and 600 nm were determined for all samples and cultures in a plate reader (SUNRISE

Absorbance Reader, TECAN, Männedorf, Switzerland), using the software XFluor4 (TECAN), and specific activities were calculated in Miller units.

5.1.3.7 Transcription Start Site identification of *narK* operon and *nirA* gene

The transcription start site of *narK* operon and *nirA* gene were determined with the Rapid Amplification of 5' cDNA Ends protocol described by Sambrook and Russell (Sambrook, J. and Russell, D. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York). Total RNA was isolated from *B. diazoefficiens* cells grown anaerobically (2% O₂ at start) to a *D* of ~0.4 (at 600 nm) in BN3 medium. First strand cDNA synthesis was performed with the SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) according to the supplier's guidelines, using 0,8 µg of total RNA and primer SP1 blr2806 or SP1 blr4571. Unused dNTPs and primers were removed with the GeneJET PCR Purification Kit (Thermo) and products were eluted in 15 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8.5. Poli-A tails were added to 5' end of cDNAs with the Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (Thermo) and final products were diluted with purified water to final volume of 1 ml. A PCR amplification reaction was carried out per sample with primers (dT)₁₇-adaptor-primer, adaptor primer and SP2 blr2806 or SP2 blr4571 primers. DNA libraries were performed cloning PCR products in pGEM-T easy vector (Promega) and transforming the products in competent *E. coli* DH5α cells. Plasmid DNA of individual clone colonies were purified with QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) and Sanger sequenced using SP6 primer. Start transcription sites were identified as the first nucleotide sequenced after the poli-A sequence.

5.1.3.8 Promoter bio-informatics analysis of *narK* operon and *nirA* gene

DNA sequences of *narK* and *nirA* gene upstream regions were obtained from Rhizobase database (<http://genome.kazusa.or.jp/rhizobase/>). To identification consensus sequence with putative role in DNA-Protein interaction, the promoter regions were analysed with the Virtual Footprint tool of the PRODORIC transcription factor binding sites database (http://prodoric.tu-bs.de/vfp/vfp_promoter.php). Putative transcription start sites were identified through a neural network Promoter Prediction tool of BDGP (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html). The identification of mRNA secondary structures were predicted by the mfold Web Server

(<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>) and the RNAfold Web Server (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>)

5.1.3.9 Determination of NO_3^- reductase and NO_2^- reductase activity

B. diazoefficiens was grown under aerobic conditions in PSY medium, harvested by centrifugation at 8,000 *g* for 10 min at 4°C, washed twice with BN3 medium and inoculated to *D* value of ~0.4 (at 600 nm) in the same minimal medium. Following 72 h incubation under relevant conditions, cells were harvested, washed with 50 mM Tris/HCl buffer (pH 7.5) to remove excess NO_2^- and then resuspended in 1 ml of the same buffer prior to assay for enzymatic activity. Methyl viologen (MV)-dependent NO_3^- reductase (MV-NR) and NO_2^- reductase (MV-NIR) activity was measured essentially as described by Delgado and co-workers (Delgado *et al.*, 2003). The reaction mixture contained 50 mM Tris/HCl buffer (pH 7.5), 200 μM MV, 100 μl of cell suspension (with 0.02-0.04 mg of protein) and 1 mM KNO_3 or 0.1 mM NaNO_2 for MV-NR or MV-NIR activity, respectively. MV was reduced by the addition of freshly prepared sodium dithionite (dissolved in 300 mM NaHCO_3 solution) at final concentration of 14.4 mM.

5.1.3.10 Heme-staining analysis

Aerobically grown *B. diazoefficiens* cells were harvested by centrifugation, washed twice with BSN3 medium, and resuspended in 500 ml of the same medium. Microaerobic conditions were then established with 2% (v/v) initial O_2 concentration and cells were cultured for 48 hours until a final *D* of ~0.5 (at 600 nm) was reached. Cells were disrupted using a French pressure cell (SLM Aminco, Jessup, MD, USA) and membranes were isolated as described previously (Delgado *et al.*, 2003). Membrane protein aliquots were diluted in sample buffer [124 mM Tris-HCl, pH 7.0, 20% (v/v) glycerol, 5% (v/v) sodium dodecyl sulphate and 50 mM 2-mercaptoethanol], and incubated at room temperature for 10 min. Membrane proteins were separated at 4°C by SDS-PAGE [12% (w/v) acrylamide resolving gel with 20 μg protein per lane], transferred to a nitrocellulose membrane and stained for heme-dependent peroxidase activity (Vargas *et al.*, 1993), using the chemiluminescence detection kit “SuperSignal” (Pierce, Thermo Fisher Scientific, IL, USA). Protein concentration was estimated using the Bio-Rad assay (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA; see section 4.3.7.1).

5.1.3.11 Intracellular NO₂⁻ determination

B. diazoefficiens cells were harvested, washed and lysed by using a French pressure cell (SLM Aminco, Jessup, MD, USA). Soluble cell extracts were prepared by centrifugation at 10,000 *g* for 30 min at 4°C and assayed for NO₂⁻ using the method of Nicholas and Nason (Nicholas & Nason, 1957).

5.1.3.12 NO consumption activity

NO consumption rates were determined using intact *B. diazoefficiens* cells [obtained from BSN3 cultures with 2% (v/v) initial O₂ and a *D* of ~0.5 (at 600 nm)] with a 2 mm ISONOP NO electrode APOLLO 4000® (World Precision Inst., Sarasota, FL). The reaction chamber (2 ml) was temperature-controlled, magnetically stirred and contained: 760 µl of 25 mM phosphate buffer (pH 7.4), 900 µl of cell suspension (4-5 mg protein), 100 µl of an enzyme mix containing *Aspergillus niger* glucose oxidase (40 units.ml⁻¹) and bovine liver catalase (250 units.ml⁻¹) (Sigma-Aldrich), 90 µl of 1 M sodium succinate, and 100 µl of 320 mM glucose. Once a steady base line was obtained, 50 µl of a saturated NO solution (1.91 mM at 20°C) was added to the cuvette to start the reaction. Each assay was monitored until the NO detection had dropped to zero, i.e. when all NO was consumed.

5.1.3.13 N₂O measurements

B. diazoefficiens cells were cultured as indicated above for NO consumption experiments, except that in addition to 2% (v/v) initial O₂, the headspace of the cultures also contained 10% (v/v) acetylene in order to inhibit N₂O reductase activity. After 96 h growth, gaseous samples were taken from the headspace of cultures. N₂O was measured using an HP 4890D gas chromatograph instrument equipped with an electron capture detector (ECD). The column was packed with Porapak Q 80/100 MESH and the carrier gas was N₂ at a flow rate of 23 ml.min⁻¹. The injector, column and detector temperatures were 125, 60 and 375°C, respectively. The samples were injected manually through a Hamilton Gastight syringe. Peaks corresponding to N₂O were integrated using GC ChemStation Software (Agilent Technologies), and the concentrations of N₂O in each sample were calculated using N₂O standards (Air Liquid, France).

5.1.4 Results

5.1.4.1 Genetic basis for NO_3^- and NO_2^- assimilation in endosymbiotic denitrifying rhizobia

B. diazoefficiens USDA 110 contains a putative assimilatory NO_3^- reductase encoded at blr2809 (Figure 5.1.1; Kaneko *et al.*, 2002, Cabrera *et al.*, 2011). Experiments confirmed that *B. diazoefficiens* is able to grow aerobically, or anaerobically using NO_3^- as sole N-source with values for μ_{max} (app) of approx. 0.06 and 0.04 h^{-1} , respectively (Figure 5.1.5 and Table 5.1.1).

Notably, blr2809 lies downstream of several putative ORFs with predicted roles in N-metabolism (Figure 5.1.1). To investigate the transcriptional architecture of this region, RT-PCR experiments were performed to detect intergenic regions (a-d). Here, specific cDNA was obtained for all regions except 'a' (Figure 5.1.1). These findings reveal that blr2806-09 constitute a transcriptional unit. Thus, in-frame deletion strategies for subsequent molecular genetics experiments were adopted to prevent possible polar effects on co-transcribed genes (see Experimental section 5.1.3.5 for details).

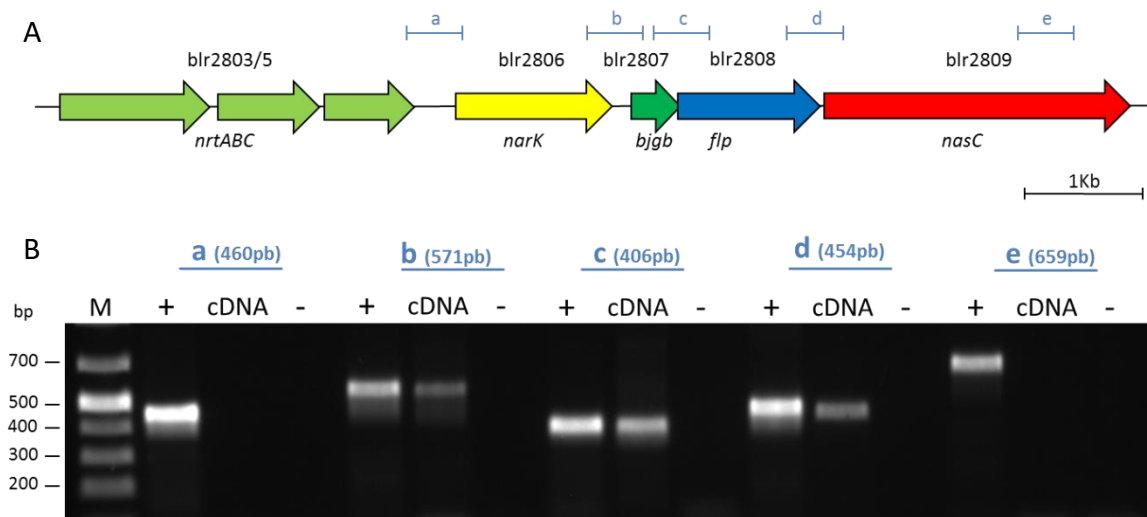


Figure 5.1.2. RT-PCR. Organisation of regulatory and structural genes for the assimilatory $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ reductase pathway in *B. diazoefficiens*. Putative intergenic regions probed by RT-PCR to determine the transcriptional architecture of the *blr2806-09* region (i.e., *narK-bjgb-flp-nasC*) are labelled a-d. Panel B shows the results for RT-PCR analysis obtained by agarose gel electrophoresis for regions a-d. Total RNA isolated from cells grown anaerobically with NO_3^- served as the template for cDNA synthesis; while PCR amplifications using genomic DNA and without reverse transcriptase enzyme served as positive and negative controls respectively (as indicated above lanes).

Analysis of the primary amino acid sequence of *blr2809* suggests the protein is a member of the molybdenum *bis*-molybdopterin dinucleotide cofactor binding superfamily and contains consensus motifs for coordination of an N-terminal [4Fe-4S] cluster and a C-terminal [2Fe-2S] cluster. This general organisation is similar to other assimilatory NO_3^- reductases, including *Pa. denitrificans* NasC and *Klebsiella oxytoca* NasA from the α - and γ -proteobacterial clades, respectively (Luque-Almagro *et al.*, 2011). Accordingly, we adopt the α -proteobacterial nomenclature, NasC, for the *B. diazoefficiens* protein encoded at *blr2809* hereafter. A *B. diazoefficiens* strain that was mutated by in-frame deletion of *nasC* lost the capacity for aerobic, or anaerobic, growth with NO_3^- as sole N-source (Figure 5.1.5 and Table 5.1.1). However, this strain retained the ability to grow using NO_2^- as sole N-source and displayed similar growth kinetics to WT [μ_{max} (app) $\sim 0.03 \text{ h}^{-1}$] (Figure 5.1.6.A and Table 5.1.1).

The genome of *B. diazoefficiens* also contains an ORF for a putative assimilatory NO_2^- reductase (*nirA*) at *bll4571*, a distinct locus situated ~ 2 Mb from *nasC* on the chromosome (Figure 5.1.1). NirA contains canonical cysteine-rich motifs in central and C-terminal sequence regions for iron-sulphur coordination and formation of the siroheme NO_2^- /sulphite reductase ferredoxin half-domain, respectively. However, NirA

lacks N-terminal FAD- and NAD(P)H-binding domains present in bacterial NirB-type NAD(P)H-dependent NO_2^- reductases (Luque-Almagro *et al.*, 2011). Deletion of *nirA* resulted in *B. diazoefficiens* being unable to grow aerobically, or anaerobically, with either NO_3^- or NO_2^- as sole N-source (Figure 5.1.5, Figure 5.1.6.A and Table 5.1.1). The ability of WT and *nirA* cells to consume 1 mM NO_2^- during incubation experiments was tested (Figure 5.1.6.B, discontinuous lines).

While all NO_2^- was removed from minimal medium after ~6 days by WT cells, no significant decrease in extracellular NO_2^- was observed in *nirA* mutant cultures (Figure 5.1.6B). Conversely, NO_2^- production experiments using 10 mM NO_3^- , as sole N-source, revealed that WT cells did not accumulate NO_2^- in the extracellular medium (Figure 5.1.6B). However, accumulation of ~1 mM NO_2^- was observed following incubation of the *nirA* mutant with NO_3^- (Figure 5.1.6B). Thus, pre-cultured cells of the *nirA* mutant retained the capacity to reduce NO_3^- to NO_2^- , but no further.

The putative flavoprotein (Flp), encoded at *blr2808*, contains canonical FAD- and NAD(P)H-binding domains typical of cytoplasmic NAD(P)H-dependent oxidoreductases present in several bacterial *Nas* operons (Gates *et al.*, 2011), and is a strong candidate for mediating electron transfer to *NasC* and/or *NirA*. A *B. diazoefficiens flp* mutant was unable to grow aerobically, or anaerobically, with NO_3^- as the sole N-source (Figure 5.1.5 and Table 5.1.1). However, the *flp* mutant displayed similar growth kinetics and yields [μ_{max} (app) ~0.03 h⁻¹, max. *D* (at 600 nm) = 0.43 ± 0.08] to that observed for WT [μ_{max} (app) ~0.03 h⁻¹, max. *D* (at 600 nm) = 0.51 ± 0.01] when cultured aerobically with NO_2^- (Figure 5.1.6A and Table 5.1.1). These findings suggest that Flp mediates electron transfer to *NasC*, but not to *NirA*. In order to confirm that deletion of *flp* did not influence expression of downstream genes, relevant strains were complemented with either pDB4017 (*nasC*), or pDB4015 (*flp*) constructs. The presence of pDB4017, and pDB4015 plasmids restored both aerobic and anaerobic growth of the *nasC* and *flp* mutants in the presence of NO_3^- to near WT levels, thereby verifying the phenotypes observed (Table 5.1.1).

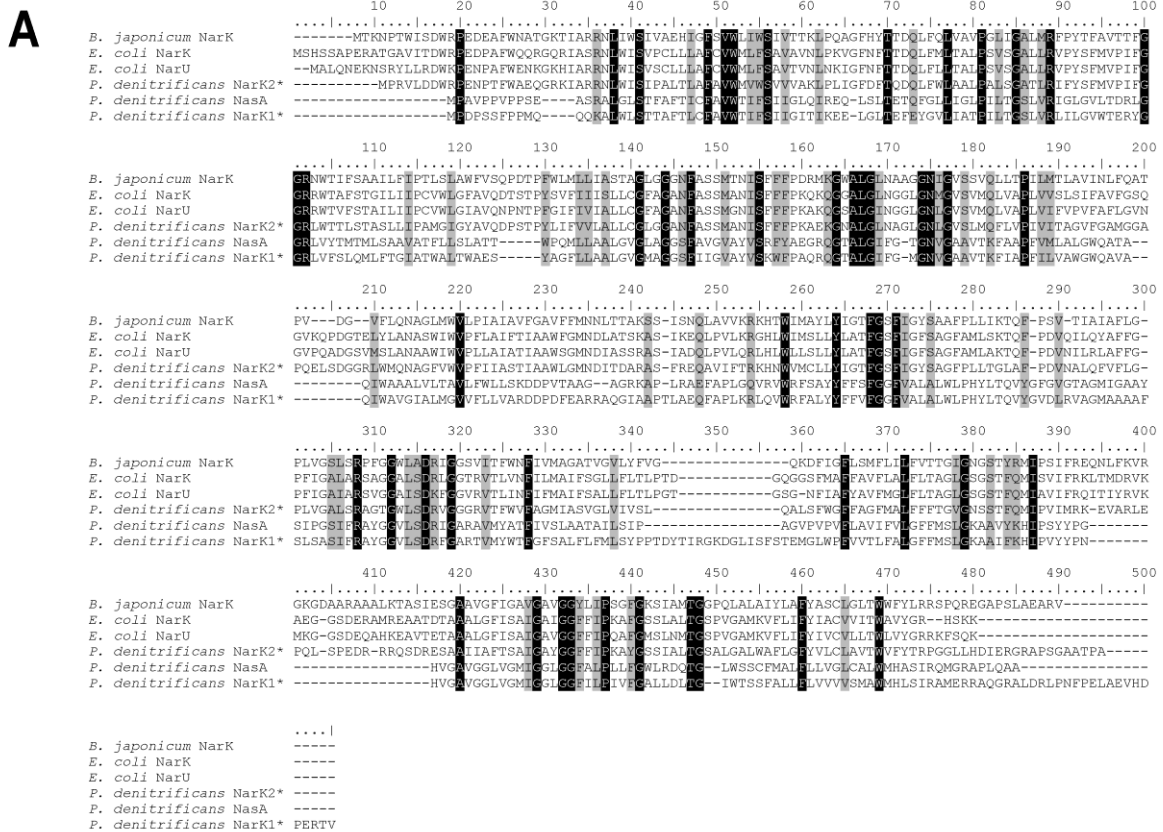


Figure 5.1.3. Sequence comparison of *B. diazoefficiens* NarK (blr2806) with selected bacterial major facilitator superfamily (MFS) proteins. Multiple sequence alignment (A), used the following identifier numbers (GI): *B. diazoefficiens* USDA 110 NarK, 27377917; *Pa. denitrificans* PD1222 NarK, 500074453; *Pa. denitrificans* PD1222 NasA, 500074666; *E. coli* K-12 NarU, 2507076; *E. coli* K-12 NarK, 127835. Alignment was performed using ClustalW. Identical and similar residues are shaded in black and grey respectively within the alignment. *NarK1 includes residues M1–V441 and NarK2 residues M442–A905 of the full-length NarK protein from *Pa. denitrificans* (Goddard *et al.*, 2008). Comparative sequence identity and similarity values between *B. diazoefficiens* NarK and aligned sequences are tabulated in (B).

Deletion of the blr2803-05 ORFs, predicted to encode an NrtABC-type NO_3^- transporter, did not affect the capacity of the cells to grow with NO_3^- as sole N-source (Figure 5.1.5 and Table 5.1.1). Bioinformatics analysis of blr2806 revealed that it encodes a putative member of the major facilitator superfamily (MFS) of membrane proteins, sharing 66 and 59% amino acid similarity with the $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ antiporters *Escherichia coli* NarK (Fukuda *et al.*, 2015) and *Pa. denitrificans* NarK2 (Goddard *et al.*, 2008), respectively (Figure 5.1.3). Thus, we term this MFS-type transporter NarK rather than the generic 'nitrite extrusion protein' genome annotation currently assigned (<http://genome.kazusa.or.jp/rhizobase/>).

A *B. diazoefficiens* *narK* mutant showed improved growth kinetics and yields when cultured aerobically [μ_{max} (app) $\sim 0.09 \text{ h}^{-1}$, max. D (at 600 nm) = 0.98 ± 0.05], or anaerobically [μ_{max} (app) $\sim 0.07 \text{ h}^{-1}$, max. D (at 600 nm) = 0.89 ± 0.09] with NO_3^- as sole N-source when compared to aerobic [μ_{max} (app) $\sim 0.06 \text{ h}^{-1}$, max. D (at 600 nm) = 0.73 ± 0.12], or anaerobic [μ_{max} (app) $\sim 0.04 \text{ h}^{-1}$, max. D (at 600 nm) = 0.61 ± 0.03] growth of WT under the same conditions (Figure 5.1.5 and Table 5.1.1). Furthermore, following 24 h aerobic growth, the *narK* mutant accumulated ~ 2 -fold higher levels of intracellular NO_2^- than that accumulated by WT cells, i.e., 5.3 ± 0.7 compared to $2.2 \pm 0.1 \text{ nmol NO}_2^- \cdot \text{mg protein}^{-1}$ for the *narK* and WT strains, respectively (Figure 5.1.4), and the kinetic NO_2^- consumption from minimal medium BN2 was two times faster than wild-type. The addition of L-glutamate to minimal growth medium restored the inability of the *nasC*, *nirA* and *flp* mutants to grow with NO_3^- under aerobic or anaerobic conditions (Figure 5.1.7 and Table 5.1.1). Under these conditions, growth yields obtained from the *narK* mutant were also similar to those obtained from WT cells (Figure 5.1.7 and Table 5.1.1). Collectively, these results confirm the importance of NarK, Flp, NasC and NirA for NO_3^- assimilation by *B. diazoefficiens*.

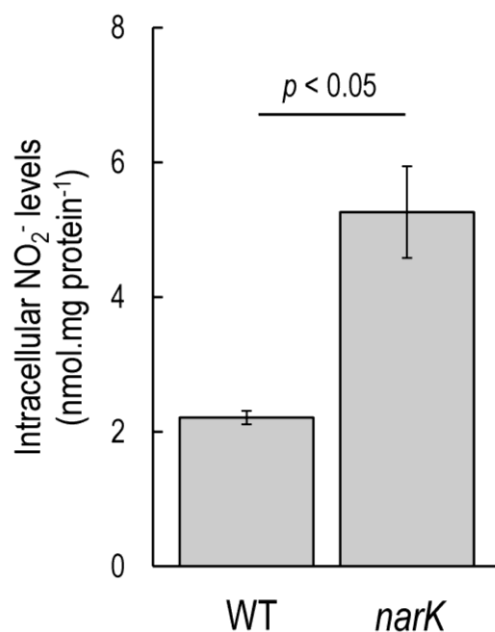


Figure 5.1.4. **Intracellular NO₂⁻ levels for *B. diazoefficiens* WT and *narK* strains.** Cells were washed prior to lysis and determinations of NO₂⁻ and total protein. The results presented are the mean of three biological replicates.

The regulatory proteins encoded by bll4573 (*nasT*) and bll4572 (*nasS*) constitute a NO₃⁻/NO₂⁻ responsive two-component system, NasS-NasT, which has been recently reported in *B. diazoefficiens* (Sánchez *et al.*, 2014). A *B. diazoefficiens nasT* mutant strain showed significant growth attenuation compared with the WT cells when cultured aerobically with either NO₃⁻ (Figure 5.1.8.A and Table 5.1.1), or NO₂⁻ (Figure 5.1.8.B and Table 5.1.1) as sole N-source, but growth of this strain was unaffected when cells were grown in the presence of L-glutamate (Figure 5.1.8.C and Table 5.1.1). By contrast, a strain in which the *nasS* gene was mutated did not show a clear growth defect with respect to WT (Figure 5.1.8. and Table 5.1.1).

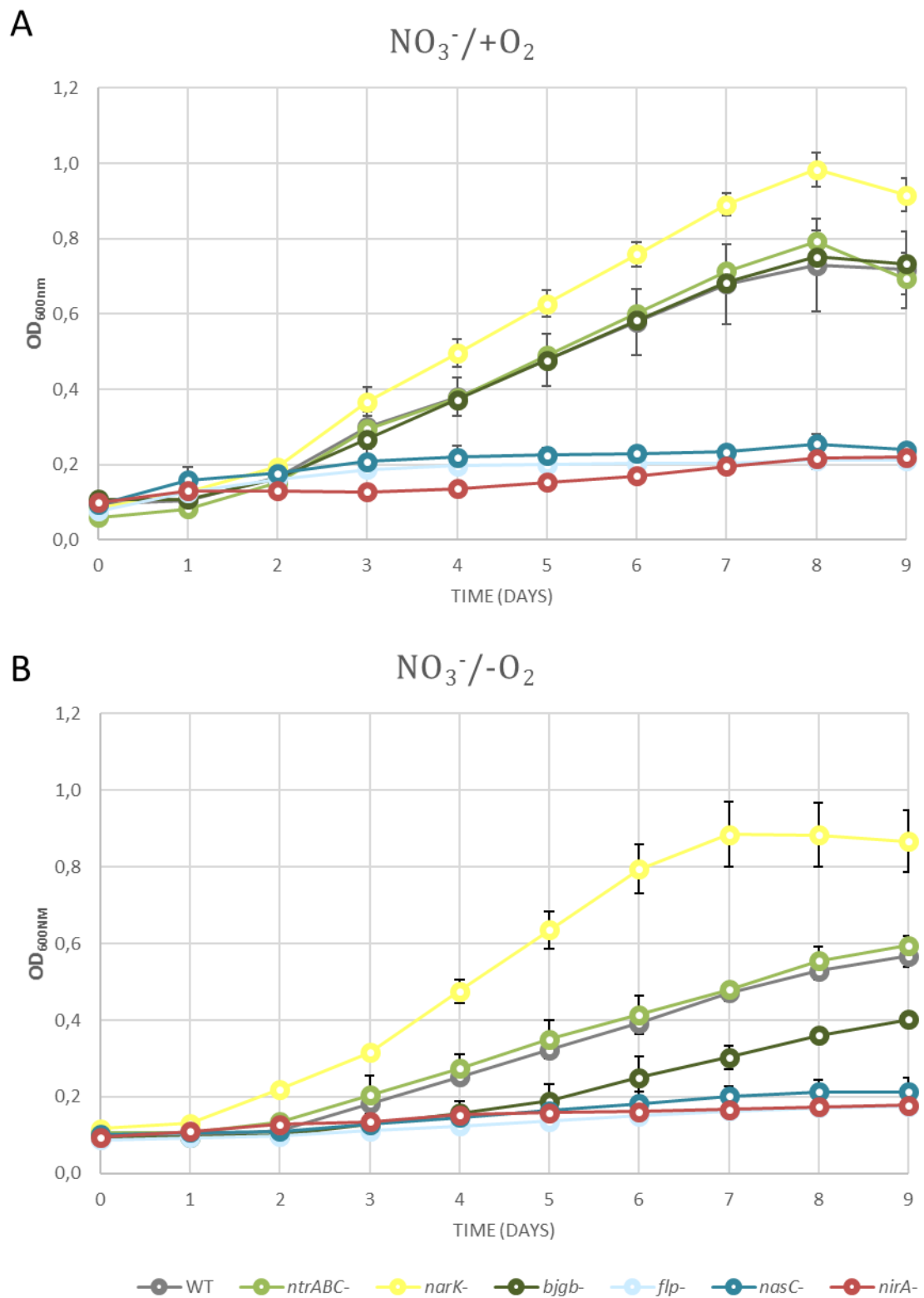


Figure 5.1.5. NO_3^- -dependent growth of *B. diazoefficiens*. Growth curves for WT, *ntrABC*, *nark*, *bjgb*, *flp*, *nasC* and *nirA* strains were measured under aerobic (A) and anaerobic (B) conditions in BN3 minimal medium with NO_3^- as sole N-source. The results presented are the mean of two biological replicates assayed in triplicate.

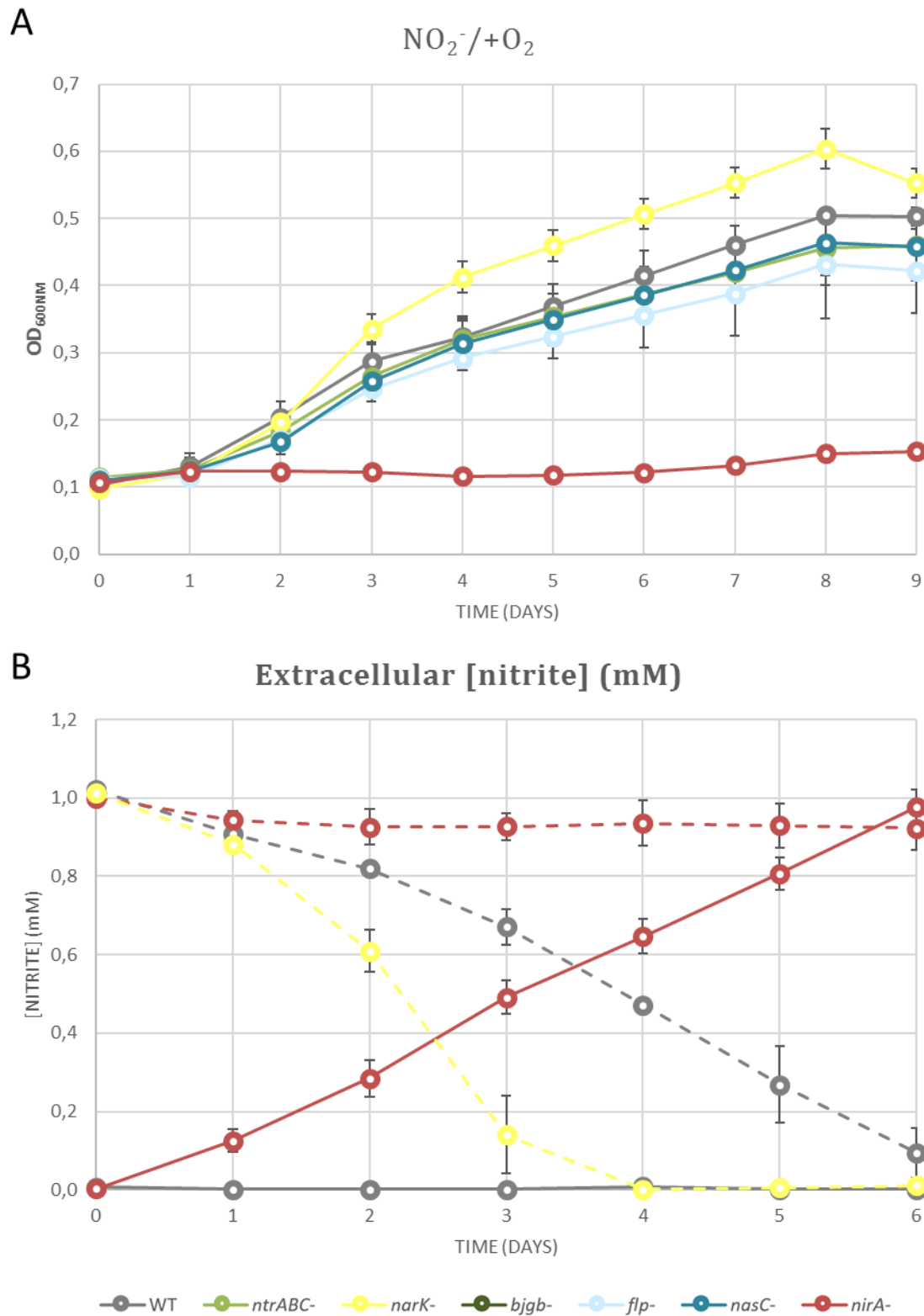


Figure 5.1.6. **NO_2^- -dependent growth of *B. diazoefficiens*.** Growth curves for WT, *ntrABC*, *narK*, *bjgb*, *flp*, *nasC* and *nirA* strains were measured under aerobic conditions in BN2 minimal medium with NO_2^- as sole N-source (A). Extracellular NO_2^- consumption (discontinue lines) and accumulation (continuous lines), using either 1 mM NO_2^- or NO_3^- as sole N-source respectively, measured during growth of WT, *narK* and *nirA* strains (B). The results presented are the mean of two biological replicates assayed in triplicate.

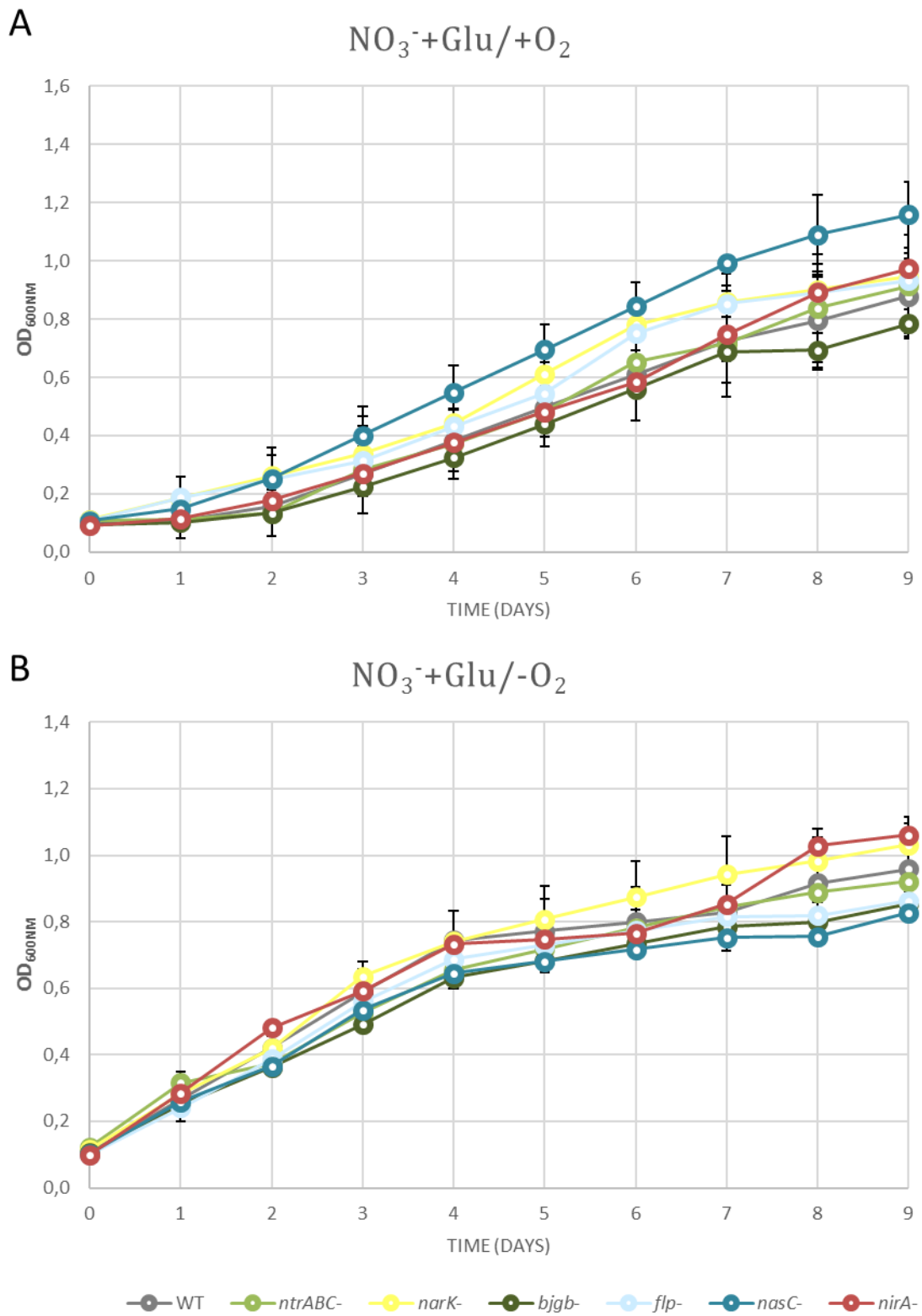


Figure 5.1.7. **Glutamic acid dependent growth of *B. diazoefficiens*.** Growth curves for WT, *ntrABC*, *narK*, *bjgb*, *flp*, *nasC* and *nirA* strains were measured under aerobic (A) and anaerobic (B) conditions in BGN3 minimal medium with NO_3^- plus glutamic acid as N-sources. The results presented are the mean of two biological replicates assayed in triplicate.

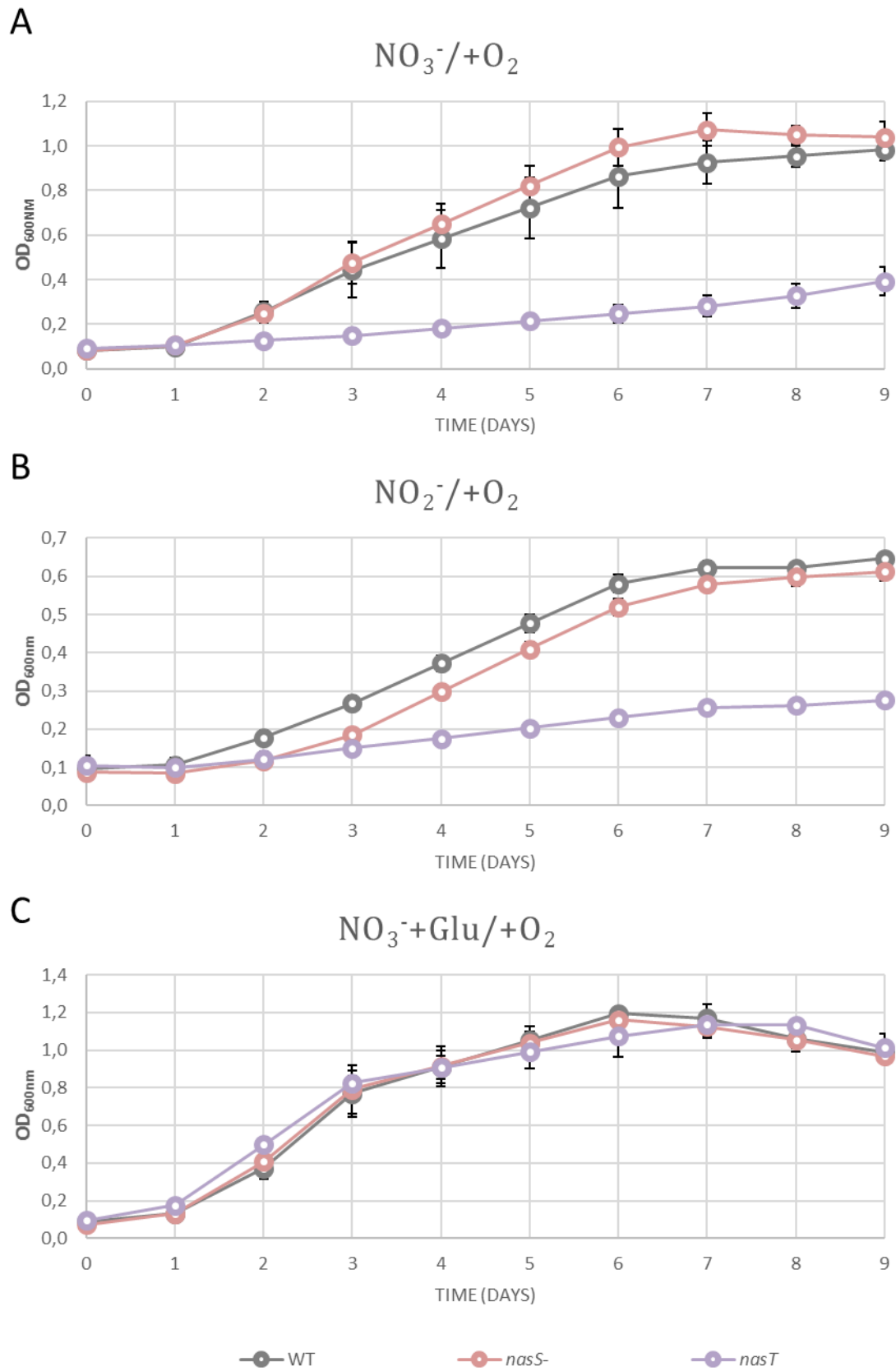


Figure 5.1.8. **Growth curves for the *B. diazoefficiens* *nasS* and *nasT* mutants.** Growth of WT, *nasS* and *nasT* strains was measured in minimal medium, under aerobic conditions, with either NO_3^- (A), or NO_2^- (B), or NO_3^- plus glutamic acid (C) as N-sources. The results presented are the mean of two biological replicates assayed in triplicate.

<i>B. diazoefficiens</i> strain	Genotype	+O ₂			-O ₂		
		NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻ + Glu	NO ₃ ⁻	NO ₃ ⁻ + Glu	NO ₃ ⁻ + Glu
USDA 110	WT	0.06 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01
4000	<i>nark</i>	0.09 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01
4001	<i>bjgb</i>	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01
4001-pDB4014*	<i>bjgb</i> (pDB4014)	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01
4002	<i>flp</i>	n.d.	0.03 ± 0.01	0.07 ± 0.01	n.d.	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01
4002-pDB4015*	<i>flp</i> (pDB4015)	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01
4003	<i>nasc</i>	n.d.	0.03 ± 0.01	0.07 ± 0.01	n.d.	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01
4003-pDB4017*	<i>nasc</i> (pDB4017)	0.06 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01
4004	<i>nrtABC</i>	0.06 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.02
4011	<i>nirA</i>	n.d.	n.d.	0.06 ± 0.01	n.d.	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01
4012	<i>nasS</i>	0.06 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.02
4013	<i>nasT</i>	n.d.	n.d.	0.07 ± 0.01	n.d.	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01

Table 5.1.1.1. Apparent maximum specific growth rate [μ_{\max} (app)] values (h⁻¹) for *B. diazoefficiens* strains calculated from growth curve data. An asterisk denotes strains complemented with the corresponding plasmid-borne gene copy. n.d. no growth detected [i.e., μ_{\max} (app) < 0.01 h⁻¹].

5.1.4.2 A biochemical pathway for assimilation of NO_3^- and NO_2^-

The biochemical basis of growth phenotypes observed for the various deletion strains was examined by enzymatic activity assay of whole cells, using dithionite-reduced methyl viologen (MV), as an artificial electron donor. Here, MV-dependent NO_3^- reductase (NR) and NO_2^- reductase (NIR) activities were measured in WT and *nasC*, *nirA*, *flp*, *bjgb* and *nark* mutants, following aerobic incubation with NO_3^- as sole N-source (Table 5.1.2). Since *B. diazoefficiens* has periplasmic respiratory NO_3^- (NapABC) and NO_2^- reductase (NirK) systems that might also use MV as an electron donor (Velasco *et al.*, 2001, Delgado *et al.*, 2003), control experiments using *napA* and *nirK* mutants were also performed in this study. Importantly, and as expected, the respective NR and NIR activity levels observed in *napA* and *nirK* cells were similar to those observed in WT cells (Table 5.1.2), indicating that the contribution of the NapABC or NirK respiratory enzymes was not significant in cells cultured under aerobic conditions. This provided a solid platform for subsequent experiments.

Significantly, NR activity was not detectable in *nasC* cells, but a similar level of NIR activity was observed compared to WT cells. This was consistent with the loss of assimilatory NO_3^- reductase expression, but not NO_2^- reductase expression, in *nasC* cells (Table 5.1.2). NR activity could be restored to WT levels in the *nasC* mutant, when the deletion was complemented with a corresponding plasmid-borne gene copy. Also, NIR activity was absent in the *nirA* mutant (Table 5.1.2), consistent with the loss of assimilatory NO_2^- reductase expression. However, the *nirA* mutant showed similar levels of NR activity present in the parental strain following incubation with NO_3^- . Additional experiments revealed that NR levels of *flp* cells showed an apparent ~2-fold increase in activity compared to WT incubation with NO_3^- , but NIR activity was relatively similar in both *flp* and WT cells (Table 5.1.2). That the absence of Flp (i.e. the proposed electron donor and partner to NasC) should increase NR activity may result from modulation in catalytic activity of the isolated NasC protein. Alternatively, without Flp, the artificial chemical electron donor could have greater access to NasC and thus may enhance NR activity. Finally, as shown in Table 5.1.2, NR and NIR activities of *bjgb* or *nark* mutants were similar to those observed in WT cells.

<i>B. diazoefficiens</i> str.	Genotype	Activities	
		^a MV-NR	^b MV-NIR
USDA 110	WT	32.0 ± 5.2	6.9 ± 0.9
GRPA1	<i>napA</i>	32.1 ± 0.5	-
GRK308	<i>nirK</i>	-	7.5 ± 0.8
4003	<i>nasC</i>	n.d.	7.2 ± 1.2
4003-pDB4017	<i>nasC</i> (pDB4017)	30.5 ± 4.8	-
4011	<i>nirA</i>	49.7 ± 1.8	n.d.
4002	<i>flp</i>	68.3 ± 6.7	6.1 ± 0.8
4001	<i>bjgb</i>	28.4 ± 5.0	6.1 ± 0.4
4000	<i>nark</i>	35.8 ± 2.2	10.9 ± 1.5

Table 5.1.2. Methyl viologen-dependent NO₃⁻-reductase (MV-NR) and NO₂⁻-reductase (MV-NIR) activities of *B. diazoefficiens* strains incubated aerobically in minimal medium with NO₃⁻ as sole N-source. ^aMV-NR and ^bMV-NIR activities are expressed as nanomoles of NO₂⁻ produced or consumed min⁻¹.mg protein⁻¹. Data are expressed as the mean value ± the standard error from at least two different cultures assayed in triplicate. -, not determined; n.d., not detectable.

5.1.4.3 Regulation of the *nark-bjgb-flp-nasC* operon and *nirA* by NasS-NasT

In order to test the involvement of the NasT regulatory protein in NO₃⁻-dependent induction of the *nark-bjgb-flp-nasC* operon and *nirA* gene, we examined expression of *nark-lacZ* and *nirA-lacZ* transcriptional fusion constructs in WT and *nasT* mutant cells following aerobic culture in the presence, or absence, of the inducer NO₃⁻ (Table 5.1.3). While similar low levels of β-galactosidase activity were observed from both fusions in WT cells incubated without NO₃⁻, the presence of this molecule induced expression of the *nark-lacZ* and *nirA-lacZ* transcriptional fusions by approx. 5-fold and 3-fold, respectively. However, β-galactosidase activity from the *nark-lacZ* reporter was undetectable in the *nasT* strain regardless of whether NO₃⁻ was present or not (Table 5.1.3). While similar basal levels of *nirA-lacZ* expression were observed in WT and *nasT* cells incubated without NO₃⁻, a decrease of approx. 2-fold was found in *nasT* compared to WT when cells were incubated in the presence of NO₃⁻ (Table 5.1.3).

Additional studies to examine the role of NasS in NasT-dependent induction of the *nark-bjgb-flp-nasC* operon and *nirA* gene were also performed, using *nark-lacZ* or *nirA-lacZ* reporters. Here, β-galactosidase assays revealed that in the absence of NO₃⁻, the

activity of each reporter fusion was significantly higher (approx. 6-fold and 3-fold for *nark-lacZ* and *nirA-lacZ*, respectively) in *nasS* cells compared to WT cells (Table 5.1.3). These results imply that in the absence of NO_3^- , NasS is a repressor of *nark-bjgb-flp-nasC* and *nirA* transcription. When equivalent experiments were performed in WT and *nasS* cells that had been pre-exposed to NO_3^- , expression levels for each reporter-fusion were very similar (Table 5.1.3).

<i>B. diazoefficiens</i> str.	Relevant genotype	Miller units	
		- NO_3^-	+ NO_3^-
4009	WT:: <i>nark-lacZ</i>	153 ± 40	759 ± 54
4012-4009	<i>nasS</i> :: <i>nark-lacZ</i>	972 ± 132	897 ± 66
4013-4009	<i>nasT</i> :: <i>nark-lacZ</i>	n.d.	n.d.
4018	WT:: <i>nirA-lacZ</i>	137 ± 22	395 ± 56
4012-4018	<i>nasS</i> :: <i>nirA-lacZ</i>	412 ± 37	372 ± 31
4013-4018	<i>nasT</i> :: <i>nirA-lacZ</i>	163 ± 34	203 ± 13

Table 5.1.3. β -Galactosidase activity for *nark-lacZ* and *nirA-lacZ* fusions in *B. diazoefficiens* WT, *nasS* or *nasT* strains. Cells were cultured under aerobic conditions, in minimal medium, with or without NO_3^- as sole N-source. Data are means ± standard deviation from at least three independent cultures, assayed in triplicate. n.d., not detectable.

Collectively, the reporter-fusion results suggest an inhibitory role for NasS in NasT-dependent induction of gene expression in *B. diazoefficiens*, and that NO_3^- responsive control of both *nark-bjgb-flp-nasC* and *nirA* assimilatory gene expression is lost *in vivo* without NasS. This mode of regulation is analogous to $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ responsive control of *nas* gene expression by NasS-NasT in the related α -proteobacterium *Pa. denitrificans* (Luque-Almagro *et al.*, 2013).

5.1.4.4 Sequence analysis of *nark* operon and *nirA* gene promoters

A systematic mapping of every transcription start site (TSS) was performed by Čuklina *et al.*, 2016, however, no TSS was identified within the promoter regions of *nark* and *nirA* genes. Nevertheless, they found two TSS in the *nasT* gene promoter regions located at 18 and 65 bp upstream of translational start site. One TSS in the 5' region of NtrABC genes and four internal TSS for genes of *nark* operon were reported too.

In order to locate the TSS of *narK* operon, a 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA 5' Ends) analysis was carried out over total RNA obtained from *B. diazoefficiens* cultures grown in BN3 medium, where high expression of *narK* and *nirA* promoters are reported (Table 5.1.3). Through 5'-RACE, a TSS that initiates at a (G) since 93 bp upstream of the *narK* translational start codon (Figure 5.1.9). In spite of several attempts, we could not identify a TSS in the *nirA* promoter region through 5' RACE, although, a bioinformatics prediction indicates the presence of a putative TSS at 67 bp from *nirA* translational start codon (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html).

Analysis of the *narK* and *nirA* promoter regions revealed the presence of imperfect palindromic sequences that could be regulatory protein binding sites (Figure 5.1.9). In both, *narK* and *nirA* promoter regions, we found two pair of semipalindromic sequences of 17 bp with high sequence and location homology to NrtC boxes describes in *Azotobacter vinelandii* (Wang *et al.*, 2012). This putative NtrC boxes are located for *narK* promoter, at -127 and -140 of TSS and for *nirA*, at -94 and -107 of predicted TSS. In addition, both promoters show an imperfect palindromic sequence of 14 bp, identified as a putative FNR box each, at -42.5 and -34.5 of *narK* and *nirA* TSS, respectively. Promoter region of *nirA* gene holds a putative conserved DNA box associated to TSS -24/-12 elements typical of σ^{54} dependent promoters.

By mRNA secondary structure prediction (see section 4.5), we identified four hairpin with a hexanucleotide loop of a conserved sequence AACGA(A/C), designed as ANTAR regions, located at 24, 32, 41 y 21 bp of *ntrA*, *narK*, *bjgb* and *nirA* translational start codon, respectively. A second hairpain, downstream of ANTAR sequences located at *narK* and *nirA* promoter regions, were predicted, followed of a U rich region. Finally, typical purine-rich Shine-Dalgarno-like sequences were found closely to translational start codon of every gene studied in this work.



Figure 5.1.9. **Analysis of *narK* and *nirA* promoter regions.** Several important elements for translational and transcriptional activities of *narK* operon (A) and *nirA* gene (B). Black boxes show putative protein-DNA interaction sequences (NtrC, FNR and σ^{54} factor); orange boxes show protein-RNA interaction sequences. Relevant RNA secondary structures are indicated with discontinuous arrows. TSS 5'-RACE identify and predicted putative TSS are indicated with red and black arrows, respectively.

5.1.4.5 Involvement of Bjgb and Flp in nitrosative stress defence

A marked difference in growth between the *bjgb* mutant [μ_{\max} (app) ~ 0.02 h⁻¹, max. *D* (at 600 nm) = 0.45 ± 0.02] and WT strains [μ_{\max} (app) ~ 0.04 h⁻¹, max. *D* (at 600 nm) = 0.61 ± 0.03] was observed under anaerobic conditions, in minimal medium with NO₃⁻ as N-source (Figure 5.1.5.B and Table 5.1.1). By contrast, growth of the *bjgb* mutant and WT strains was similar under aerobic conditions (Figure 5.1.5.A and Table 5.1.1).

These observations suggest that Bjgb has a key role *in vivo* for NO₃⁻ assimilation under anaerobic conditions, but not during aerobic growth. Anaerobic NO₃⁻ reduction is known to generate the potent cytotoxin NO, which requires NO-detoxification and nitrosative stress defence systems for bacterial survival (Vine & Cole, 2011, Rowley *et al.*, 2012). To investigate the role of Bjgb in NO-metabolism, the nitrosative stress agent sodium nitroprusside (SNP) was added (at 1 mM final concentration) to microaerobic *B. diazoefficiens* cultures following growth in minimal medium with L-glutamate (BG) as sole N-source. Growth of WT cells was not significantly perturbed, while addition of SNP resulted in transient growth arrest of *bjgb* and *flp* strains that was restored after 24 h (Figure 5.1.10A). Perhaps most significantly, a *norC* or a *bjgb;norC* double mutant showed a substantially longer period of growth inhibition of approx. 7 days following addition of SNP to cultures (Figure 5.1.10A). The effect of SNP on cell viability was also assayed by performing viable cell counts on samples taken at intervals spanning a 5 h period following addition of SNP to cultures. Although WT cell viability was not significantly affected, addition of SNP caused a ~60% decrease in cell survival for *norC* or *bjgb* cultures after 2 h (Figure 5.1.10B). The most prominent effect was observed with the *bjgb;norC* double mutant, which was the most sensitive to nitrosative stress. Here, approx. 80% of cells were killed within 1 to 2 h following SNP exposure (Figure 5.1.10B). Furthermore, the addition of SNP provoked a ~40% decrease of *flp* viability after 2 h incubation. These results revealed the importance of Bjgb and Flp for protection against nitrosative stress in *B. diazoefficiens* under free-living conditions. NO is a product of SNP breakdown and a similar sensitivity of *bjgb* or *flp* mutants to NO was observed using spermine NONOate as an NO-generating compound. Importantly, complementation with pDB4014 (harbouring a functional plasmid-borne copy of *bjgb*) allowed the *bjgb* mutant to grow anaerobically with NO₃⁻ to near WT levels (Table 5.1.1). This confirmed that the growth phenotype observed for the *bjgb* mutant was not caused by a downstream effect on *flp* gene expression.

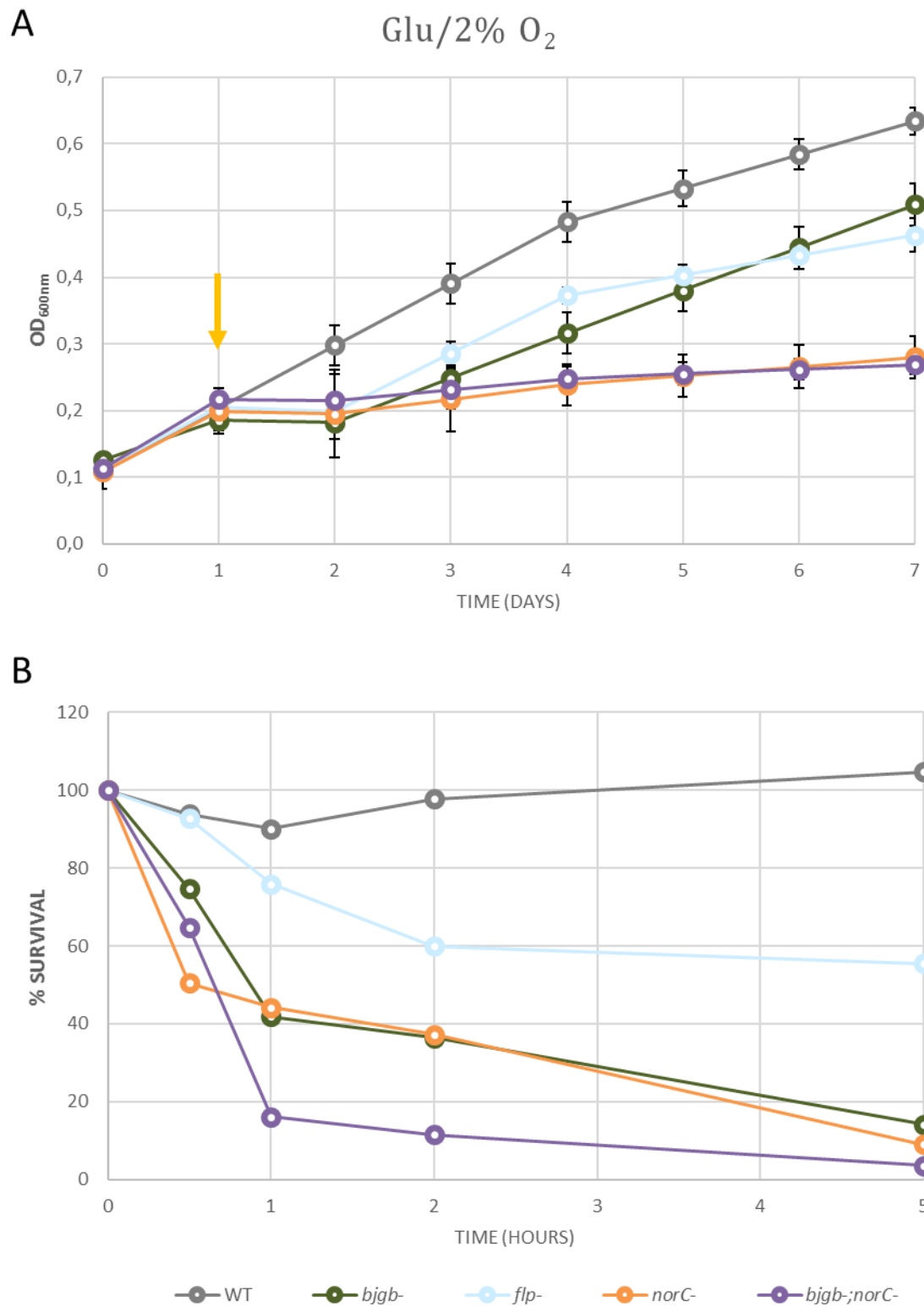


Figure 5.1.10. Growth inhibition curves (A) and cell viability assays (B) for *B. diazoefficiens* WT, *bjgb*, *flp*, *norC* and *bjgb*;*norC* strains in response to nitrosative stress induced by addition of SNP. For growth inhibition curves, *B. diazoefficiens* strains were cultured microaerobically in BG minimal medium and 1 mM SNP was added after 1 h (as indicated by the arrow), and cell viability was measured from 1 to 5 h after exposure (as shown in panel B). The results presented are the mean of three biological replicates.

5.1.4.6 Nitric oxide formed during nitrate assimilation induces *nor* gene expression

To further investigate the role of *Bjgb* and *Flp* in NO metabolism, the ability of *B. diazoefficiens* *bjgb* and *flp* strains to consume NO was analysed. Here, cells were incubated in BSN3 medium, with 2% initial O₂, and NO consumption rates were determined using an NO-electrode (see Figure 5.1.11). A ~2.5-fold increase NO consumption was observed in the *bjgb* mutant compared to the WT strain (Table 5.1.4). This increase was not observed in the *flp* mutant, which showed NO consumption rates marginally lower to that observed in WT cells (Table 5.1.4, Figure 5.1.11). NO consumption in the *norC* or the *bjgb;norC* mutants was approx. 1.6-fold and 1.7-fold lower, respectively, compared to that observed in WT cells (Table 5.1.4, Figure 5.1.11). The presence of residual activity in the *bjgb;norC* implies that under our experimental conditions, another enzyme(s) or perhaps a chemical process may be involved in NO consumption. The ability of *bjgb* cells to produce N₂O following incubation in BSN3 medium with 2% initial O₂ was also investigated. The *bjgb* mutant produced approx. 2.5-fold more N₂O than WT cells. By contrast, the level of N₂O produced by the *flp* mutant was comparable to WT (Table 5.1.4). Given that N₂O

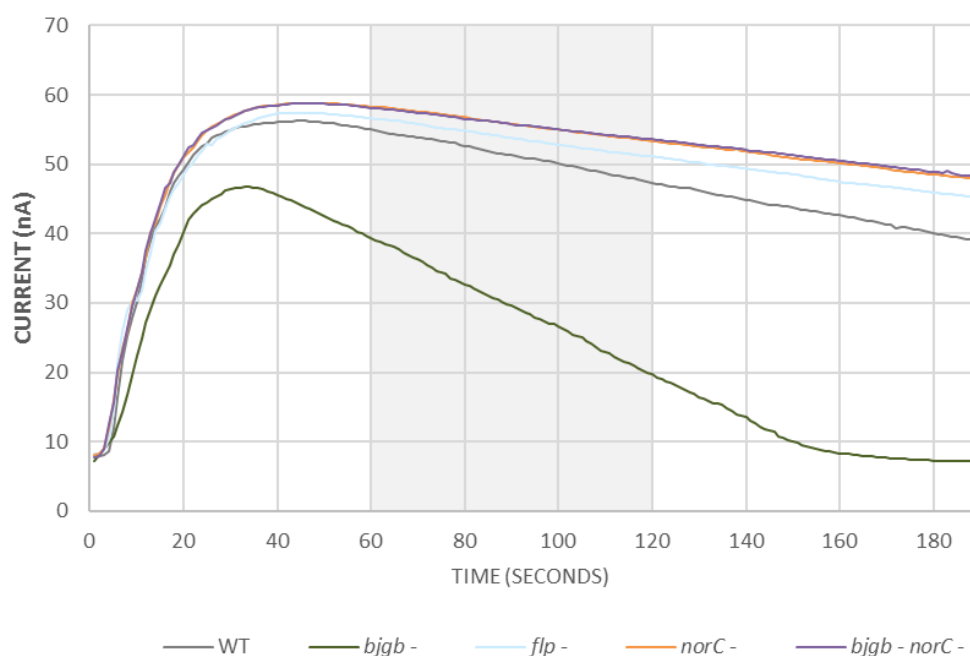


Figure 5.1.11. Nitric oxide consumption curves for *B. diazoefficiens* WT, *bjgb*, *flp*, *norC* and *bjgb;norC* strains, where cells were present at 2 mg.ml⁻¹. The reaction was initiated by addition of an aliquot of an NO-saturated solution (final concentration of 40 μM). NO consumption traces were recorded using a 2 mm ISONOP NO electrode APOLLO 4000[®]. Rates of NO consumption (nmol. h⁻¹.mg protein⁻¹) reported in Table 5.1.4 were calculated for each trace, over a 60 second period (see shaded region), where NO consumption was linear in each experiment.

production was not detected for either the *norC* or *bjgb;norC* mutants, this suggested the NorCB enzyme was the main source of N₂O *in vivo*.

To test whether the higher levels of NO consumption and N₂O production observed by the *bjgb* mutant were due to an induction of NorCB expression, *norC* transcription and relative abundance of NorC in membrane extracts were analysed, using a *norC-lacZ* transcriptional fusion and heme-c staining sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), respectively. Firstly, a ~2-fold increase of *norC-lacZ* expression was observed in the *bjgb* mutant compared to WT (Figure 5.1.12). Given that the *norC* promoter is highly sensitive to N-oxides, including NO (Torres *et al.*, 2011), an induction of β -galactosidase activity implies that Bjgb may act as a net sink for NO in WT cells. By contrast, β -galactosidase activity of the *norC-lacZ* transcriptional fusion was similar for both the *nasC* or *napA* mutants, being approx. 3-fold lower compared to WT levels (Figure 5.1.12). Activity of the *norC-lacZ* transcriptional fusion was essentially abolished in the *nasC;napA* double mutant, implying that NO₃⁻ reduction by NasC or NapA was the source of NO required for *norC-lacZ* expression (Figure 5.1.12).

<i>B. diazoefficiens</i> str.	Genotype	NO consumption activity (nmol. h ⁻¹ mg protein ⁻¹)	N ₂ O (mM)
USDA 110	WT	155 ± 29	1.04 ± 0.26
4001	<i>bjgb</i>	384 ± 65	2.34 ± 0.16
4002	<i>flp</i>	101 ± 17	0.88 ± 0.03
GRC131	<i>norC</i>	97 ± 14	n.d.
GRC131-4001	<i>bjgb;norC</i>	92 ± 18	n.d.

Table 5.1.4. NO consumption activity and N₂O levels for *B. diazoefficiens* WT, *bjgb*, *flp*, *norC* and *bjgb;norC*. Strains cultured in BSN3 minimal medium under 2% (v/v) initial O₂. Data are expressed as the means ± the standard error from at least two different cultures assayed in triplicate. n.d., not detectable.

SDS-PAGE analysis of membranes (that were normalised for total protein) by heme-c staining was used as a qualitative assay for expression of the NorC cytochrome. In *bjgb* cells, NorC levels were significantly increased relative to WT (Figure 5.1.12 inset; compare lanes 1 and 2). However, a clear decrease in NorC expression was observed in the *nasC* mutant compared to WT (Figure 5.1.12 inset; compare lanes 1 and 3). Furthermore, heme-c staining failed to detect NorC expression in membranes

prepared from either the *napA* or *nasC;napA* mutant (Figure 5.1.12 inset; compare lane 1 with lane 4, or 5).

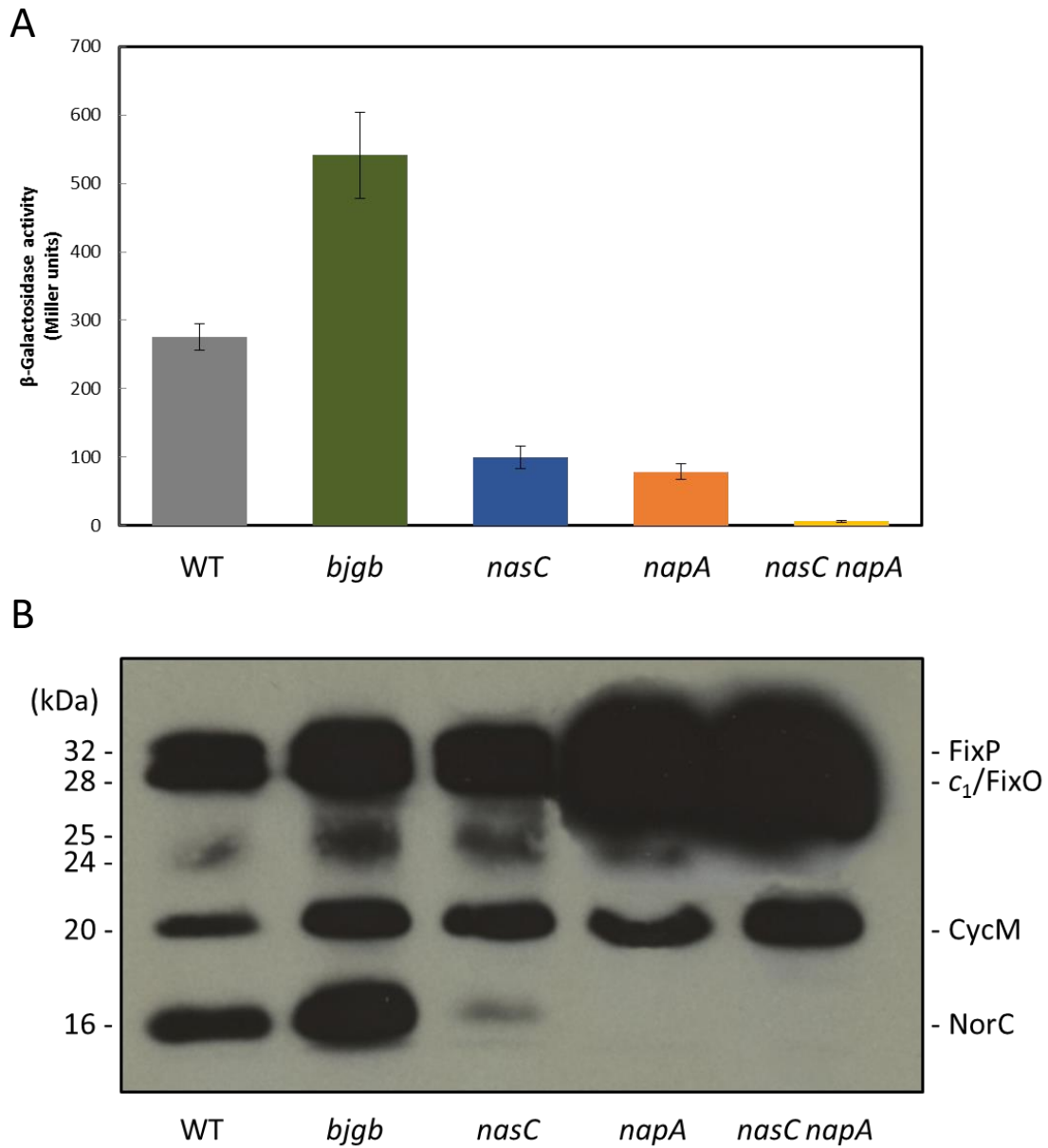


Figure 5.1.12. **Expression of *B. diazoefficiens* *nor* genes during NO_3^- -dependent growth.** β -galactosidase expression levels for the *norC-lacZ* transcriptional fusion in the WT, *bjgb*, *nasC*, *napA* and *nasC;napA* strains grown in BSN3 minimal medium containing 2% initial O_2 (v/v) and NO_3^- as sole N-source. Heme-staining SDS-PAGE analysis of membrane fractions from *B. diazoefficiens* strains is inset below. Each lane contains $\sim 20 \mu\text{g}$ total protein for strains described in panel A. Heme-staining bands for previously identified c-type cytochromes, CycM and NorC, are indicated.

5.1.5 Discussion

5.1.5.1 Defining the key components and transcriptional architecture of NO_3^- and NO_2^- assimilation in *B. diazoefficiens*

A series of molecular genetics studies have established that genes encoded at two distinct loci, blr2806-09 and bll4571-73 of the *B. diazoefficiens* genome (<http://genome.kazusa.or.jp/rhizobase/>), encode structural and regulatory components of a combined assimilatory NO_3^- reductase and NO detoxification system (Figure 5.1.1). RT-PCR experiments demonstrate that the *narK-bjgb-flp-nasC* genes (present at blr2806-09, respectively) constitute a transcriptional unit. However, three putative genes (blr2803-05) predicted to encode a NO_3^- transport system (similar to NrtABC, reviewed in Moreno-Vivián & Flores, 2007), and that lie immediately upstream of the *narK* operon are transcribed from a different promoter. The *nasTS-nirA* gene cluster (present at bll4573-71, respectively) lies some 2 Mb from the *narK* operon in the genome and encodes a $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ responsive two-component regulatory system, NasS-NasT (Sánchez *et al.*, 2014), and a putative ferredoxin-dependent NO_2^- reductase (NirA).

A role for the *bjgb* (blr2807) gene product in NO detoxification has been described (Cabrera *et al.*, 2011, Sánchez *et al.*, 2011), but the functions of other putative proteins encoded within the *narK* operon, and biochemical components for the assimilatory NO_3^- reductase pathway in *B. diazoefficiens* were unknown. In this work, we have demonstrated that the assimilatory NO_3^- reductase (we rename herein as NasC) is encoded by blr2809 and is essential for NO_3^- -dependent growth. The second core cytoplasmic enzyme component of the NO_3^- assimilation pathway is NirA, which is required for growth on either NO_3^- or NO_2^- as sole N-source. Consistent with our findings, it has recently been demonstrated that NirA (encoded by bll4571) is required for utilisation of NO_3^- , or NO_2^- , as sole N-source in *B. diazoefficiens* (Franck *et al.*, 2015). NO_3^- -dependent induction of *nasC* (as part of the *narK* operon) and *nirA* expression is mediated by the two-component regulator NasS-NasT, an observation that is

consistent with the role of this system in other α -proteobacteria (Luque-Almagro *et al.*, 2013).

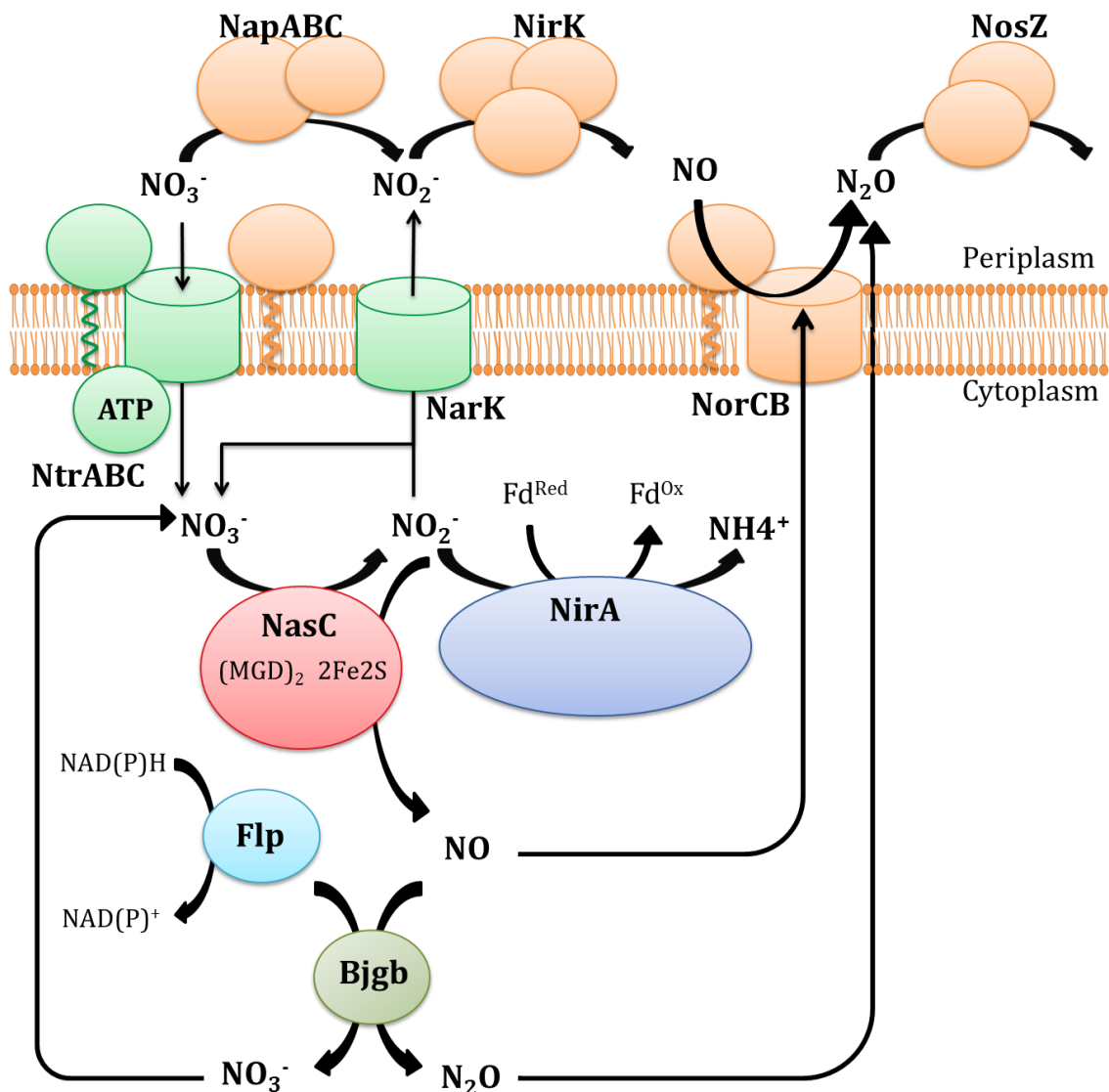


Figure 5.1.13. **Proposed biochemical pathway for NO_3^- -assimilation and NO-detoxification, alongside well-characterised systems for dissimilatory NO_3^- respiration in *B. diazoefficiens*.** Assimilatory reduction of NO_3^- to NH_4^+ is performed by sequential action of the NO_3^- -reductase NasC and Ferredoxin (Fd)-dependent NO_2^- -reductase NirA. Electrons from NAD(P)H are supplied to NasC and also Bjgb by Flp. During assimilatory NO_3^- reduction, cytoplasmic NO_2^- may accumulate and be further reduced, by NasC, to generate cytotoxic NO. NarK can counteract accumulation of NO_2^- by exporting it to the periplasm. Alternatively, Bjgb may detoxify the NO, formed by adventitious reduction of cytosolic NO_2^- , to NO_3^- or N_2O in the presence or absence of O_2 , respectively. Expression of NorCB is up regulated during NO_3^- assimilation and this respiratory system may assist Bjgb to limit accumulation of NO and maintain cell viability.

Phenotypic analyses of a mutant lacking Flp (encoded by *blr2808*) suggest that Flp mediates electron transfer to NasC, but not to NirA. Consecutive genes from the same operon encode Flp and NasC, but lie in a different genetic locus to *bll4571* (*nirA*). This genetic organisation may explain the requirement of Flp for NO_3^- assimilation but not

for NO_2^- assimilation, which instead is ferredoxin dependent (Figure 5.1.13). In contrast to *B. diazoefficiens*, in *Pa. denitrificans* the regulatory and structural elements for a cytoplasmic $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ reductase system comprise a large gene cluster, *nasTSABGHC* (Gates *et al.*, 2011). The absence of a *nasG* homologue in either the *narK* operon or *nirA* cluster *B. diazoefficiens* is notable. NasG may mediate electron flux to both the NO_3^- and NO_2^- reductases in other bacteria to prevent accumulation of excess NO_2^- by NO_3^- reduction in the cytoplasmic compartment (Gates *et al.*, 2011, Luque-Almagro *et al.*, 2011). Instead, for *B. diazoefficiens*, genes encoding systems for NO_2^- transport and NO-detoxification are present within the operon encoding the NO_3^- reductase, which generates NO_2^- .

Sequence comparison of *blr2806* with homologous proteins from diverse bacterial phyla suggests that this gene encodes an MFS-type $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ antiporter with similarity to *E. coli* NarK. The capacity of a *B. diazoefficiens narK* mutant to accumulate NO_2^- inside the cell demonstrates the involvement of NarK in NO_2^- export. Further, phenotypic analyses reveal that NarK is not the main system for cytoplasmic NO_3^- import, as *narK* cells were still able to grow on NO_3^- . Instead, the *narK* mutant showed enhanced growth compared to WT cells with NO_3^- as sole N-source, either under aerobic or anaerobic conditions. These observations imply that NarK acts to lower cytoplasmic NO_2^- levels by exporting NO_2^- to the periplasm, and this process may involve corresponding import of NO_3^- (Figure 5.1.13; Fukuda *et al.*, 2015). In this respect, it is significant that *B. diazoefficiens* NarK performs a very different role to the MFS-type $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ transporter NasA, which supplies NO_3^- to the cytoplasmic $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ reductase pathway in other α -proteobacteria (Gates *et al.*, 2011). Instead, by counteracting NO_2^- accumulation, the *B. diazoefficiens* NarK protein may thus represent a first level of protection to mitigate the production of cytotoxic NO, by adventitious reduction of NO_2^- within the cytoplasm (Rowley *et al.*, 2012). However, as a consequence, in WT cells NarK may also lower substrate availability for NirA and thus limit growth on NO_3^- .

Deletion of *blr2803-05*, that bioinformatics analyses had predicted to collectively encode an NrtABC family transporter, did not affect the ability of *B. diazoefficiens* to assimilate NO_3^- as sole N-source. Therefore, the main route(s) for assimilatory NO_3^-

import remains to be established. Although blr2803-05 are not required for NO_3^- assimilation, there are other NtrABC-like candidates present on the chromosome (e.g. bll5732-34) that may facilitate NO_3^- import to the cytoplasm.

5.1.5.2 A modular detoxification system for NO generated during NO_3^- assimilation

In general, Nas systems have a high degree of structural plasticity, yet most contain proteins for transport and reduction of NO_3^- and NO_2^- (Lin & Stewart, 1998, Moreno-Vivián & Flores, 2007, Gates *et al.*, 2011, Luque-Almagro *et al.*, 2011, Moreno-Vivián *et al.*, 2011). In this work, a novel NO_3^- assimilation system that also includes proteins for NO-detoxification is reported. The *nark-bjgb-flp-nasC* operon in *B. diazoefficiens* encodes the single-domain hemoglobin (sdHb) Bjgb (Cabrera *et al.*, 2011, Sánchez *et al.*, 2011), which is homologous to the N-terminal heme-containing domain of *E. coli* FHb (Hmp) as well as the sdHbs from *Vitreoscilla stercoraria* (Vgb) and *Campilobacter jejuni* (Cgb) (Cabrera *et al.*, 2011).

Deletion of *bjgb* had a strong negative impact on oxygen-limited growth with NO_3^- as sole N-source, relative to WT, which implies a role for Bjgb in protecting *B. diazoefficiens* cells from nitrosative stress. Importantly, in the absence of Bjgb, NO_3^- respiring cells were also highly sensitive to exogenous NO. Since growth of the *bjgb* mutant was not affected under aerobic conditions, the role of Bjgb may be restricted to anaerobic NO_3^- -dependent growth. However, our data suggest that the contribution of Bjgb to N_2O production *in vivo* is low. These observations are consistent with studies performed in *E. coli*, which reveal Hmp can reduce NO to N_2O under anaerobic conditions, but with a much lower rate compared to the activity of the flavorubredoxin NorV (Vine & Cole, 2011). Furthermore, expression of the respiratory NorCB is significantly up regulated in *bjgb* mutant, relative to WT (see Figure 5.1.12), in response to increased intracellular NO levels that arise during NO_3^- -dependent growth. This result suggests that increased NorCB expression may counteract accumulation of cytotoxic NO and may partially compensate for the absence of the cytoplasmic Bjgb NO-detoxification system to maintain cell viability, albeit with a detrimental impact on anaerobic growth. Consequently, the bulk of the N_2O produced by the *bjgb* mutant can be attributed to NorCB activity, which is increased by ~2-fold relative to WT levels.

In *E. coli* Hmp, the FAD prosthetic group within the C-terminal NADH-reductase domain provides electrons from NAD(P)H that are required to reduce the NO-bound heme active site and complete the catalytic cycle. Aside from NO dioxygenation, Hmp has also been shown to perform slower reduction of NO to N₂O under anoxic conditions, which operates at approx. 1% of the rate observed for aerobic dioxygenase activity (Kim *et al.*, 1999, Hernández-Urzúa *et al.*, 2003, Gardner, 2005, Angelo *et al.*, 2008). In the case of Cgb (an sdHb family protein that like Bjgb lacks the reductase domain present in the flavohemoglobin Hmp), the electron-donor protein remains to be identified. However, recent heterologous expression studies of Cgb in *E. coli* have reported a minor role for the NADH:(flavo)rubredoxin oxidoreductase NorW (Tinajero-Trejo *et al.*, 2013). In *B. diazoefficiens*, the enhanced sensitivity of the *flp* mutant to chemical NO-donors suggests the Flp flavoprotein may supply electrons from NAD(P)H that are required for Bjgb activity (Figure 5.1.13).

5.1.5.3 Sources of NO: NasC and NapA activity is responsible for elevated NorCB expression

In eukaryotes, NO synthase (NOS) enzymes have been well described as the main NO-forming pathway for cell signalling and antimicrobial host defence (Alderton *et al.*, 2001). By contrast, NO-formation in prokaryotes has been considered a by-product of denitrification, anaerobic ammonium oxidation and other related respiratory pathways (Zumft, 1997, Rinaldo & Cutruzzolá, 2007, Kartal *et al.*, 2012, Maia & Moura, 2014). However, NO is now increasingly recognised as a key substrate for “non-respiratory” pathways in bacteria, e.g. those that protect against nitrosative stress, and the link between NO-detoxification and pathogenicity has been the focus of several studies (reviewed by Maia & Moura, 2014, 2015). The biochemical basis for NO-formation during anaerobic bacterial respiration has been shown to result from NR-catalysed reduction of the pseudo substrate NO₂⁻, by the respiratory membrane-bound Nar enzyme (Gilberthorpe & Poole, 2008, Vine *et al.*, 2011, Rowley *et al.*, 2012). Furthermore, a small contribution (less than 3%) has been attributed to the periplasmic enzyme, Nap (Vine *et al.*, 2011, Rowley *et al.*, 2012). In the context of this present study, the potential contribution of cytoplasmic NO₂⁻ reduction to NO formation, by NasC, during NO₃⁻/NO₂⁻ assimilation has not yet been investigated.

In the denitrifying endosymbiotic bacterium *B. diazoefficiens*, respiratory reduction of NO_2^- by the periplasmic copper NO_2^- reductase NirK is the main NO-forming process, which occurs during anaerobic NO_3^- respiration (Velasco *et al.*, 2001, Bedmar *et al.*, 2005). Many studies have proposed that NO activates transcription of *nor* genes and that this control is mediated by regulatory proteins designated NnrR and DNR (reviewed by Spiro, 2011, 2012). In this study, we demonstrate that cells lacking the periplasmic respiratory NO_3^- reductase NapA, where NO synthesis from denitrification is blocked, results in very low expression of NorCB. Perhaps our most important finding was that, in addition to NapA, the assimilatory NO_3^- reductase (NasC) is also responsible for generating NO, as induction of NorCB was significantly lowered and completely abolished, relative to WT, in the *nasC* and *nasC;napA* mutant strains, respectively (see Figure 5.1.12). Therefore, the importance of NasC not only in NO_3^- assimilation but also in NO production has been demonstrated.

Co-expression of *bjgb*, *flp* and *nasC* that constitute a combined NO_3^- assimilation/NO-detoxification system may represent a novel method by which bacteria maintain cytoplasmic NO homeostasis and protect against nitrosative stress imposed during NO_3^- -dependent growth, where pathways for both respiratory denitrification and $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ assimilation are active (Figure 5.1.13). Although co-regulation between similar NO-forming and consuming systems has been proposed in *Aspergillus nidulans* (Schinko *et al.*, 2010), to our knowledge, this is the first time where this mechanism has been reported in bacteria. Finally, should production of NO exceed concentrations that can be contained by Bjgb-Flp, a “safety” mechanism exists to enhance expression of NorCB to drive reduction of excess NO to N_2O .

CHAPTER II

Dissecting the role of NtrC and RpoN in the expression of assimilatory nitrate and nitrite reductases in *Bradyrhizobium diazoefficiens*

5.2 Chapter II. Dissecting the role of NtrC and RpoN in the expression of assimilatory nitrate and nitrite reductases in *Bradyrhizobium diazoefficiens*

5.2.1 Abstract

Bradyrhizobium diazoefficiens, the nitrogen-fixing endosymbiont of soybean, is a model strain for studying rhizobial denitrification. This bacterium can also use nitrate as the sole nitrogen (N) source during aerobic growth by inducing an assimilatory nitrate reductase encoded by *nasC* located within the *narK-bjgb-flp-nasC* operon along with a nitrite reductase encoded by *nirA* at a different chromosomal locus. The global nitrogen two-component regulatory system NtrBC has been reported to coordinate the expression of key enzymes in nitrogen metabolism in several bacteria. In this study, we demonstrate that disruption of *ntrC* caused a growth defect in *B. diazoefficiens* cells in the presence of nitrate or nitrite as the sole N- source and a decreased activity of the nitrate and nitrite reductase enzymes. Furthermore, the expression of *narK-lacZ* or *nirA-lacZ* transcriptional fusions was significantly reduced in the *ntrC* mutant after incubation under nitrate assimilation conditions. A *B. diazoefficiens rpoN_{1/2}* mutant, lacking both copies of the gene encoding the alternative sigma factor σ^{54} , was also defective in aerobic growth with nitrate as the N- source as well as in nitrate and nitrite reductase expression. In addition, analysis of the promoter regions of *narK* operon and *nirA* gene showed the presence of consensus sequences to join NtrC at both promoters, and the sigma factor RpoN (σ^{54}), at least, to *nirA* promoter (Figure 5.1.9). These results demonstrate that the NtrC regulator is required for expression of the *B. diazoefficiens nasC* and *nirA* genes and that the sigma factor RpoN is also involved in this regulation.

5.2.2 Introduction

Bacteria have developed diverse mechanisms to sense, respond, and adapt to changes in the environmental availability of nutrients (reviewed by Shimizu 2016). Adaptive physiological responses to these changes usually include two-component signal transduction systems (TCS) that allow bacteria to respond to diverse environmental

stimuli (Stock *et al.*, 2000). Extensive studies have been done on several TCS systems including NtrB-NtrC. This TCS is a classical regulatory system involved in the regulation of expression of genes in response to nitrogen limitation (Jiang & Ninfa, 1999, Pioszak *et al.*, 2000, Jiang & Ninfa, 2009, Schumacher *et al.*, 2013). NtrBC has been well characterised in enteric bacteria (Merrick & Edwards, 1995, Reitzer, 2003, Li & Lu, 2007, van Heeswijk *et al.*, 2013). NtrB is the sensor kinase that responds to an internal signal and autophosphorylates on a conserved histidine residue. The phosphoryl group of this histidine is then transferred to a conserved aspartate residue of the response-regulator protein NtrC within the receiver domain. Once phosphorylated, NtrC binds DNA at specific promoters and activates transcription of target genes (Weiss *et al.*, 1992, Chen & Reitzer, 1995).

P_{II} signal-transduction proteins are recognized to coordinate the regulation of central carbon and nitrogen metabolism (Leigh & Dodsworth, 2007, Forchhammer, 2008). Under nitrogen-limiting conditions, the ratio of α -ketoglutarate to glutamine increases and stimulates the P_{II} functions, thereby activating the kinase activity of NtrB; which protein, in turn, leads to phosphorylation of NtrC. Recent studies have proposed an *in vivo* model in which α -ketoglutarate has a predominant regulatory role acting as a metabolic signal of nitrogen regulation (Schumacher *et al.*, 2013). The phosphorylated NtrC activates the transcription of genes involved in nitrogen scavenging, in metabolism, and in regulation (Zimmer *et al.*, 2000), in conjunction with a specific sigma factor (σ^{54}), the product of the *rpoN* gene (Reitzer & Magasanik, 1985, Ninfa *et al.*, 1987, Kullik *et al.*, 1991, Merrick, 1993, North *et al.*, 1993).

In bacteria, nitrate-assimilation begins with the transport of nitrate into the cell. Then, intracellular nitrate is further reduced to nitrite by a cytoplasmic molybdenum-containing nitrate reductase followed by a sirohaem-containing nitrite reductase that reduces nitrite to ammonia (Moreno-Vivián *et al.*, 1999, Richardson *et al.*, 2001, Luque-Almagro *et al.*, 2011). The genetic organization of the assimilatory nitrate-reducing systems (Nas) have been well characterised in bacteria such as *Rhodobacter capsulatus* (Cabello *et al.*, 2004, Pino *et al.*, 2006), *Klebsiella oxytoca* (Lin & Stewart, 1998), *Azotobacter vinelandii* (Gutiérrez *et al.*, 1995), *Bacillus subtilis* (Ogawa *et al.*, 1995), and *Paracoccus denitrificans* (Gates *et al.*, 2011, Luque-Almagro *et al.*, 2013). In Gram-negative bacteria, the *nas* genes are subjected to dual control: an ammonia

repression by the general nitrogen-regulatory NtrBC system and a specific nitrate or nitrite induction (Luque-Almagro *et al.*, 2011).

Bradyrhizobium diazoefficiens is a soil Gram-negative alphaproteobacterium able to form a symbiotic association with soybean plants. As other rhizobia species, *B. diazoefficiens* can assimilate soil N sources like ammonia (*i. e.*, NH_4^+) and nitrate in free living conditions. In rhizobia, several studies have reported the role of NtrC in the regulation of genes involved in NH_4^+ metabolism (reviewed by Patriarca *et al.* 2002). In contrast, very little information is available on the function of NtrC in the control of nitrate assimilation genes expression in rhizobia (Szeto *et al.*, 1987, Martin *et al.*, 1988). Within this context, recent DNA microarray-based transcriptional profiling has revealed a NtrC-dependent regulon operating in response to nitrogen limitation in *B. diazoefficiens* and the role of NtrC in regulating the utilization of nitrite as a sole N source (Franck *et al.*, 2015). However, the involvement of NtrC on the control of assimilatory nitrate reduction to nitrite has not been reported so far.

In *B. diazoefficiens*, it has been recently reported a genetic and biochemical analysis that has gained novel insights into bacterial nitrate assimilation (Cabrera *et al.*, 2016). Unlike related bacteria that assimilate nitrate, the genes encoding the assimilatory nitrate reductase (*nasC*) and nitrite reductase (*nirA*) are located at separate chromosomal loci. The *nasC* gene belongs to the *narK-bjgb-flp-nasC* operon, which also codes for a major facilitator superfamily-type nitrate and nitrite transporter (NarK), a bacterial hemoglobin (Bjgb) previously reported to be involved in NO detoxification (Cabrera *et al.*, 2011, Sánchez *et al.*, 2011), and a flavin-adenine-dinucleotide dependent NAD(P)H-oxidoreductase protein (Flp). The *nirA* gene is in a cluster with loci containing a nitrate and nitrite responsive regulator system (NasST). In *B. diazoefficiens*, the nitrate dependent expression of the *narK-bjgb-flp-nasC* operon and the *nirA* gene requires the NasST system for transcription antitermination (Cabrera *et al.*, 2016).

In this chapter, we demonstrate that NtrC is essential for the expression of the assimilatory nitrate and nitrite reductase activities. We also report that the transcription of the *B. diazoefficiens narK-bjgb-flp-nasC* operon and the *nirA* gene in response to nitrate also requires NtrC and that the alternative sigma factor RpoN is essential for expression of the NtrC-dependent genes involved in nitrate and nitrite

assimilation.

5.2.3 Experimental approaches

5.2.3.1 Bacterial strains, plasmids and primers

The bacterial strains, plasmids and primers used in this study are listed in Tabla 4.1. Gene deletion and transcriptional reporter construction used previously established methods (Delgado *et al.*, 2003, Robles *et al.*, 2006), with key modifications as outlined below.

Bacteria were routinely grown at 28°C in complete yeast-extract-mannitol medium (YEM; Vincent, 1974). To test growth kinetics, a single rhizobial colony cultured in 10 ml Evans minimal medium (Evans *et al.*, 1970) with 10 g mannitol l⁻¹ as the carbon source and 20 mM (NH₄)₂SO₄ as the N- source was grown at 28 °C on a rotary shaker at 180 rpm for a week. The culture was then diluted 1:100 in fresh Evans medium and grown again for additional 3 days under the same conditions. Next, this starter culture was diluted 1:50 in Erlenmeyer flasks containing a volume of the medium to be assayed equal to 20% of the flasks capacity. Growth curves under different N-sources were performed by modifying the original Evans formulation through the addition of 10 mM NaNO₃ or 1 mM NaNO₂ as the sole N- source. Growth was monitored by measuring the optical density of the cultures at 500 nm (OD₅₀₀) and the number of viable colony-forming units (CFU) estimated by plate counts in solid YEM after the appropriate serial dilutions every 24 h for 17 days.

Antibiotics were added to *B. diazoefficiens* cultures at the following concentrations (mg ml⁻¹): chloranphenicol, 20; spectinomycin, 200; kanamycin, 200; and tetracycline, 100.

Escherichia coli strains were cultured in Luria–Bertani medium (Miller, 1972) at 37 °C. The antibiotics used were (mg ml⁻¹): gentamycin, 10; kanamycin, 25; and tetracycline, 10.

To test for enzymatic activities, *B. diazoefficiens* strains were grown at 30°C in peptone–salt–yeast-extract (PSY) medium supplemented with 0.1% (w/v) L-arabinose (Regensburger & Hennecke, 1983). Dilutions of these cultures were then transferred to Bergersen minimal medium (Bergersen, 1977) supplemented with 10 mM KNO₃ as the sole N- source (*i. e.*, BN3 medium). Since the protocols for the determination of

nitrate-reductase (NR) and nitrite-reductase (NiR) activity had been optimized in Bergersen media, we first confirmed that the growth phenotype of the LP4488 mutant (see further on) was similar when determined in Evans's nitrate media (data not shown).

5.2.3.2 Construction of a *B. diazoefficiens ntrC* mutant

Cloning procedures, including DNA isolation, restriction-enzyme digestion, ligation, and transformation, were performed as described previously (see Methods). Biparental matings were effected with the *E. coli* strain S17-1 (Simon *et al.*, 1983). Electroporation was carried out with a Gene-Pulser system (Bio-Rad) at 1.5 V, 25 μ F, and 200 Ω in a 0.1 cm gap-width electroporation cuvette.

Genomic and plasmid DNA was isolated through the use of the Wizard Genomic DNA purification Kit (Promega) and Accuprep Plasmid MiniPrep DNA Extraction Kit (Bioneer), respectively. Custom oligonucleotide primers were supplied by Genbiotech and the polymerase chain reaction (PCR) run with the Taq DNA polymerase from Embiotech or the Pfx polymerase from Invitrogen. DNA was digested with the Fast digest (Thermo) or Promega enzymes.

To obtain the *B. diazoefficiens ntrC*-deletion mutant (ORF blr4488; <http://genome.microbedb.jp/rhizobase/>), upstream (237 bp) and downstream (330 bp) DNA fragments flanking the *ntrC* locus were generated by PCR from total *B. diazoefficiens* DNA by means of the *ntrC*5'FW, *ntrC*5'RV, *ntrC*3'FW, and *ntrC*3'RV primers (Tabla 4.3). These fragments were inserted into the rhizobial suicide plasmid pG18mob2 (Kirchner & Tauch, 2003) as a *Sma*I and a *Sph*I-*Hind*III fragments. Then, the kanamycin-resistance cassette from the pUC4k plasmid (Vieira & Messing, 1982) was inserted in the *Bam*HI restriction site, resulting in the pMFL4488 plasmid. This plasmid was introduced into *E. coli* S17-1 competent cells that served as donor in a conjugative plasmid transfer to *B. diazoefficiens* USDA 110. The transconjugants obtained were screened as kanamycin resistant, gentamycin sensitive and the correct recombination at the target gene checked by both PCR and genetic sequencing. The following experiments were accordingly carried out with the clone referred to as LP4488.

5.2.3.3 Determination of nitrate and nitrite reductase activities

B. diazoefficiens cells were grown under aerobic conditions in PSY medium, harvested

by centrifugation at 8,000 *g* for 10 min at 4 °C, washed twice with BN3 medium, and inoculated at an OD₆₀₀ 0.3 in the same minimal medium. After 48 h, the cells were harvested, washed with 50 mM Tris/HCl buffer (pH 7.5) to remove excess nitrite, and then resuspended in 1 ml of the same buffer before the assay for enzymatic activity. Methyl viologen (MV) dependent nitrate reductase (MV-NR) and nitrite reductase (MV-NiR) activities were measured as described by Delgado and coworkers with dithionite-reduced MV as an artificial electron donor (see section 4.3.1 and 4.3.2; (Delgado *et al.*, 2003). The MV-NR and MV-NiR activities are expressed as nanomol of nitrite produced (for NR) or consumed (for NiR) ·per mg protein⁻¹·min⁻¹.

5.2.3.4 β-galactosidase activity of *nark-lacZ* and *nirA-lacZ* fusions

The transcriptional fusion plasmids pDB4009 and pDB4018 containing *nark-lacZ* and *nirA-lacZ* fusions, respectively (Tabla 4.2), were integrated by homologous recombination into the chromosomes of the wild-type (Newton) strain 110*spc4*, the *ntrC* mutant, and the *rpoN*_{1/2} double mutant (strain N50–97; (Regensburger & Hennecke, 1983) to produce strains 110*spc4*-4009, 110*spc4*-4018, and LP4488-4009 plus LP4488-4018, N50-97-4009, and N50-97-4018, respectively (Tabla 4.1). The correctness of recombination was checked by PCR and by sequencing analysis of the genomic DNA isolated from each strain.

The cells were grown aerobically in PSY medium, collected by centrifugation, washed twice with nitrogen-free Bergersen medium, and finally incubated aerobically in the same medium with or without the addition of 10 mM NaNO₃ as the N- source. After cultures having an initial OD₆₀₀ of about 0.3 had been incubated for 48 h, the β-galactosidase activity was assayed in triplicate on permeabilized cells from at least three independently grown cultures for each strain and condition, as previously described (Miller, 1972). The absorbance data at 420 and 500 nm were read for all samples and cultures with a plate reader (SUNRISE Absorbance Reader, TECAN, Männedorf, Switzerland) and recorded by means of the the software XFluor4 (TECAN). The specific activities were finally calculated in Miller units (MU).

5.2.3.5 Analytical methods

The nitrite concentration was estimated after diazotization by adding the sulphaniamide naphthylethylene diamine dihydrochloride reagent (Nicholas & Nason, 1957) and the protein concentration measured by the Bio-Rad assay (Bio-Rad

Laboratories, Richmond, CA) with a standard curve of varying bovine-serum-albumin concentrations (see section 4.3.7.1).

5.2.4 Results

5.2.4.1 Involvement of NtrC and RpoN in nitrate and nitrite dependent growth

The *B. diazoefficiens* USDA 110 NtrBC two-component system is encoded by the *blr4487* and *blr4488* genes belonging to the *nifR3-ntrB-ntrC*-gene cluster, respectively. The targets of the NtrC protein are usually σ^{54} dependent, and involved in the transcription of genes related to nitrogen metabolism. *B. diazoefficiens* has two functional, highly conserved *rpoN* genes (*rpoN₁* and *rpoN₂*) encoding for the σ^{54} RNA polymerase alternative factor RpoN (Kullik *et al.*, 1991). In this work, we have constructed a *B. diazoefficiens* mutant strain (LP4488) where the *ntrC* gene (*blr4488*) has been deleted. To investigate the role of NtrC and RpoN in nitrate assimilation, the *B. diazoefficiens* mutant *ntrC* and the double mutant *rpoN_{1/2}* were incubated aerobically in Evans minimal medium with 10 mM NaNO₃ as the sole N source. Growth was determined by monitoring the OD₅₀₀ (Figure 5.2.1.A) or the number of CFU (Figure 5.2.1.B). In contrast to the *B. diazoefficiens* USDA 110 parental strain, the *ntrC* mutant exhibited a severe defect in growth, reaching an OD₅₀₀ of only 0.097 compared to the 3.8 determined in the WT cells after 15 days of incubation (Figure 5.2.1.A). As observed for the *ntrC* mutant, the growth rates of the *rpoN_{1/2}* mutant were very low compared to those observed in the *B. diazoefficiens* 110*spc4* WT strain (Figure 5.2.1.A). The maximal CFU reached by the parental strains was around 7.2×10^{10} CFU ml⁻¹ after 15 days incubation, whereas the *ntrC* and *rpoN_{1/2}* mutants reached values only around 6.5×10^8 CFU ml⁻¹ (Figure 5.2.1.B). In addition, we confirmed that the growth phenotype of the mutants in the Bergersen medium was the same as that observed in Evans medium (data not shown), which observation was useful for the following studies.

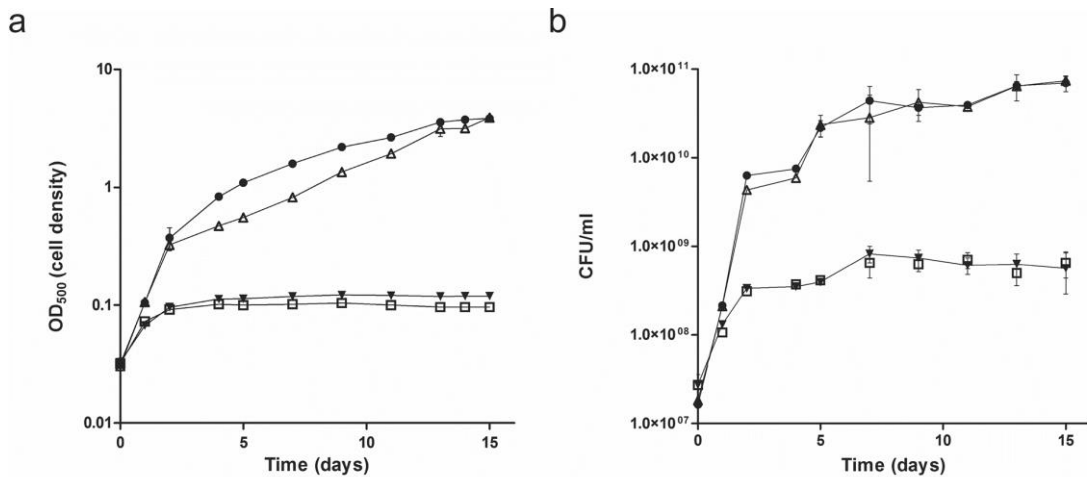


Figure 5.2.1. **Nitrate-dependent aerobic growth of wild-type *B. diazoefficiens* USDA 110 (black circles) and 110spc4 (white upright triangles) strains and the *ntrC* (white squares), and *rpoN_{1/2}* (black inverted triangles) mutants in Evans minimal medium with 10 mM nitrate as N-source.** (Panel a) optical density at 500 nm of cell cultures. In the figure, the optical density of the cultures at 500 nm is plotted on the ordinate as a function of the time in days on the abscissa. (Panel b) viable cell counts as colony-forming units (CFU) per ml of culture. In the figure, the colony-forming units per ml of the cultures is plotted on the ordinate as a function of the time in days on the abscissa. The results presented are the means with the error bars representing the standard deviation from two biologic replicates assayed in triplicate.

To test the capacity of the *ntrC* mutant to use NH_4^+ as a N source, cells were grown to early stationary phase with nitrate (to a final OD_{500} value of 0.17). Then, 20 mM NH_4Cl was added to the USDA 110 (Newton) and the *ntrC* mutant cultures. A significant increase in the growth of the *ntrC* mutant cells was observed that attained a OD_{500} similar to that reached by the WT cells after 10 days of incubation in the presence of NH_4^+ (Figure 5.2.2). These observations confirm that NtrC has a key role in nitrate, but not NH_4^+ , assimilation. In order to further confirm that possibility, we also tested the capacity of the NtrC-deficient LP4488 strain to grow in mineral salts minimum medium with 20 mM NH_4Cl (a high nitrogen condition) or 0.1 μM NH_4Cl (a nitrogen limiting condition) as the sole N source. In concordance with previous reports, the *ntrC* mutant displayed similar growth kinetics to those of the WT strain in the presence of either concentration of NH_4Cl as the sole N source (data not shown; (Martin *et al.*, 1988).

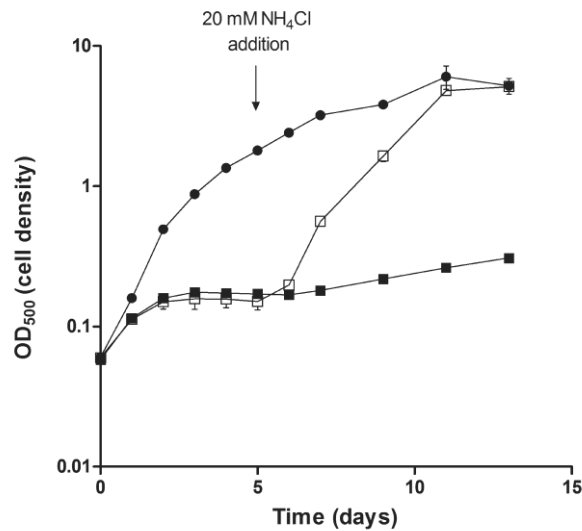


Figure 5.2.2. Ammonium effect on the nitrate-dependent aerobic growth of the wild-type *B. diazoefficiens* USDA 110 (black circles) and the *ntrC* mutant (black and white squares) in Evans minimal medium with 10 mM sodium nitrate as the sole N-source. The optical density at 500 nm is plotted on the ordinate as a function of time in days on the abscissa to illustrate bacterial growth. As indicated in the figure, 20 mM ammonium chloride was added to two of the four *ntrC*-mutant cultures 5 days after inoculation (white squares). The results presented are the means with the error bars representing the standard deviation from two biologic replicates assayed in triplicate.

In order to study the involvement of NtrC and RpoN in nitrite assimilation, cells from the wild type strains USDA 110 and 110*spc4* along with the *ntrC* and *rpoN*_{1/2} mutants were incubated in Evans minimal medium with 1 mM NaNO₂ as the sole N source. Figure 5.2.3.A indicates that a significantly delay in growth measured as OD₅₀₀ was observed in the *ntrC* or the *rpoN*_{1/2} mutant cells compared to that recorded with the WT strains. In a similar manner, the kinetics of colony formation counts by *ntrC* or *rpoN*_{1/2} exhibited a delay with respect to the corresponding time observed in WT cells (Figure 5.2.3.B). Moreover, mutants strains OD₅₀₀ and CFU.ml⁻¹ started increasing between days 7 and 8 while their parental strains growth rose significantly at day 3. Nevertheless, after 10 days incubation the growth rates and extent of colony formation of both *ntrC* or *rpoN*_{1/2} mutants were very similar to those obtained by both the USDA 110 and the 110*spc4* wild type strains, with no statistically significant differences between the four strains by the end of the culture period tested (Figure 5.2.3).

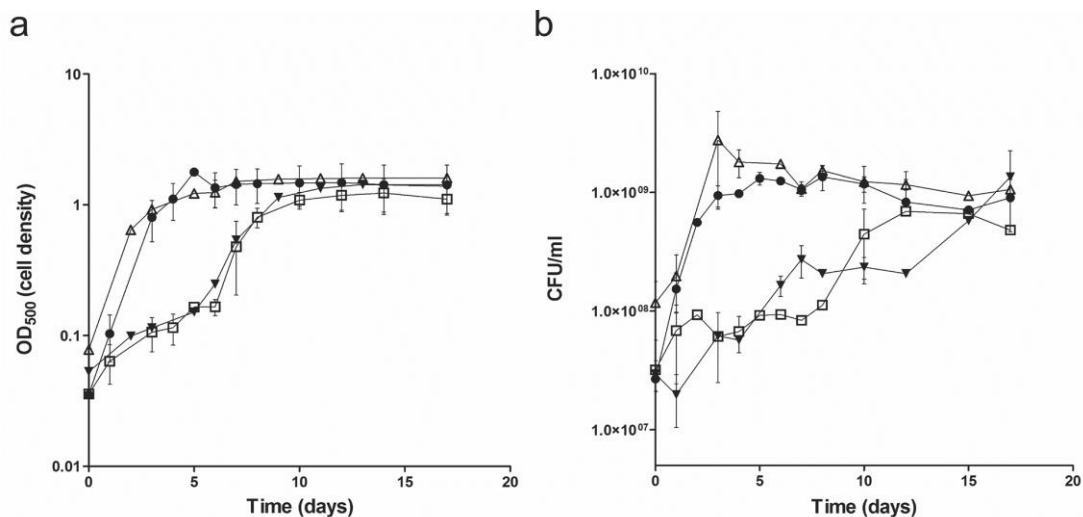


Figure 5.2.3. **Nitrite-dependent aerobic growth of the wild-type strains *B. diazoefficiens* USDA 110 (black circles) and 110spc4 (white upright triangles) and the mutant strains *ntrC* (white squares) and *rpoN*_{1/2} (black inverted triangles) in minimal medium with 1 mM sodium nitrite as the sole N- source.** (Panel a) optical density at 500 nm of cell cultures is plotted on the ordinate as a function of time in days on the abscissa. (Panel b) viable cell counts as colony forming units (CFUs) per ml of culture is plotted on the ordinate as a function of time in days on the abscissa. The results presented are the means with the error bars representing the standard deviation from two biologic replicates assayed in triplicate.

5.2.4.2 Nitrate and nitrite reductase activities are controlled by NtrC and RpoN

In this work, we also investigated whether the inability of the *ntrC* and *rpoN*_{1/2} mutants to grow with nitrate or nitrite as the sole N source resulted from an alteration in the activity of the assimilatory nitrate and nitrite reductases, respectively. Here, MV-NR and MV-NiR activities were measured in whole cells following aerobic incubation with nitrate as the sole N-source. Accordingly, and as expected, the respective NR rates observed in the *ntrC* and *rpoN*_{1/2} mutants were about 18 and 23 fold lower than those recorded in the WT cells (Figure 5.2.4). These results strongly support the inability of those mutants to grow in the presence of nitrate as the only N source (Figure 5.2.1). The NR activity that is lost in the *ntrC* and *rpoN*_{1/2} mutants corresponds to that of NasC since a similar phenotype had been previously observed in a *B. diazoefficiens* *nasC* mutant incubated under the same conditions (Cabrera *et al.*, 2016).

NiR activity was decreased by about 5-fold in the *ntrC* and *rpoN*_{1/2} mutants with respect to the WT strains. As shown in Figure 5.2.4, about 20% of the WT NiR activity, was retained in the *ntrC* and *rpoN*_{1/2} mutants. This residual activity could explain the observed capacity of *ntrC* and *rpoN*_{1/2} to grow (Figure 5.2.3) after 10 days of incubation in a medium containing nitrite as the only N source.

These results clearly suggest that the expression of the *B. diazoefficiens* assimilatory

nitrate reductase and nitrite reductase encoded by *nasC* and *nirA* respectively are controlled by NtrC and RpoN.

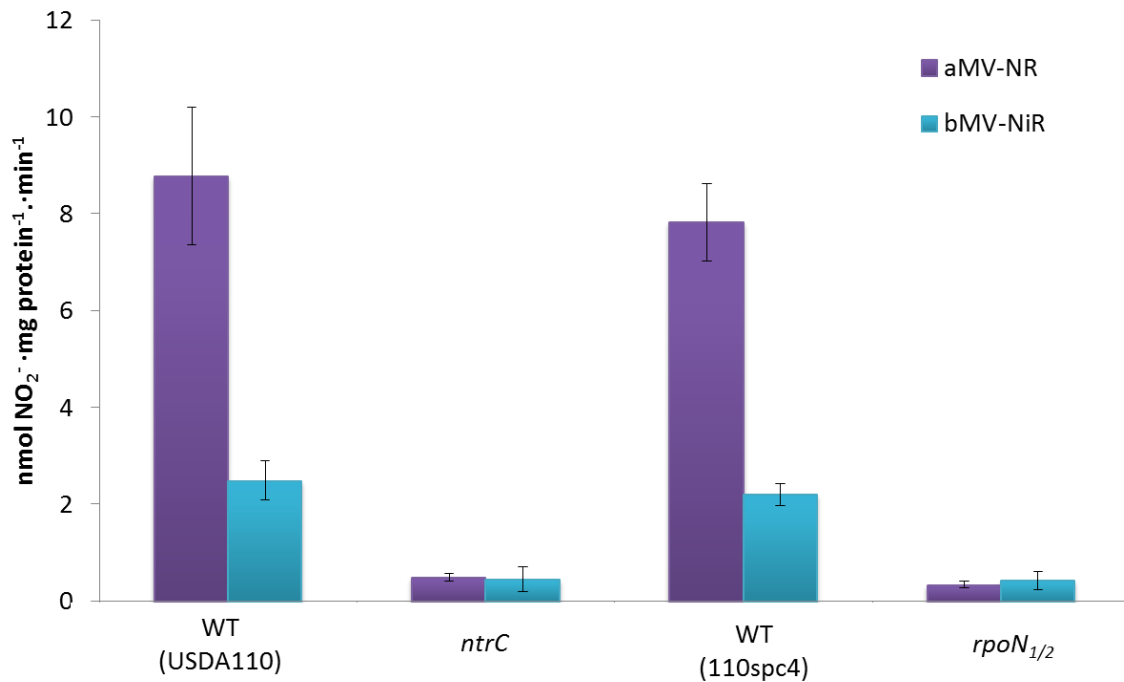


Figure 5.2.4. Methyl viologen dependent nitrate reductase (MV-NR) and nitrite reductase (MV-NiR) activities of *B. diazoefficiens* USDA 110 and 110spc4 wild-type strains and *ntrC* and *rpoN*_{1/2} mutant strains incubated aerobically for 48 h in Evans minimum medium with 10 mM nitrate as the nitrogen source. MV-NR and MV-NiR activities are expressed as nmol NO₂⁻ produced or consumed · mg protein⁻¹ · min⁻¹. The data are expressed as the means ± the standard deviation from at least two different cultures assayed in triplicate.

5.2.4.3 Role of NtrC and RpoN on the transcription of *nasC* and *nirA*

In order to evaluate the involvement of NtrC and RpoN in the expression of the *nasC* and *nirA* genes involved in the synthesis of the assimilatory NR and NiR, we used the *nark-lacZ* and *nirA-lacZ* transcriptional fusions. The *nark-lacZ* fusion, contains the promoter region of *nark*, the first gene of the *nark-bjgb-flp-nasC* operon containing *nasC*. Both the *nark-lacZ* and the *nirA-lacZ* transcriptional fusions were transferred to the WT strains (USDA 110 and 110spc4) and to the *ntrC* and *rpoN*_{1/2} mutants. β-galactosidase activity was monitored in the resulting strains incubated in the absence or presence of nitrate as the sole N source (Figure 5.2.5). As previously reported (Cabrera *et al.*, 2016), low levels of β-galactosidase activity were observed in the *nark-lacZ* and *nirA-lacZ* fusions in USDA 110 incubated without nitrate, whereas the presence of this molecule induced the expression of the two fusions by approximately 4.4 and 2.4 fold, respectively. Similarly, nitrate induced the expression of β-galactosidase in the *nark-lacZ* and *nirA-lacZ* fusions in the wild type strain 110spc4 by

about 4.2 and 1.6 fold, respectively (Figure 5.2.5). That the β -galactosidase activities from the *narK-lacZ* fusions were almost undetectable in the *ntrC* and *rpoN*_{1/2} mutants incubated in the presence of nitrate was notable, with those activities representing less than 1% of the WT levels (Figure 5.2.5). This very low transcription of the *narK-bjgb-flp-nasC* operon observed in the *ntrC* and *rpoN*_{1/2} mutants is consistent with the low levels of NasC activity observed in both mutants and strongly demonstrates the regulatory role of NtrC and RpoN in the transcription of the *nasC* gene. These results are in agreement with previous reports in other bacteria, where the regulation of *nasC* transcription by NtrC has already been demonstrated (Ishida *et al.*, 2002, Ohashi *et al.*, 2011, Romeo *et al.*, 2012, Wang *et al.*, 2012).

Similarly, as observed for the *narK-lacZ* fusion, a significant decrease in *nirA-lacZ* expression of about 15 and 11 fold was observed in the *ntrC* and *rpoN*_{1/2} mutants, respectively, compared to the WT levels (Figure 5.2.5). Nevertheless, about 7 and 9% of the WT β -galactosidase activity from the *nirA-lacZ* fusion was still retained in those two mutants, respectively. These basal levels of *nirA-lacZ* expression in both mutants might explain the residual NiR activity observed in the *ntrC* and *rpoN*_{1/2} mutants as well as the growth capacity recovery of those mutants after 10 days of incubation in a medium containing nitrite as the only N source.

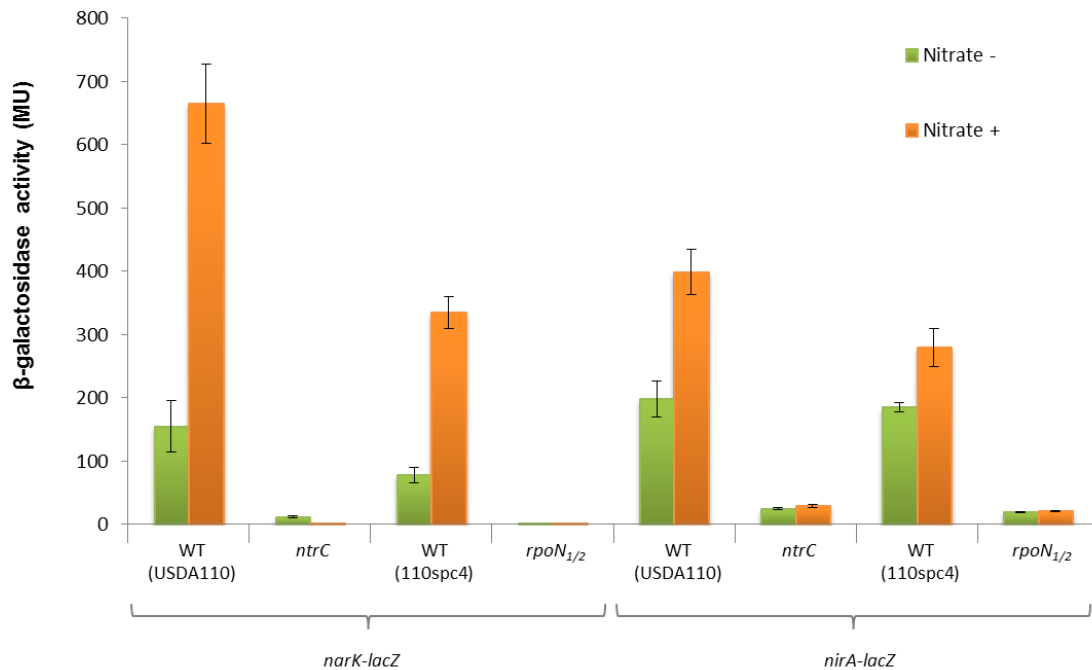


Figure 5.2.5. β -galactosidase activity derived from the *narK-lacZ* and *nirA-lacZ* fusions present in the WT strains *B. diazoefficiens* USDA 110 or 110spc4 and the *ntrC* or *rpoN_{1/2}* mutants. Cells were cultured aerobically for 48 h in minimal medium with (orange bars) or without (green bars) 10 mM nitrate as the sole N- source. In the figure, the β -galactosidase activity in Miller units (MU) is plotted on the ordinate for each of the strains indicated on the abscissa. Data are the means \pm the standard error from at least three independent cultures, assayed in triplicate.

5.2.5 Discussion

In *K. oxytoca* (Wu *et al.*, 1999), *A. vinelandii* (Wang *et al.*, 2012), and *Pseudomonas aeruginosa* (Li & Lu, 2007, Romeo *et al.*, 2012), NtrBC plays a role in the transcription of genes related to nitrate assimilation, but in rhizobia the main function of NtrC reported thus far involves the transcriptional regulation of genes involved in NH_4^+ assimilation (Patriarca *et al.*, 2002). It has been previously demonstrated the involvement of NtrC on *nirA* expression as well as the inability of a *B. diazoefficiens* *ntrC* mutant to grow on nitrite as sole N source (Franck *et al.*, 2015). Our biochemical results confirm the NtrC control over *nirA* and demonstrate for the first time the involvement of NtrC as a transcriptional regulator of the *nasC* gene encoding the assimilatory nitrate reductase as well as in the ability of *B. diazoefficiens* to grow with nitrate as the sole nitrogen source. Indeed, we showed that NtrC is essential for the expression of the assimilatory nitrate and nitrite reductase activities.

The results obtained for the growth kinetics of a *B. diazoefficiens* *ntrC* mutant have

demonstrated the previously reported role of NtrC in the nitrate dependent growth of this bacterium (Martin *et al.*, 1988). Consistent with these observations, the incapacity of another *ntrC* mutant of *Ensifer meliloti* to grow on nitrate as the sole N- source has also been reported (Szeto *et al.*, 1987). The *B. diazoefficiens rpoN_{1/2}* mutant was also found to be unable to use nitrate, suggesting a role of the sigma factor σ^{54} on the NtrC-dependent expression of nitrate assimilation. These results confirm previous findings where the requirement of at least one functional *rpoN* gene on nitrate assimilation by *B. diazoefficiens* was reported (Kullik *et al.*, 1991).

Interestingly, in this work it has also been confirmed that under nitrogen limiting conditions (*i. e.*, 0.1 μ M NH₄Cl), the growth of the *ntrC* mutant was similar to the WT strain (data not shown). This finding suggests that NtrBC does not play a main role in NH₄⁺ assimilation, perhaps because of a possible cross talk with another two-component regulatory system. In fact, downstream from the *ntrBC* genes, *B. diazoefficiens* contains the *ntrYX* loci that code for an additional two-component regulatory system, NtrYX. In support of this hypothesis, in *Azorhizobium brasilense* and *Azorhizobium caulinodans* such a possible mutual interaction between the NtrYX and NtrBC has also been suggested (Pawlowski *et al.*, 1991, Ishida *et al.*, 2002). Furthermore, the possibility that the NtrB and NtrY in *R. capsulatus* can substitute for each other as phosphodonors for NtrC has also been proposed (Drepper *et al.*, 2006). With respect to nitrite dependent growth, the *ntrC* and *rpoN_{1/2}* mutants exhibited a strong delay in growth kinetics, but were nevertheless able to reach WT growth rates after 10 days of incubation. This pattern is in contrast to recent studies where a *B. diazoefficiens ntrC* mutant was unable to grow with nitrite as the only N source (Franck *et al.*, 2015). This apparent discrepancy could be explained by the different growth conditions used by Frank and colleagues from those used in this work. Whereas they used MMB minimal medium containing 2 mM nitrite as N source and 4 ml glycerol l⁻¹ as the carbon source, in these experiments we used Evans minimal medium containing 1 mM nitrite and 10 g mannitol l⁻¹ as those respective sources. The difference in the C/N ratio present in the two growth formulations might possibly have altered the effect of NtrC on *nirA* expression and consequently on the ability of the mutants to grow on nitrite as the sole N source.

The growth defect of *ntrC* and *rpoN_{1/2}* mutants with nitrate as the N source could be

explained by the significant inhibition of NR expression in those mutants. In fact, NR activity analyses showed that only 5% of WT NR activity was retained in either of the two mutants. Similarly, *nark-lacZ* expression in those mutants was nearly undetectable. With respect to NiR activity and β -galactosidase activity from a *nirA-lacZ* fusion, a significant decrease in both activities was also observed in the *ntrC* and *rpoN_{1/2}* mutants. However, a residual NiR activity (20% of WT activity) as well some basal levels of *nirA-lacZ* expression were still present in both mutants. This basal levels of *nirA* expression and NiR activity could explain how both the *ntrC* and the *rpoN_{1/2}* mutants were able to grow on nitrite after 10 days of incubation, albeit after a significant delay.

A stronger effect of NtrC and RpoN on the NR and β -galactosidase activity from a *nark-lacZ* fusion than on the NiR and β -galactosidase activity from a *nirA-lacZ* fusion might explain the different growth responses of the *ntrC* and *rpoN_{1/2}* mutants in media containing nitrate and nitrite as the respective sole N sources. As stated above, in contrast to the majority of bacteria where the genes encoding an assimilatory nitrate reductase or nitrite reductase are arranged in the same operon (for a review see Luque-Almagro *et al.*, 2011), in *B. diazoefficiens*, the *nasC* and *nirA* are located at separate chromosomal loci. This genetic organization may explain the slight differences observed between the expression of those genes with respect to their dependence on NtrC and RpoN. Moreover, in *A. vinelandii* and *Pa. denitrificans* it has been demonstrated that in addition to NtrBC, the NasST two-component system also controls nitrate assimilation, being NasT an RNA-binding protein with a positive effect over transcription and the sensor NasS a negative regulator (Wang *et al.*, 2012; Luque-Almagro *et al.*, 2013). In *B. diazoefficiens*, the genes coding for the NasST system are clustered with *nirA*, in contrast to other bacteria, and it was reported that also controls nitrate assimilation in this rhizobium (Cabrera *et al.*, 2016). Thus, it could be possible that NasST contributes to *nirA* expression, allowing a partial remaining NiR activity and the recovery of *ntrC* mutant growth in nitrite. Nevertheless, further studies must be carried out in order to elucidate how NtrBC and NasST control the expression of nitrate and nitrite reductases in *B. diazoefficiens*.

Taken together, the results reported here clearly demonstrate the fundamental role of NtrC and RpoN in the transcriptional control of the *B. diazoefficiens* *nasC* and *nirA*

genes, those being involved in nitrate assimilation.

6

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN GENERAL

6.1. Genes implicados en la asimilación de NO_3^- y NO_2^- en *Bradyrhizobium diazoefficiens*

El estudio genómico del cromosoma de *Bradyrhizobium diazoefficiens*, nos ha permitido establecer que los genes implicados en asimilación de nitrato y nitrito se localizan principalmente formando dos grupos distales, blr2803-09 y bl4571-73 (<http://genome.kazusa.or.jp/rhizobase/>), que codifican componentes estructurales y reguladores de un sistema combinado de asimilación de nitrato y destoxificación de NO. Por otro lado, también hemos estudiado el papel en la asimilación de nitrato y nitrito del sistema regulador de 2 componentes NtrBC (blr4487-88) y del factor sigma σ^{54} alternativo, codificado por los genes *rpoN_{1/2}* (blr1883 y blr0723).

Experimentos de RT-PCR de los genes *narK-bgjb-flp-nasC* (blr2806-09) han revelado que estos constituyen una única unidad transcripcional. Sin embargo, tres genes (blr2803-05) que codifican para un posible transportador de nitrato tipo ABC [similar a NrtABC, revisado por Moreno-Vivián & Flores, 2007]), y que se encuentra junto al operón *narK-bgjb-flp-nasC* se transcriben desde un promotor diferente. El grupo de genes *nasTS-nirA* (anotados como bl4573-71, respectivamente) se encuentra a unas 2 Mb en el cromosoma del operón *narK-bgjb-flp-nasC*, y codifica un sistema regulador de dos componentes de respuesta a NO_3^- y NO_2^- , NasST (Sánchez *et al.*, 2014), y una nitrito reductasa dependiente de ferredoxina (NirA). El sistema de dos componentes NrtBC, se encuentra codificado junto a los genes *nrtYX*, otro sistema de dos componentes que puede tener relación con la asimilación de nitrato y nitrito junto a NrtBC. Los genes *ntrBC* y *ntrYX* se encuentran codificados en una región cercana al grupo de genes *nasTS-nirA*, a unas 90 Kb de distancia.

Durante la realización de esta Tesis, hemos confirmado el papel del producto del gen *bgjb* (blr2807) en destoxificación de NO descrito previamente (Sánchez *et al.*, 2011), así como la función del resto de proteínas codificadas por el operón *narK-bgjb-flp-nasC*. Además, hemos extendido el análisis a otros componentes necesarios en la asimilación de nitrato y nitrito. En este trabajo, hemos demostrado que la enzima

nitrito reductasa asimilativa (renombrada como NasC) está codificada por el gen *blr2809* y es esencial para el crecimiento dependiente de NO_3^- como única fuente de nitrógeno. También, hemos demostrado que la segunda etapa en la reducción de nitrato hasta amonio en el citoplasma durante la asimilación, la lleva a cabo la enzima nitrito reductasa NirA (codificada por *bll4571*), y es necesaria para el crecimiento con NO_3^- o NO_2^- como únicas fuentes de nitrógeno. De acuerdo con nuestros resultados, recientemente también se ha demostrado que NirA es necesaria para la utilización de NO_2^- como única fuente de nitrógeno en *B. diazoefficiens* (Franck *et al.*, 2015).

La delección de *blr2803-05*, cuyo análisis bioinformático predijo que podría codificar un transportador de NO_3^- tipo NrtABC, no afectó a la capacidad de *B. diazoefficiens* de crecer con NO_3^- como única fuente de nitrógeno. Por lo tanto, la principal ruta, o rutas, dedicadas al transporte de nitrato al citoplasma de la célula para su asimilación siguen siendo en la actualidad desconocidas. Aunque *blr2803-05* no es necesario para la asimilación de NO_3^- , en el genoma de *B. diazoefficiens* hay otros candidatos a codificar transportadores tipo ABC, como *bll5732-34*, que podrían ser los encargados del transporte de NO_3^- .

Por otro lado, también hemos demostrado en esta Tesis Doctoral, que el sistema de dos componentes NasS-NasT, es necesario para la expresión de las fusiones transcripcionales *nark-lacZ* y *nirA-lacZ*, lo que está en consonancia con el papel de este sistema, ya descrito en otras α -proteobacterias, como *Pa. denitrificans* (Luque-Almagro *et al.*, 2013).

Análisis fenotípicos de una cepa mutante de *B. diazoefficiens* que carece de la proteína Flp (codificada por *blr2808*) sugieren que Flp está implicada en la transferencia de electrones a NasC, pero no a NirA. Este hecho explica que, los genes que codifican las proteínas Flp y NasC se encuentren localizados juntos en el mismo operón (*blr2808* y *blr2809*, respectivamente), sin embargo, el gen *flp* no se localiza cerca de *nirA* (*bll4571*). Además, el análisis de los dominios de la nitrito reductasa NirA, ha revelado que esta enzima es dependiente de ferredoxina, lo que respalda la observación de que Flp sea necesario para la reducción asimilativa de nitrato pero no para la de nitrito. En discrepancia con *B. diazoefficiens*, en *Pa. denitrificans* los elementos

reguladores y estructurales para la reducción citoplasmática de NO_3^- y NO_2^- están localizados juntos constituyendo un amplio grupo de genes, *nasTSABGHC* (Gates *et al.*, 2011). Al comparar *B. diazoefficiens* con *Pa. denitrificans*, es destacable la ausencia de un homólogo a *nasG* en el operon *narK-bjgb-flp-nasC* o en el grupo de genes *nasTS-nirA* de *B. diazoefficiens*. NasG media el flujo electrónico desde la enzima nitrito reductasa, NasB, a la nitrato reductasa, NasC, siendo necesaria para la reducción asimilativa tanto de nitrato como de nitrito. NasG, además de mediar el flujo electrónico para la asimilación de nitrato y nitrito en otras bacterias, por su mecanismo de acción, previene la acumulación de nitrito en el citoplasma (Gates *et al.*, 2011, Luque-Almagro *et al.*, 2011). En su lugar, *B. diazoefficiens* contiene genes que codifican sistemas para la exportación de nitrito (NarK) y destoxificación de NO (Bjgb) dentro del operón *narK-bjgb-flp-nasC* que contiene el gen que codifica la nitrato reductasa NasC, cuya principal función es generar nitrito y NO.

La comparación de la secuencia del producto de *blr2806* con proteínas homólogas de diversos géneros sugiere que este gen codifica un antiportador de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ tipo MFS con similitud a NarK de *E. coli*. La capacidad de una cepa mutante *narK* de *B. diazoefficiens* para acumular NO_2^- en el interior de la célula demuestra la implicación de NarK en la exportación de NO_2^- . Además, los análisis fenotípicos han demostrado que NarK no es el principal mecanismo para la importación de NO_3^- , ya que la cepa mutante *narK* mantiene la capacidad de crecer a expensas de nitrato. Incluso, la mutante *narK* mejora su capacidad de crecimiento con nitrato como única fuente de nitrógeno, en comparación con la cepa silvestre, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Estas observaciones indican que NarK actúa disminuyendo los niveles de nitrito en el citoplasma al exportarlo al periplasma. Es relevante, que la proteína NarK de *B. diazoefficiens* desarrolla un papel muy diferente a un transportador de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ tipo MSF clásico como NasA, el cual provee NO_3^- a la ruta citoplasmática de asimilación de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ en otras α -proteobacterias (Gates *et al.*, 2011). Así que, por su papel en la eliminación del exceso de NO_2^- , la proteína NarK de *B. diazoefficiens* podría representar un nivel primario de protección para evitar la producción citosólica de NO, debido a la reducción de NO_2^- a NO por la enzima nitrato reductasa NasC (Rowley *et al.*, 2012). Sin embargo, como consecuencia, en la cepa silvestre la acción del

transportador NarK podría disminuir la cantidad de sustrato disponible para NirA y de esa manera limitar el crecimiento con NO_3^- .

6.2 Identificación de un sistema integrado de asimilación de nitrato y destoxificación de NO.

En general, los sistemas Nas tienen gran variabilidad de componentes estructurales, ya que dentro de un mismo grupo de genes se encuentran codificadas proteínas para el transporte y reducción de NO_3^- y NO_2^- , así como para su regulación o la biosíntesis de cofactores necesarios para este proceso (Lin & Stewart, 1998, Moreno-Vivián & Flores, 2007, Gates *et al.*, 2011, Luque-Almagro *et al.*, 2011, Moreno-Vivián *et al.*, 2011). Durante esta Tesis Doctoral, hemos identificado un sistema nuevo en bacterias donde la asimilación de NO_3^- incluye también proteínas para la destoxificación de NO. El operón, *narK-bjgb-flp-nasC* en *B. diazoefficiens* codifica una hemoglobina de dominio único (sdHb) Bjgb (Cabrera *et al.*, 2011, Sánchez *et al.*, 2011), la cual presenta homología con el dominio hemo N-terminal de la flavohemoglobina de *E. coli* (Hmp), así como con la sdHb de *Vitreoscilla stercoraria* (Vgb) y *Campilobacter jejuni* (Cgb) (Cabrera *et al.*, 2011).

La delección de *bjgb* afecta negativamente a la capacidad de *B. diazoefficiens* de crecer en condiciones limitantes de oxígeno con NO_3^- como única fuente de nitrógeno, en relación a la cepa silvestre, lo que implica a Bjgb en la protección de *B. diazoefficiens* frente al estrés nitrosativo en condiciones anaeróbicas. Sin embargo, el crecimiento de la cepa mutante *bjgb* no se ve afectado en condiciones aeróbicas, por lo que el papel de Bjgb podría restringirse únicamente a condiciones anaeróbicas con NO_3^- como única fuente de nitrógeno.

Adicionalmente, la expresión de la óxido nítrico reductasa (NorCB) respiratoria se induce significativamente en una mutante *bjgb*, en relación a la WT, probablemente debido al incremento de los niveles de NO intracelulares que se producen por la nitrato reductasa asimilativa. Estos resultados sugieren que el aumento de la expresión de NorCB, que reduce NO a N_2O , podría explicar el aumento de la producción de N_2O observado en la cepa mutante *bjgb* en comparación con la cepa silvestre.

En la Hmp de *E. coli*, el grupo prostético FAD del dominio C-terminal NADH reductasa provee los electrones desde el NAD(P)H que es necesario para la reducción del grupo hemo unido a NO en el centro activo y así completar el ciclo catalítico. Aparte de la denitrosilación del NO, la Hmp también es capaz de reducir lentamente el NO a N₂O bajo condiciones anaeróbicas, a un ratio que constituye aproximadamente el 1% al observado para la actividad aeróbica (Kim *et al.*, 1999, Hernández-Urzúa *et al.*, 2003, Gardner, 2005, Angelo *et al.*, 2008). Para el caso de Cgb (proteína de la familia sdHb, como la Bjgb, que carece del dominio reductasa presente en la flavohemoglobina Hmp), la proteína donadora de electrones sigue sin ser identificada. Sin embargo, estudios recientes de expresión heteróloga de Cgb en *E. coli* han demostrado una posible implicación de la NADH:(flavo)rubredoxina oxidorreductasa NorW (Tinajero-Trejo *et al.*, 2013). En *B. diazoefficiens*, el aumento de sensibilidad de la mutante *flp* a donadores químicos de NO sugiere que la flavoproteína Flp puede suministrar electrones necesarios para la actividad de Bjgb desde el NAD(P)H.

6.3 Papel de la nitrato reductasa asimilativa NasC en la producción de NO.

En eucariotas, las enzimas NO sintasas (NOS) han sido extensamente descritas como la principal vía para la generación de NO dedicado a la señalización celular y la defensa antimicrobiana (Alderton *et al.*, 2001). En contraste, la formación de NO en procariontes se ha considerado clásicamente como un producto de rutas respiratorias como la desnitrificación, la oxidación anaeróbica del amonio u otras vías relacionadas (Zumft, 1997, Rinaldo & Cutruzzolá, 2007, Kartal *et al.*, 2012, Maia & Moura, 2014). Sin embargo, actualmente el NO está siendo reconocido como un compuesto clave en mecanismos no respiratorios en bacterias, como por ejemplo en la protección frente a estrés nitrosativo, o el enlace entre la destoxificación de NO y la patogénesis (revisado por Maia & Moura, 2014, 2015). Además de las nitrito reductasas respiratorias (NirK/NirS) las cuales se consideran importantes fuentes de NO, estudios recientes han propuesto a la enzima nitrato reductasa respiratoria de membrana (Nar) como otra fuente de NO, la cual reduciría el nitrito a NO (Gilberthorpe & Poole, 2008, Vine *et al.*, 2011, Rowley *et al.*, 2012). Además, una pequeña contribución a la producción de NO (menos del 3%) se le ha atribuido a la enzima periplásmica, Nap (Vine *et al.*, 2011, Rowley *et al.*, 2012). En el contexto de este estudio, la potencial contribución de la

reducción de NO_2^- para la formación de NO, por NasC, durante la asimilación de NO_3^- / NO_2^- no había sido investigada aún.

En *B. diazoefficiens*, la reducción respiratoria de NO_2^- por la enzima periplasmática dependiente de cobre (NirK), es la principal vía para la formación de NO, la cual ocurre durante el proceso de desnitrificación (Velasco *et al.*, 2001, Bedmar *et al.*, 2005). Recientes estudios del Grupo del Metabolismo del Nitrógeno de la EEZ, han propuesto que el NO es la molécula señal que activa la transcripción de los genes *nor* y que este control estaría mediado por la proteína reguladora NnrR (Spiro, 2011, Spiro, 2012, Bueno *et al.*, 2017). De hecho, células de *B. diazoefficiens* que carecen de la enzima nitrato reductasa respiratoria NapA, donde la síntesis de NO por la desnitrificación está bloqueada, presentan muy baja expresión de NorCB. Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, hemos demostrado, que además de NapA, la enzima NO_3^- reductasa asimilativa (NasC) es también responsable de la generación de NO, ya que la inducción de NorCB, en comparación con la cepa silvestre, fue considerablemente menor en una mutante *nasC* y desaparece completamente en una doble mutante *nasC;napA*. Por lo tanto, la importancia de NasC no se debe exclusivamente a su papel en la asimilación de NO_3^- , sino también en la producción de NO.

La expresión como un único operón de *nark*, *bgjb*, *flp* y *nasC* que constituyen un sistema combinado de asimilación de NO_3^- y destoxificación de NO y NO_2^- puede representar un mecanismo nuevo para que la bacteria pueda mantener la homeostasis entre los niveles de NO necesarios en el citoplasma y la protección frente al estrés nitrosativo por niveles excesivos de NO que se pueden generar durante el crecimiento dependiente de NO_3^- , donde las rutas tanto para desnitrificación y la asimilación de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ son activas. Aunque la regulación conjunta entre sistemas parecidos de formación y consumo de NO ya ha sido propuesta en *Aspergillus nidulans* (Schinko *et al.*, 2010), esta es la primera vez que un mecanismo combinado de asimilación de nitrato y destoxificación de NO así ha sido identificado en bacterias. De esta manera, si la producción de NO excede unos niveles que el sistema Bgjb-Flp no puede controlar, un mecanismo de “seguridad” aumenta la expresión de NorCB para poder de este modo disminuir los niveles de NO reduciéndolo a N_2O .

6.4 Implicación de NtrBC y RpoN en la regulación de la asimilación de nitrato y nitrito en *B. diazoefficiens*

El papel que NtrBC juega en la transcripción de genes relacionados con la asimilación de nitrato ya ha sido descrito en bacterias como *Klebsiella oxytoca* (Wu *et al.*, 1999), *Azotobacter vinelandii* (Wang *et al.*, 2012), y *Pseudomonas aeruginosa* (Li & Lu, 2007, Romeo *et al.*, 2012). Sin embargo, en rizobios, la función descrita para NtrBC se limitaba básicamente a la regulación transcripcional de los genes implicados en la asimilación de NH_4^+ (Patriarca *et al.*, 2002). Estudios realizados por Franck y colaboradores (2015), han demostrado la implicación de NtrBC en la expresión de *nirA* así como la incapacidad de una cepa de *B. diazoefficiens* mutante en *ntrC* de crecer con nitrito como única fuente de nitrógeno (Franck *et al.*, 2015). Nuestros resultados han confirmado el control de NtrC sobre NirA y demuestran por primera vez la implicación de NtrC como un regulador transcripcional del operón *narK-bgjb-flp-nasC* que incluye el gen que codifica la nitrato reductasa asimilativa, *nasC*. Además, también hemos demostrado que NtrC es esencial para la expresión de las actividades nitrato y nitrito reductasas asimilativas.

Los análisis fenotípicos de una cepa mutante de *B. diazoefficiens* para el gen *ntrC*, obtenidos en este trabajo, confirman la importancia de NtrC para el crecimiento de la bacteria dependiente de nitrato (Martin *et al.*, 1988). De acuerdo con estas observaciones, también se ha demostrado la incapacidad de la mutante *ntrC* de *Ensifer meliloti* para crecer con nitrato como única fuente de nitrógeno (Szeto *et al.*, 1987).

Por otro lado, estudios previos demostraron la incapacidad para crecer con nitrato de la cepa mutante de *B. diazoefficiens* para los genes *rpoN_{1/2}*, lo que indica que el factor sigma alternativo σ^{54} , es necesario para la expresión de genes implicados en asimilación de nitrato dependientes de NtrC (Kullik *et al.*, 1991). En este trabajo es relevante el hecho de que bajo condiciones limitantes de nitrógeno (i.e., 0.1 μM NH_4Cl), el crecimiento de la cepa mutante *ntrC* es similar al de la cepa silvestre. Esto sugiere que NtrBC no juega un papel predominante en la asimilación de NH_4^+ , aunque, bajo estas circunstancias, cabe la posibilidad de que entre en juego una posible regulación cruzada con otro sistema regulador. En este contexto, a continuación de los

genes *ntrBC*, *B. diazoefficiens* contiene los genes *ntrYX* que codifican un sistema regulador de dos componentes adicional llamado NtrYX. Este sistema, ya ha sido propuesto que pueda tener una interacción con NtrBC en *Azorhizobium brasilense* y *Azorhizobium caulinodans* (Pawlowski *et al.*, 1991, Ishida *et al.*, 2002), y en *Rhodobacter capsulatus* se ha planteado la posibilidad de que NtrB y NtrY puedan actuar indistintamente para fosforilar NtrC (Drepper *et al.*, 2006).

Con respecto al crecimiento dependiente de nitrito, las mutantes *ntrC* y *rpoN_{1/2}* exhiben un gran retraso en las cinéticas de crecimiento, sin embargo, fueron capaces de alcanzar los ratios de crecimiento de la cepa silvestre después de 10 días de incubación. Este patrón contrasta con estudios recientes donde la cepa de *B. diazoefficiens* mutante en *ntrC* fue incapaz de crecer con nitrito como única fuente de nitrógeno (Franck *et al.*, 2015). Esta aparente discrepancia podría ser explicada por las diferentes condiciones de crecimiento usadas por Frank y colaboradores (2015), y las usadas en este trabajo. Mientras que estos autores usaron medio mínimo MMB con 2 mM de nitrito como fuente de nitrógeno y 4 ml de glicerol por litro como fuente de carbono, en nuestros experimentos se ha utilizado medio mínimo Evans con 1 mM de nitrito y 10 g de manitol por litro. La diferencia en la relación C/N presente en los dos medios podría posiblemente haber alterado el efecto de NtrC en la expresión de *nirA* y consecuentemente en la capacidad de los mutantes para crecen con nitrito como única fuente de N.

La significativa reducción de la actividad NR mostrada por las cepas mutantes *ntrC* y *rpoN_{1/2}*, explica que estas cepas sean incapaces de crecer con nitrato como única fuente de nitrógeno, ya que sólo mantienen el 5% de la actividad NR presente en una cepa silvestre. Del mismo modo, la expresión de la fusión *nark-lacZ* en ambas mutantes fue casi indetectable. Con respecto a la actividad NiR y β -galactosidasa de la fusión *nirA-lacZ*, se observó un descenso significativo en ambas, tanto en la mutante *ntrC* como *rpoN_{1/2}*. Sin embargo, niveles residuales de actividad NiR (20% de la actividad parental), así como niveles basales de expresión *nirA-lacZ* se mantuvieron en ambas mutantes. Estos niveles basales de actividad NiR podrían explicar por qué ambas mutantes fueron capaces de crecer con nitrito después de 10 días de incubación, aunque con un retraso significativo.

Las diferencias entre actividades NR y NiR, y las actividades β -galactosidasas de las fusiones *nark-lacZ* y *nirA-lacZ* pueden explicar la respuesta diferente en crecimiento que tienen las cepas mutantes *ntrC* y *rpoN_{1/2}* en presencia de nitrato o nitrito como única fuente de nitrógeno. Debido que, a diferencia de la mayoría de las bacterias donde los genes que codifican la nitrato reductasa o nitrito reductasa asimilativas están incluidos en el mismo operón (Luque-Almagro *et al.*, 2011), en *B. diazoefficiens*, los genes *nasC* y *nirA* están localizados en lugares separados del cromosoma. Esta organización genética podría explicar las ligeras diferencias observadas entre la expresión de esos genes con respecto a su dependencia de NtrC y RpoN. Por otro lado, como se ha demostrado en *A. vinelandii* y *Pa. desnitrificans*, además de NtrBC, el sistema de dos componentes NasST también controla la asimilación de nitrato, siendo NasT una proteína de unión a ARN con un efecto positivo sobre la transcripción y el sensor NasS, que actuaría como un regulador negativo (Wang *et al.*, 2012, Luque-Almagro *et al.*, 2013). En *B. diazoefficiens*, a diferencia de otras bacterias, los genes que codifican el sistema NasST están agrupados con *nirA*, eso podría facilitar que NasST contribuya a la expresión de *nirA*, permitiendo una actividad NiR parcial y la recuperación del crecimiento de la mutante *ntrC* con nitrito.

Tomados en conjunto, los resultados mostrados aquí claramente demuestran el papel fundamental de NtrC y RpoN en el control transcripcional de los genes *nasC* y *nirA* de *B. diazoefficiens*, los cuales están implicados en la asimilación de nitrato.

7

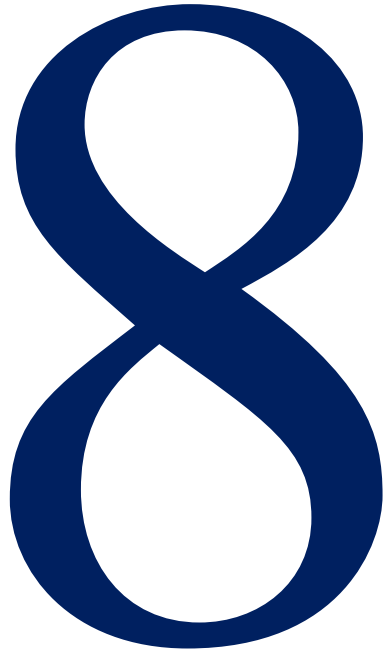
CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

7. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

1. *Bradyrhizobium diazoefficiens* es capaz de crecer a expensas de la asimilación de nitrato y nitrito gracias a la actividad de las proteínas estructurales NasC, NirA y Flp, estando Flp implicada en el transporte electrónico necesario para la reducción de NO₃⁻ por NasC.
2. La hemoglobina Bjgb, así como la flavoproteína Flp que forman parte del operón *narK-bjgb-flp-nasC* están implicadas en la detoxificación de NO.
3. La transcripción de los genes necesarios para la asimilación de nitrato y nitrito en *B. diazoefficiens* depende de los sistemas reguladores NasST, NtrBC y RpoN.
4. Además de su función en la reducción asimilativa de nitrato, NasC es también una importante fuente de NO en *B. diazoefficiens*.
5. Las proteínas codificadas por el operón *narK-bjgb-flp-nasC* de *B. diazoefficiens* constituyen un nuevo sistema coordinado de asimilación de nitrato y detoxificación de NO descrito por primera vez en bacterias.



1. *Bradyrhizobium diazoefficiens* is able to assimilate nitrate or nitrite thanks to the activity of NasC, NirA and Flp structural proteins. Flp is involved in the electron transport necessary for the reduction of NO₃⁻ by NasC.
2. The hemoglobin Bjgb and the flavoprotein Flp that are part of the operon *narK-bjgb-flp-nasC* are involved in NO detoxification.
3. Transcription of genes required for nitrate and nitrite assimilation in *B. diazoefficiens* depends on the regulatory systems NasST, NtrBC and RpoN.
4. In addition to the assimilatory nitrate reduction role for NasC, this protein is also an important source of NO in *B. diazoefficiens*.
5. The proteins encoded by the operon *narK-bjgb-flp-nasC* from *B. diazoefficiens* constitute a new coordinated system of nitrate assimilation and NO detoxification described for the first time in bacteria.



BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Attar S & de Vries S (2015) An electrogenic nitric oxide reductase. *FEBS Lett* **589**: 2050-2057.
- Alderton WK, Cooper CE & Knowles RG (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal* **357**: 593-615.
- Almeida CC, Romao CV, Lindley PF, Teixeira M & Saraiva LM (2006) The role of the hybrid cluster protein in oxidative stress defense. *J Biol Chem* **281**: 32445-32450.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410.
- Angelo M, Hausladen A, Singel DJ & Stamler JS (2008) Interactions of NO with hemoglobin: from microbes to man. *Methods in Enzymology* **436**: 131-168.
- Anjum MF, Stevanin TM, Read RC & Moir JW (2002) Nitric oxide metabolism in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* **184**: 2987-2993.
- Appleby CA (1984) Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Annu Rev Plant Physiol* **35**: 443-478.
- Arai H, Igarashi Y & Kodama T (1995) Expression of the *nir* and *nor* genes for denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* requires a novel CRP/FNR-related transcriptional regulator, DNR, in addition to ANR. *FEBS Lett* **371**: 73-76.
- Arai H, Roh JH, Eraso JM & Kaplan S (2013) Transcriptome response to nitrosative stress in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **77**: 111-118.
- Aruoma OI, Halliwell B, Gajewski E & Dizdaroglu M (1989) Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxide and ferric ion chelates. *J Biol Chem* **264**: 20509-20512.
- Arya S, Sethi D, Singh S, *et al.* (2013) Truncated hemoglobin, HbN, is post-translationally modified in *Mycobacterium tuberculosis* and modulates host-pathogen interactions during intracellular infection. *J Biol Chem* **288**: 29987-29999.
- Bali S, Palmer DJ, Schroeder S, Ferguson SJ & Warren MJ (2014) Recent advances in the biosynthesis of modified tetrapyrroles: the discovery of an alternative pathway for the formation of heme and heme d 1. *Cell Mol Life Sci* **71**: 2837-2863.
- Baptista JM, Justino MC, Melo AM, Teixeira M & Saraiva LM (2012) Oxidative stress modulates the nitric oxide defense promoted by *Escherichia coli* flavorubredoxin. *J Bacteriol* **194**: 3611-3617.
- Bartberger MD, Liu W, Ford E, Miranda KM, Switzer C, Fukuto JM, Farmer PJ, Wink DA & Houk KN (2002) The reduction potential of nitric oxide (NO) and its importance to NO biochemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 10958-10963.

Bates BC, Kundzewicz S, Wu J & Palutikof P (2008) Climate Change and Water. *Technical Paper of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, p. 210. IPCC Secretariat, Geneva.

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

Beaumont HJ, Lens SI, Reijnders WN, Westerhoff HV & van Spanning RJ (2004) Expression of nitrite reductase in *Nitrosomonas europaea* involves NsrR, a novel nitrite-sensitive transcription repressor. *Mol Microbiol* **54**: 148-158.

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

Bedmar EJ, Bueno E, Correa D, Torres MJ, Delgado MJ & Mesa S (2013) Ecology of denitrification in soils and plant-associated bacteria. *Beneficial Plant-Microbial Interactions: Ecology and Applications*, (González MBR & Gonzalez-López J, eds.), p. 164-182. CRC Press, Florida.

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

Behrendt U, Augustin J, Sproer C, Gelbrecht J, Schumann P & Ulrich A (2015) Taxonomic characterisation of *Proteus terrae* sp. nov., a N₂O-producing, nitrate-ammonifying soil bacterium. *Antonie Van Leeuwenhoek* **108**: 1457-1468.

Bell LC, Richardson DJ & Ferguson SJ (1992) Identification of nitric oxide reductase activity in *Rhodobacter capsulatus*: the electron transport pathway can either use or bypass both cytochrome c₂ and the cytochrome bc₁ complex. *J Gen Microbiol* **138**: 437-443.

Bell LC, Page MD, Berks BC, Richardson DJ & Ferguson SJ (1993) Insertion of transposon Tn5 into a structural gene of the membrane-bound nitrate reductase of *Thiosphaera pantotropha* results in anaerobic overexpression of periplasmic nitrate reductase activity. *J Gen Microbiol* **139**: 3205-3214.

Bergaust LL, Hartsock A, Liu B, Bakken LR & Shapleigh JP (2014) Role of norEF in denitrification, elucidated by physiological experiments with *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **196**: 2190-2200.

Bergersen FJ (1977) A treatise on dinitrogen fixation. *Biology: Section III*, (Hardy RW & Silver W, eds.), p. 519-556. John Wiley & Sons, New York.

Bertero MG, Rothery RA, Boroumand N, Palak M, Blasco F, Ginet N, Weiner JH & Strynadka NC (2005) Structural and biochemical characterization of a quinol binding site of *Escherichia coli* nitrate reductase A. *J Biol Chem* **280**: 14836-14843.

- Blanquet P, Silva L, Catrice O, Bruand C, Carvalho H & Meilhoc E (2015) *Sinorhizobium meliloti* Controls Nitric Oxide-Mediated Post-Translational Modification of a *Medicago truncatula* Nodule Protein. *Mol Plant Microbe Interact* **28**: 1353-1363.
- Blasco R, Castillo F & Martinez-Luque M (1997) The assimilatory nitrate reductase from the phototrophic bacterium, *Rhodobacter capsulatus* E1F1, is a flavoprotein. *FEBS Lett* **414**: 45-49.
- Bleakley BH & Tiedje JM (1982) Nitrous oxide production by organisms other than nitrifiers or denitrifiers. *Appl Environ Microbiol* **44**: 1342-1348.
- Bobik C, Meilhoc E & Batut J (2006) FixJ: a major regulator of the oxygen limitation response and late symbiotic functions of *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **188**: 4890-4902.
- Bodenmiller DM & Spiro S (2006) The yjeB (nsrR) gene of *Escherichia coli* encodes a nitric oxide-sensitive transcriptional regulator. *J Bacteriol* **188**: 874-881.
- Brandes N, Rinck A, Leichert LI & Jakob U (2007) Nitrosative stress treatment of *E. coli* targets distinct set of thiol-containing proteins. *Mol Microbiol* **66**: 901-914.
- Bricio C, Alvarez L, San Martin M, Schurig-Briccio LA, Gennis RB & Berenguer J (2014) A third subunit in ancestral cytochrome c-dependent nitric oxide reductases. *Appl Environ Microbiol* **80**: 4871-4878.
- Briolat V & Reysset G (2002) Identification of the *Clostridium perfringens* genes involved in the adaptive response to oxidative stress. *J Bacteriol* **184**: 2333-2343.
- Brittain T, Blackmore R, Greenwood C & Thomson AJ (1992) Bacterial nitrite-reducing enzymes. *Eur J Biochem* **209**: 793-802.
- Buddha MR, Tao T, Parry RJ & Crane BR (2004) Regioselective nitration of tryptophan by a complex between bacterial nitric-oxide synthase and tryptophanyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem* **279**: 49567-49570.
- Bueno E, Bedmar EJ, Richardson DJ & Delgado MJ (2008) Role of *Bradyrhizobium japonicum* cytochrome c550 in nitrite and nitrate respiration. *FEMS Microbiol Lett* **279**: 188-194.
- Bueno E, Mesa S, Sanchez C, Bedmar EJ & Delgado MJ (2010) NifA is required for maximal expression of denitrification genes in *Bradyrhizobium japonicum*. *Environ Microbiol* **12**: 393-400.
- Bueno E, Mesa S, Bedmar EJ, Richardson DJ & Delgado MJ (2012) Bacterial adaptation of respiration from oxic to microoxic and anoxic conditions: redox control. *Antioxid Redox Signal* **16**: 819-852.
- Bueno E, Robles EF, Torres MJ, Krell T, Bedmar EJ, Delgado MJ & Mesa S (2017) Disparate response to microoxia and nitrogen oxides of the *Bradyrhizobium japonicum* napEDABC, nirK and norCBQD denitrification genes. *Nitric Oxide*.
- Burgmayer SJN & Stiefel EI (1985) Molybdenum enzymes, cofactors, and systems: The chemical uniqueness of molybdenum. *Journal of Chemical Education* **62**: 943.

- Burney S, Niles JC, Dedon PC & Tannenbaum SR (1999) DNA damage in deoxynucleosides and oligonucleotides treated with peroxynitrite. *Chem Res Toxicol* **12**: 513-520.
- Busch A, Strube K, Friedrich B & Cramm R (2005) Transcriptional regulation of nitric oxide reduction in *Ralstonia eutropha* H16. *Biochem Soc Trans* **33**: 193-194.
- Bush M & Dixon R (2012) The role of bacterial enhancer binding proteins as specialized activators of sigma54-dependent transcription. *Microbiol Mol Biol Rev* **76**: 497-529.
- Bush M, Ghosh T, Tucker N, Zhang X & Dixon R (2010) Nitric oxide-responsive interdomain regulation targets the sigma54-interaction surface in the enhancer binding protein NorR. *Mol Microbiol* **77**: 1278-1288.
- Butland G, Spiro S, Watmough NJ & Richardson DJ (2001) Two conserved glutamates in the bacterial nitric oxide reductase are essential for activity but not assembly of the enzyme. *J Bacteriol* **183**: 189-199.
- Cabello P, Roldán MD & Moreno-Vivián C (2004) Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea. *Microbiology* **150**: 3527-3546.
- Cabello P, Pino C, Olmo-Mira MF, Castillo F, Roldan MD & Moreno-Vivian C (2004) Hydroxylamine assimilation by *Rhodobacter capsulatus* E1F1. requirement of the hcp gene (hybrid cluster protein) located in the nitrate assimilation nas gene region for hydroxylamine reduction. *J Biol Chem* **279**: 45485-45494.
- Cabrera JJ, Sánchez C, Gates AJ, Bedmar EJ, Mesa S, Richardson DJ & Delgado MJ (2011) The nitric oxide response in plant-associated endosymbiotic bacteria. *Biochem Soc Trans* **39**: 1880-1885.
- Cabrera JJ, Salas A, Torres MJ, Bedmar EJ, Richardson DJ, Gates AJ & Delgado MJ (2016) An integrated biochemical system for nitrate assimilation and nitric oxide detoxification in *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochemical Journal* **473**: 297-309.
- Calmels S, Ohshima H & Bartsch H (1988) Nitrosamine formation by denitrifying and non-denitrifying bacteria: implication of nitrite reductase and nitrate reductase in nitrosation catalysis. *J Gen Microbiol* **134**: 221-226.
- Canfield DE, Glazer AN & Falkowski PG (2010) The evolution and future of Earth's nitrogen cycle. *Science* **330**: 192-196.
- Castiglione N, Rinaldo S, Giardina G & Cutruzzola F (2009) The transcription factor DNR from *Pseudomonas aeruginosa* specifically requires nitric oxide and haem for the activation of a target promoter in *Escherichia coli*. *Microbiology* **155**: 2838-2844.
- Cébron A & Garnier J (2005) Nitrobacter and Nitrospira genera as representatives of nitrite-oxidizing bacteria: Detection, quantification and growth along the lower Seine River (France). *Water Research* **39**: 4979-4992.

- Chai W & Stewart V (1999) RNA sequence requirements for NasR-mediated, nitrate-responsive transcription antitermination of the *Klebsiella oxytoca* M5al nasF operon leader. *J Mol Biol* **292**: 203-216.
- Chan J, Xing Y, Magliozzo RS & Bloom BR (1992) Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *The Journal of experimental medicine* **175**: 1111-1122.
- Chen P & Reitzer LJ (1995) Active contribution of two domains to cooperative DNA binding of the enhancer-binding protein nitrogen regulator I (NtrC) of *Escherichia coli*: stimulation by phosphorylation and the binding of ATP. *J Bacteriol* **177**: 2490-2496.
- Chen Y & Rosazza JP (1994) A bacterial nitric oxide synthase from a *Nocardia* species. *Biochem Biophys Res Commun* **203**: 1251-1258.
- Chhabra S & Spiro S (2015) Inefficient translation of nsrR constrains behaviour of the NsrR regulon in *Escherichia coli*. *Microbiology* **161**: 2029-2038.
- Choi PS, Naal Z, Moore C, Casado-Rivera E, Abruna HD, Helmann JD & Shapleigh JP (2006) Assessing the impact of denitrifier-produced nitric oxide on other bacteria. *Appl Environ Microbiol* **72**: 2200-2205.
- Clarke TA, Cole JA, Richardson DJ & Hemmings AM (2007) The crystal structure of the pentahaem c-type cytochrome NrfB and characterization of its solution-state interaction with the pentahaem nitrite reductase NrfA. *Biochem J* **406**: 19-30.
- Clarke TA, Mills PC, Poock SR, *et al.* (2008) *Escherichia coli* cytochrome c nitrite reductase NrfA. *Methods Enzymol* **437**: 63-77.
- Coelho C, Gonzalez PJ, Moura JG, Moura I, Trincao J & Joao Romao M (2011) The crystal structure of *Cupriavidus necator* nitrate reductase in oxidized and partially reduced states. *J Mol Biol* **408**: 932-948.
- Cole J (1996) Nitrate reduction to ammonia by enteric bacteria: redundancy, or a strategy for survival during oxygen starvation? *FEMS Microbiol Lett* **136**: 1-11.
- Coleman KJ, Cornish-Bowden A & Cole JA (1978) Purification and properties of nitrite reductase from *Escherichia coli* K12. *Biochemical Journal* **175**: 483-493.
- Constantinidou C, Hobman JL, Griffiths L, Patel MD, Penn CW, Cole JA & Overton TW (2006) A reassessment of the FNR regulon and transcriptomic analysis of the effects of nitrate, nitrite, NarXL, and NarQP as *Escherichia coli* K12 adapts from aerobic to anaerobic growth. *J Biol Chem* **281**: 4802-4815.
- Corker H & Poole RK (2003) Nitric oxide formation by *Escherichia coli*. Dependence on nitrite reductase, the NO-sensing regulator Fnr, and flavohemoglobin Hmp. *J Biol Chem* **278**: 31584-31592.

Crack JC, Stapleton MR, Green J, Thomson AJ & Le Brun NE (2013) Mechanism of [4Fe-4S](Cys)₄ cluster nitrosylation is conserved among NO-responsive regulators. *J Biol Chem* **288**: 11492-11502.

Crawford MJ & Goldberg DE (1998) Regulation of the *Salmonella typhimurium* flavohemoglobin gene. A new pathway for bacterial gene expression in response to nitric oxide. *J Biol Chem* **273**: 34028-34032.

Crutzen PJ, Mosier AR, Smith KA & Winiwarter W (2008) N₂O release from agro-biofuel production negates global warming reduction by replacing fossil fuels. *Atmos Chem Phys* **8**: 389-395.

Cruz-Ramos H, Crack J, Wu G, Hughes MN, Scott C, Thomson AJ, Green J & Poole RK (2002) NO sensing by FNR: regulation of the *Escherichia coli* NO-detoxifying flavohaemoglobin, Hmp. *The EMBO journal* **21**: 3235-3244.

Cuklina J, Hahn J, Imakaev M, *et al.* (2016) Genome-wide transcription start site mapping of *Bradyrhizobium japonicum* grown free-living or in symbiosis - a rich resource to identify new transcripts, proteins and to study gene regulation. *BMC genomics* **17**: 302.

Cullen PJ, Bowman WC & Kranz RG (1996) In vitro reconstitution and characterization of the *Rhodobacter capsulatus* NtrB and NtrC two-component system. *J Biol Chem* **271**: 6530-6536.

D'Autreaux B, Horner O, Oddou JL, Jeandey C, Gambarelli S, Berthomieu C, Latour JM & Michaud-Soret I (2004) Spectroscopic description of the two nitrosyl-iron complexes responsible for fur inhibition by nitric oxide. *J Am Chem Soc* **126**: 6005-6016.

Daskalakis V, Ohta T, Kitagawa T & Varotsis C (2015) Structure and properties of the catalytic site of nitric oxide reductase at ambient temperature. *Biochim Biophys Acta* **1847**: 1240-1244.

de Boer AP, van der Oost J, Reijnders WN, Westerhoff HV, Stouthamer AH & van Spanning RJ (1996) Mutational analysis of the nor gene cluster which encodes nitric-oxide reductase from *Paracoccus denitrificans*. *Eur J Biochem* **242**: 592-600.

Delamuta JR, Ribeiro RA, Ormeno-Orrillo E, Melo IS, Martinez-Romero E & Hungria M (2013) Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**: 3342-3351.

Delgado MJ, Olivares J & Bedmar EJ (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.

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

Delgado MJ, Casella S & Bedmar EJ (2007) Denitrification in rhizobia-legume symbiosis. *Biology of the Nitrogen Cycle*, (Bothe H, Ferguson SJ & Newton WE, eds.), p. 57-66. Elsevier, Amsterdam.

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

Desloover J, Roobroeck D, Heylen K, Puig S, Boeckx P, Verstraete W & Boon N (2014) Pathway of nitrous oxide consumption in isolated *Pseudomonas stutzeri* strains under anoxic and oxic conditions. *Environ Microbiol* **16**: 3143-3152.

Dias JM, Than ME, Humm A, *et al.* (1999) Crystal structure of the first dissimilatory nitrate reductase at 1.9 Å solved by MAD methods. *Structure* **7**: 65-79.

Dixon R & Kahn D (2004) Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat Rev Microbiol* **2**: 621-631.

Downie JA (2005) Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. *Curr Biol* **15**: R196-198.

Drepper T, Wiethaus J, Giaourakis D, Groß S, Schubert B, Vogt M, Wiencek Y, McEwan AG & Masepohl B (2006) Cross-talk towards the response regulator NtrC controlling nitrogen metabolism in *Rhodobacter capsulatus*. *FEMS Microbiology Letters* **258**: 250-256.

Eady RR, Antonyuk SV & Hasnain SS (2016) Fresh insight to functioning of selected enzymes of the nitrogen cycle. *Curr Opin Chem Biol* **31**: 103-112.

Earnshaw A & Greenwood N (1997) Chemistry of the Elements. p. pp. 1341. Elsevier.

Egelhoff TT, Fisher RF, Jacobs TW, Mulligan JT & Long SR (1985) Nucleotide sequence of *Rhizobium meliloti* 1021 nodulation genes: *nodD* is read divergently from *nodABC*. *DNA* **4**: 241-248.

Einsle O (2011) Structure and function of formate-dependent cytochrome c nitrite reductase, NrfA. *Methods Enzymol* **496**: 399-422.

Einsle O & Kroneck PM (2004) Structural basis of denitrification. *Biol Chem* **385**: 875-883.

Elvers KT, Wu G, Gilberthorpe NJ, Poole RK & Park SF (2004) Role of an inducible single-domain hemoglobin in mediating resistance to nitric oxide and nitrosative stress in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Bacteriol* **186**: 5332-5341.

Elvers KT, Turner SM, Wainwright LM, Marsden G, Hinds J, Cole JA, Poole RK, Penn CW & Park SF (2005) NssR, a member of the Crp-Fnr superfamily from *Campylobacter jejuni*, regulates a nitrosative stress-responsive regulon that includes both a single-domain and a truncated haemoglobin. *Mol Microbiol* **57**: 735-750.

Evans CGT, Herbert D & Tempest DW (1970) The continuous *cultivation* of microorganisms. 2. Construction of a chemostat. *Methods in Microbiology* **2**: 275-327.

Ferguson SJ, Richardson DJ & Spanning RJ (2007) *Biochemistry and Molecular Biology of Nitrification*. Elsevier, The Netherlands.

Fernández E, Galván A & Quesada A (1998) *The molecular biology of chloroplasts and mitochondria in Chlamydomonas*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Fernández N, Cabrera JJ, Salazar S, Parejo S, Rodríguez MC, Lindemann A, Bonnet M, Hennecke H, Bedmar EJ & Mesa S (2016) Molecular Determinants of Negative Regulation of the *Bradyrhizobium diazoefficiens* Transcription Factor FixK2. *Biological Nitrogen Fixation and Beneficial Plant-Microbe Interaction*, (González-Andrés F & James E, eds.), p. 57-72. Springer International Publishing, Cham.

Figueiredo MC, Lobo SA, Sousa SH, Pereira FP, Wall JD, Nobre LS & Saraiva LM (2013) Hybrid cluster proteins and flavodiiron proteins afford protection to *Desulfovibrio vulgaris* upon macrophage infection. *J Bacteriol* **195**: 2684-2690.

Filenko N, Spiro S, Browning DF, Squire D, Overton TW, Cole J & Constantinidou C (2007) The NsrR regulon of *Escherichia coli* K-12 includes genes encoding the hybrid cluster protein and the periplasmic, respiratory nitrite reductase. *J Bacteriol* **189**: 4410-4417.

Fischer HM (1994) Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol Rev* **58**: 352-386.

Fleischhacker AS & Kiley PJ (2011) Iron-containing transcription factors and their roles as sensors. *Curr Opin Chem Biol* **15**: 335-341.

Flores E, Frias JE, Rubio LM & Herrero A (2005) Photosynthetic nitrate assimilation in cyanobacteria. *Photosynth Res* **83**: 117-133.

Forchhammer K (2008) P_{II} signal transducers: novel functional and structural insights. *Trends Microbiol* **16**: 65-72.

Franck WL, Qiu J, Lee H, Chang W & Stacey G (2015) DNA Microarray-Based Identification of Genes Regulated by NtrC in *Bradyrhizobium japonicum*. *Appl Environ Microbiol* **81**: 5299-5308.

Fukuda M, Takeda H, Kato HE, Doki S, Ito K, Maturana AD, Ishitani R & Nureki O (2015) Structural basis for dynamic mechanism of nitrate/nitrite antiport by NarK. *Nat Commun* **6**: 7097.

Galloway JN, Townsend AR, Erismann JW, Bekunda M, Cai Z, Freney JR, Martinelli LA, Seitzinger SP & Sutton MA (2008) Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science* **320**: 889-892.

Gangeswaran R, Lowe DJ & Eady RR (1993) Purification and characterization of the assimilatory nitrate reductase of *Azotobacter vinelandii*. *Biochem J* **289 (Pt 2)**: 335-342.

Gardner AM & Gardner PR (2002) Flavohemoglobin detoxifies nitric oxide in aerobic, but not anaerobic, *Escherichia coli*. Evidence for a novel inducible anaerobic nitric oxide-scavenging activity. *J Biol Chem* **277**: 8166-8171.

Gardner AM, Helmick RA & Gardner PR (2002) Flavorubredoxin, an inducible catalyst for nitric oxide reduction and detoxification in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **277**: 8172-8177.

- Gardner PR (2005) Nitric oxide dioxygenase function and mechanism of flavohemoglobin, hemoglobin, myoglobin and their associated reductases. *J Inorg Biochem* **99**: 247-266.
- Gardner PR, Gardner AM, Martin LA & Salzman AL (1998) Nitric oxide dioxygenase: an enzymic function for flavohemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 10378-10383.
- Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD & Bairoch A (2003) ExpASY: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic acids research* **31**: 3784-3788.
- Gates AJ, Luque-Almagro VM, Goddard AD, Ferguson SJ, Roldán MD & Richardson DJ (2011) A composite biochemical system for bacterial nitrate and nitrite assimilation as exemplified by *Paracoccus denitrificans*. *Biochem J* **435**: 743-753.
- Giardina G, Rinaldo S, Castiglione N, Caruso M & Cutruzzola F (2009) A dramatic conformational rearrangement is necessary for the activation of DNR from *Pseudomonas aeruginosa*. Crystal structure of wild-type DNR. *Proteins* **77**: 174-180.
- Giardina G, Rinaldo S, Johnson KA, Di Matteo A, Brunori M & Cutruzzola F (2008) NO sensing in *Pseudomonas aeruginosa*: structure of the transcriptional regulator DNR. *J Mol Biol* **378**: 1002-1015.
- Gilberthorpe NJ & Poole RK (2008) Nitric oxide homeostasis in *Salmonella typhimurium*: roles of respiratory nitrate reductase and flavohemoglobin. *J Biol Chem* **283**: 11146-11154.
- Gilles-Gonzalez MA & Gonzalez G (2005) Heme-based sensors: defining characteristics, recent developments, and regulatory hypotheses. *J Inorg Biochem* **99**: 1-22.
- Gilles-Gonzalez MA, Gonzalez G, Perutz MF, Kiger L, Marden MC & Poyart C (1994) Heme-based sensors, exemplified by the kinase FixL, are a new class of heme protein with distinctive ligand binding and autoxidation. *Biochemistry* **33**: 8067-8073.
- Glyan'ko AK (2015) [Signaling Systems of Rhizobia (Rhizobiaceae) and Leguminous Plants (Fabaceae) upon the Formation of a Legume-Rhizobium Symbiosis (Review)]. *Prikl Biokhim Mikrobiol* **51**: 453-464.
- Goddard AD, Moir JW, Richardson DJ & Ferguson SJ (2008) Interdependence of two NarK domains in a fused nitrate/nitrite transporter. *Molecular Microbiology* **70**: 667-681.
- Goddard AD, Bali S, Mavridou DA, Luque-Almagro VM, Gates AJ, Dolores Roldan M, Newstead S, Richardson DJ & Ferguson SJ (2017) The *Paracoccus denitrificans* NarK-like nitrate and nitrite transporters-probing nitrate uptake and nitrate/nitrite exchange mechanisms. *Mol Microbiol* **103**: 117-133.
- Gomes CM, Vicente JB, Wasserfallen A & Teixeira M (2000) Spectroscopic studies and characterization of a novel electron-transfer chain from *Escherichia coli* involving a flavorubredoxin and its flavoprotein reductase partner. *Biochemistry* **39**: 16230-16237.
- Goretski J, Zafiriou OC & Hollocher TC (1990) Steady-state nitric oxide concentrations during denitrification. *J Biol Chem* **265**: 11535-11538.

Graham PH & Vance CP (2003) Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol* **131**: 872-877.

Grainger DC, Aiba H, Hurd D, Browning DF & Busby SJ (2007) Transcription factor distribution in *Escherichia coli*: studies with FNR protein. *Nucleic acids research* **35**: 269-278.

Green J, Crack JC, Thomson AJ & LeBrun NE (2009) Bacterial sensors of oxygen. *Curr Opin Microbiol* **12**: 145-151.

Greer FR & Shannon M (2005) Infant methemoglobinemia: the role of dietary nitrate in food and water. *Pediatrics* **116**: 784-786.

Guerrero M, Vega J & Losada M (1981) The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Annu Rev Plant Physiol* **32**: 169-204.

Gusarov I & Nudler E (2005) NO-mediated cytoprotection: instant adaptation to oxidative stress in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 13855-13860.

Gusarov I, Shatalin K, Starodubtseva M & Nudler E (2009) Endogenous nitric oxide protects bacteria against a wide spectrum of antibiotics. *Science* **325**: 1380-1384.

Gusarov I, Starodubtseva M, Wang ZQ, McQuade L, Lippard SJ, Stuehr DJ & Nudler E (2008) Bacterial nitric-oxide synthases operate without a dedicated redox partner. *J Biol Chem* **283**: 13140-13147.

Gutiérrez JC, Ramos F, Ortner L & Tortolero M (1995) *nasST*, two genes involved in the induction of the assimilatory nitrite—nitrate reductase operon (*nasAB*) of *Azotobacter vinelandii*. *Mol Microbiol* **18**: 579-591.

Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.

Harlan EW, Berg JM & Holm RH (1986) Thermodynamic fitness of molybdenum(IV,VI) complexes for oxygen-atom transfer reactions, including those with enzymic substrates. *Journal of the American Chemical Society* **108**: 6992-7000.

Harper LA, Flesch TK, Weaver KH & Wilson JD (2010) The effect of biofuel production on swine farm methane and ammonia emissions. *J Environ Qual* **39**: 1984-1992.

Hartsock A & Shapleigh JP (2010) Identification, functional studies, and genomic comparisons of new members of the NnrR regulon in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **192**: 903-911.

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

Hausladen A, Gow A & Stamler JS (2001) Flavohemoglobin denitrosylase catalyzes the reaction of a nitroxyl equivalent with molecular oxygen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10108-10112.

Hendriks J, Oubrie A, Castresana J, Urbani A, Gemeinhardt S & Saraste M (2000) Nitric oxide reductases in bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1459**: 266-273.

Hernandez-Urzuza E, Mills CE, White GP, Contreras-Zentella ML, Escamilla E, Vasudevan SG, Membrillo-Hernandez J & Poole RK (2003) Flavohemoglobin Hmp, but not its individual domains, confers protection from respiratory inhibition by nitric oxide in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **278**: 34975-34982.

Herridge DF, Peoples MB & Boddey RM (2008) Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and Soil* **311**: 1-18.

Heylen K & Keltjens J (2012) Redundancy and modularity in membrane-associated dissimilatory nitrate reduction in *Bacillus*. *Frontiers in microbiology* **3**: 371.

Hino T, Matsumoto Y, Nagano S, Sugimoto H, Fukumori Y, Murata T, Iwata S & Shiro Y (2010) Structural basis of biological N₂O generation by bacterial nitric oxide reductase. *Science* **330**: 1666-1670.

Horchani F, Prévot M, Boscari A, *et al.* (2011) Both plant and bacterial nitrate reductases contribute to nitric oxide production in *Medicago truncatula* nitrogen-fixing nodules. *Plant Physiol* **155**: 1023-1036.

Howarth RW (2004) Human acceleration of the nitrogen cycle: drivers, consequences, and steps toward solutions. *Water Sci Technol* **49**: 7-13.

Hutchings MI & Spiro S (2000) The nitric oxide regulated nor promoter of *Paracoccus denitrificans*. *Microbiology* **146**: 2635-2641.

Inaba S, Ikenishi F, Itakura M, Kikuchi M, Eda S, Chiba N, Katsuyama C, Suwa Y, Mitsui H & Minamisawa K (2012) N₂O emission from degraded soybean nodules depends on denitrification by *Bradyrhizobium japonicum* and other microbes in the rhizosphere. *Microbes Environ* **27**: 470-476.

Isabella VM, Lapek JD, Jr., Kennedy EM & Clark VL (2009) Functional analysis of NsrR, a nitric oxide-sensing Rrf2 repressor in *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol* **71**: 227-239.

Ishida ML, Assumpção MC, Machado HB, Benelli EM, Souza EM & Pedrosa FO (2002) Identification and characterization of the two-component NtrY/NtrX regulatory system in *Azospirillum brasilense*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **35**: 651-661.

Jepson BJ, Anderson LJ, Rubio LM, Taylor CJ, Butler CS, Flores E, Herrero A, Butt JN & Richardson DJ (2004) Tuning a nitrate reductase for function. The first spectropotentiometric characterization of a bacterial assimilatory nitrate reductase reveals novel redox properties. *J Biol Chem* **279**: 32212-32218.

Jetten MS (2008) The microbial nitrogen cycle. *Environ Microbiol* **10**: 2903-2909.

Jetten MS, Niftrik L, Strous M, Kartal B, Keltjens JT & Op den Camp HJ (2009) Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **44**: 65-84.

- Ji XB & Hollocher TC (1988) Reduction of nitrite to nitric oxide by enteric bacteria. *Biochem Biophys Res Commun* **157**: 106-108.
- Jiang P & Ninfa AJ (1999) Regulation of Autophosphorylation of *Escherichia coli* Nitrogen Regulator II by the PII Signal Transduction Protein. *J Bacteriol* **181**: 1906-1911.
- Jiang P & Ninfa AJ (2009) α -Ketoglutarate Controls the Ability of the *Escherichia coli* PII Signal Transduction Protein To Regulate the Activities of NRII (NtrB) but Does Not Control the Binding of PII to NRII. *Biochemistry* **48**: 11514-11521.
- Johnson EG, Sparks JP, Dzikovski B, Crane BR, Gibson DM & Loria R (2008) Plant-pathogenic *Streptomyces* species produce nitric oxide synthase-derived nitric oxide in response to host signals. *Chemistry & biology* **15**: 43-50.
- Jones CM, Graf DR, Bru D, Philippot L & Hallin S (2013) The unaccounted yet abundant nitrous oxide-reducing microbial community: a potential nitrous oxide sink. *The ISME journal* **7**: 417-426.
- Jormakka M, Richardson D, Byrne B & Iwata S (2004) Architecture of NarGH reveals a structural classification of Mo-bisMGD enzymes. *Structure* **12**: 95-104.
- Justino MC, Vicente JB, Teixeira M & Saraiva LM (2005) New genes implicated in the protection of anaerobically grown *Escherichia coli* against nitric oxide. *J Biol Chem* **280**: 2636-2643.
- Justino MC, Almeida CC, Teixeira M & Saraiva LM (2007) *Escherichia coli* di-iron YtfE protein is necessary for the repair of stress-damaged iron-sulfur clusters. *J Biol Chem* **282**: 10352-10359.
- Kanayama Y, Watanabe I & Yamamoto Y (1990) Inhibition of Nitrogen Fixation in Soybean Plants Supplied with Nitrate I. Nitrite Accumulation and Formation of Nitrosylhemoglobin in Nodules *Plant Cell Physiol* **31 (3)**: 6.
- Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, *et al.* (2002) Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res* **9**: 189-197.
- Kartal B, van Niftrik L, Keltjens JT, Op den Camp HJ & Jetten MS (2012) Anammox-growth physiology, cell biology, and metabolism. *Adv Microb Physiol* **60**: 211-262.
- Kato K, Kanahama K & Kanayama Y (2010) Involvement of nitric oxide in the inhibition of nitrogenase activity by nitrate in *Lotus* root nodules. *J Plant Physiol* **167**: 238-241.
- Kelker HC & Filner P (1971) Regulation of nitrite reductase and its relationship to the regulation of nitrate reductase in cultured tobacco cells. *Biochim Biophys Acta* **252**: 69-82.
- Kern M & Simon J (2009) Electron transport chains and bioenergetics of respiratory nitrogen metabolism in *Wolinella succinogenes* and other Epsilonproteobacteria. *Biochim Biophys Acta* **1787**: 646-656.
- Kern M & Simon J (2016) Three transcription regulators of the Nss family mediate the adaptive response induced by nitrate, nitric oxide or nitrous oxide in *Wolinella succinogenes*. *Environ Microbiol* **18**: 2899-2912.

- Kern M, Volz J & Simon J (2011) The oxidative and nitrosative stress defence network of *Wolinella succinogenes*: cytochrome c nitrite reductase mediates the stress response to nitrite, nitric oxide, hydroxylamine and hydrogen peroxide. *Environ Microbiol* **13**: 2478-2494.
- Kim SO, Oriei Y, Lloyd D, Hughes MN & Poole RK (1999) Anoxic function for the *Escherichia coli* flavohaemoglobin (Hmp): reversible binding of nitric oxide and reduction to nitrous oxide. *FEBS Letters* **445**: 389-394.
- Kim SO, Merchant K, Nudelman R, Beyer WF, Jr., Keng T, DeAngelo J, Hausladen A & Stamler JS (2002) OxyR: a molecular code for redox-related signaling. *Cell* **109**: 383-396.
- Kirchner O & Tauch A (2003) Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology* **104**: 287-299.
- Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA & Collins JJ (2007) A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* **130**: 797-810.
- Koropatkin NM, Pakrasi HB & Smith TJ (2006) Atomic structure of a nitrate-binding protein crucial for photosynthetic productivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 9820-9825.
- Kullik I, Fritsche S, Knobel H, Sanjuan J, Hennecke H & Fischer HM (1991) *Bradyrhizobium japonicum* has two differentially regulated, functional homologs of the sigma 54 gene (*rpoN*). *J Bacteriol* **173**: 1125-1138.
- Kuznetsova S, Knaff DB, Hirasawa M, Lagoutte B & Setif P (2004) Mechanism of spinach chloroplast ferredoxin-dependent nitrite reductase: spectroscopic evidence for intermediate states. *Biochemistry* **43**: 510-517.
- Kwiatkowski AV & Shapleigh JP (1996) Requirement of nitric oxide for induction of genes whose products are involved in nitric oxide metabolism in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3. *J Biol Chem* **271**: 24382-24388.
- Lee Y-Y, Shearer N & Spiro S (2006) Transcription factor NNR from *Paracoccus denitrificans* is a sensor of both nitric oxide and oxygen: isolation of *nnr** alleles encoding effector-independent proteins and evidence for a haem-based sensing mechanism. *Microbiology* **152**: 1461-1470.
- Leigh JA & Dodsworth JA (2007) Nitrogen regulation in bacteria and archaea. *Annu Rev Microbiol* **61**: 349-377.
- Leimkuhler S & Iobbi-Nivol C (2016) Bacterial molybdoenzymes: old enzymes for new purposes. *FEMS Microbiol Rev* **40**: 1-18.
- Li D, Kabir M, Stuehr DJ, Rousseau DL & Yeh SR (2007) Substrate- and isoform-specific dioxygen complexes of nitric oxide synthase. *J Am Chem Soc* **129**: 6943-6951.
- Li W & Lu CD (2007) Regulation of carbon and nitrogen utilization by CbrAB and NtrBC two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **189**: 5413-5420.
- Lin JT & Stewart V (1998) Nitrate assimilation by bacteria. *Adv Microb Physiol* **39**: 379.

Lindemann C, Lupilova N, Muller A, Warscheid B, Meyer HE, Kuhlmann K, Eisenacher M & Leichert LI (2013) Redox proteomics uncovers peroxynitrite-sensitive proteins that help *Escherichia coli* to overcome nitrosative stress. *J Biol Chem* **288**: 19698-19714.

Liochev SI & Fridovich I (1999) Superoxide and iron: partners in crime. *IUBMB life* **48**: 157-161.

Lockwood CW, Burlat B, Cheesman MR, Kern M, Simon J, Clarke TA, Richardson DJ & Butt JN (2015) Resolution of key roles for the distal pocket histidine in cytochrome C nitrite reductases. *J Am Chem Soc* **137**: 3059-3068.

Lorenz R, Bernhart SH, Honer Zu Siederdisen C, Tafer H, Flamm C, Stadler PF & Hofacker IL (2011) ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms for molecular biology* : *AMB* **6**: 26.

Lundberg JO, Weitzberg E & Gladwin MT (2008) The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nature reviews Drug discovery* **7**: 156-167.

Luque-Almagro VM, Gates AJ, Moreno-Vivian C, Ferguson SJ, Richardson DJ & Roldan MD (2011) Bacterial nitrate assimilation: gene distribution and regulation. *Biochem Soc Trans* **39**: 1838-1843.

Luque-Almagro VM, Lyall VJ, Ferguson SJ, Roldán MD, Richardson DJ & Gates AJ (2013) Nitrogen oxanion-dependent dissociation of a two-component complex that regulates bacterial nitrate assimilation. *J Biol Chem* **288**: 29692-29702.

Luque-Almagro VM, Manso I, Sullivan MJ, Rowley G, Ferguson SJ, Moreno-Vivian C, Richardson DJ, Gates AJ & Roldan MD (2017) Transcriptional and translational adaptation to aerobic nitrate anabolism in the denitrifier *Paracoccus denitrificans*. *Biochem J* **474**: 1769-1787.

Maeda S & Omata T (2009) Nitrite transport activity of the ABC-type cyanate transporter of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *J Bacteriol* **191**: 3265-3272.

Maia LB & Moura JJ (2011) Nitrite reduction by xanthine oxidase family enzymes: a new class of nitrite reductases. *Journal of biological inorganic chemistry* : *JBIC* : a publication of the *Society of Biological Inorganic Chemistry* **16**: 443-460.

Maia LB & Moura JJ (2014) How biology handles nitrite. *Chem Rev* **114**: 5273-5357.

Maia LB & Moura JJ (2015) Nitrite reduction by molybdoenzymes: a new class of nitric oxide-forming nitrite reductases. *J Biol Inorg Chem* **20**: 403-433.

Maia LB, Pereira V, Mira L & Moura JJ (2015) Nitrite reductase activity of rat and human xanthine oxidase, xanthine dehydrogenase, and aldehyde oxidase: evaluation of their contribution to NO formation in vivo. *Biochemistry* **54**: 685-710.

Mania D, Heylen K, van Spanning RJ & Frostegard A (2014) The nitrate-ammonifying and nosZ-carrying bacterium *Bacillus vireti* is a potent source and sink for nitric and nitrous oxide under high nitrate conditions. *Environ Microbiol* **16**: 3196-3210.

- Martin GB, Chapman KA & Chelm BK (1988) Role of the *Bradyrhizobium japonicum ntrC* gene product in differential regulation of the glutamine synthetase II gene (*glnII*). *J Bacteriol* **170**: 5452-5459.
- Martinez-Espinosa RM, Marhuenda-Egea FC & Bonete MJ (2001) Assimilatory nitrate reductase from the haloarchaeon *Haloferax mediterranei*: purification and characterisation. *FEMS Microbiol Lett* **204**: 381-385.
- Martinez-Espinosa RM, Marhuenda-Egea FC & Bonete MJ (2001) Purification and characterisation of a possible assimilatory nitrite reductase from the halophile archaeon *Haloferax mediterranei*. *FEMS Microbiol Lett* **196**: 113-118.
- Martinez-Espinosa RM, Cole JA, Richardson DJ & Watmough NJ (2011) Enzymology and ecology of the nitrogen cycle. *Biochem Soc Trans* **39**: 175-178.
- Martinez-Espinosa RM, Dridge EJ, Bonete MJ, Butt JN, Butler CS, Sargent F & Richardson DJ (2007) Look on the positive side! The orientation, identification and bioenergetics of 'Archaeal' membrane-bound nitrate reductases. *FEMS Microbiol Lett* **276**: 129-139.
- Matsumoto Y, Tosha T, Pislakov AV, Hino T, Sugimoto H, Nagano S, Sugita Y & Shiro Y (2012) Crystal structure of quinol-dependent nitric oxide reductase from *Geobacillus stearothermophilus*. *Nat Struct Mol Biol* **19**: 238-245.
- McLean S, Bowman LA, Sanguinetti G, Read RC & Poole RK (2010) Peroxynitrite toxicity in *Escherichia coli* K12 elicits expression of oxidative stress responses and protein nitration and nitrosylation. *J Biol Chem* **285**: 20724-20731.
- Meakin GE, Jepson BJ, Richardson DJ, Bedmar EJ & Delgado MJ (2006) The role of *Bradyrhizobium japonicum* nitric oxide reductase in nitric oxide detoxification in soya bean root nodules. *Biochem Soc Trans* **34**: 195-196.
- Meakin GE, Bueno E, Jepson B, Bedmar EJ, Richardson DJ & Delgado MJ (2007) The contribution of bacteroidal nitrate and nitrite reduction to the formation of nitrosylhaemoglobin complexes in soybean root nodules. *Microbiology* **153**: 411-419.
- Merrick MJ (1993) In a class of its own — the RNA polymerase sigma factor σ^{54} (σ^N). *Mol Microbiol* **10**: 903-909.
- Merrick MJ & Edwards RA (1995) Nitrogen control in bacteria. *Microbiol Rev* **59**: 604-622.
- Mesa S, Alche Jd JD, Bedmar E & Delgado MJ (2004) Expression of nir, nor and nos denitrification genes from *Bradyrhizobium japonicum* in soybean root nodules. *Physiol Plant* **120**: 205-211.
- Mesa S, Reutimann L, Fischer HM & Hennecke H (2009) Posttranslational control of transcription factor FixK2, a key regulator for the *Bradyrhizobium japonicum*-soybean symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 21860-21865.

Mesa S, Velasco L, Manzanera ME, Delgado MJ & Bedmar EJ (2002) Characterization of the *norCBQD* genes, encoding nitric oxide reductase, in the nitrogen fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Microbiology* **148**: 3553-3560.

Mesa S, Bedmar EJ, Chanfon A, Hennecke H & Fischer HM (2003) *Bradyrhizobium japonicum* NnrR, a denitrification regulator, expands the FixLJ-FixK2 regulatory cascade. *J Bacteriol* **185**: 3978-3982.

Mesa S, Hauser F, Friberg M, Malaguti E, Fischer HM & Hennecke H (2008) Comprehensive assessment of the regulons controlled by the FixLJ-FixK2-FixK1 cascade in *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* **190**: 6568-6579.

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

Mills PC, Rowley G, Spiro S, Hinton JC & Richardson DJ (2008) A combination of cytochrome c nitrite reductase (NrfA) and flavorubredoxin (NorV) protects *Salmonella enterica* serovar Typhimurium against killing by NO in anoxic environments. *Microbiology* **154**: 1218-1228.

Minchin FR, James EK & Becana M (2008) Oxygen Diffusion, Production Of Reactive Oxygen And Nitrogen Species, And Antioxidants In Legume Nodules. *Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses*, (Dilworth MJ, James EK, Sprent JI & Newton WE, eds.), p. 321-362. Springer Netherlands, Dordrecht.

Mohan SB & Cole JA (2007) *Dissimilatory Reduction of Nitrate to Ammonia by Anaerobic Bacteria*. Elsevier, The Netherlands.

Moir JW & Wood NJ (2001) Nitrate and nitrite transport in bacteria. *Cell Mol Life Sci* **58**: 215-224.

Moreno-Vivian C & Ferguson SJ (1998) Definition and distinction between assimilatory, dissimilatory and respiratory pathways. *Mol Microbiol* **29**: 664-666.

Moreno-Vivián C & Flores E (2007) Nitrate assimilation in bacteria. *Biology of the Nitrogen Cycle*, (Bothe H, Ferguson SJ & Newton WE, eds.), p. 263-292. Elsevier, Amsterdam.

Moreno-Vivián C, Cabello P, Martínez-Luque M, Blasco R & Castillo F (1999) Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. *J Bacteriol* **181**: 6573-6584.

Moreno-Vivián C, Luque-Almagro VM, Cabello P, Roldán MD & Castillo F (2011) Transport and assimilation of inorganic nitrogen in bacteria. *Nitrogen Cycling in Bacteria*, (Moir JWB, ed.) p. 101-122. Caister Academic Press, Norfolk.

Mukhopadhyay P, Zheng M, Bedzyk LA, LaRossa RA & Storz G (2004) Prominent roles of the NorR and Fur regulators in the *Escherichia coli* transcriptional response to reactive nitrogen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 745-750.

Muro-Pastor MI, Reyes JC & Florencio FJ (2005) Ammonium assimilation in cyanobacteria. *Photosynth Res* **83**: 135-150.

- Najmudin S, Gonzalez PJ, Trincao J, *et al.* (2008) Periplasmic nitrate reductase revisited: a sulfur atom completes the sixth coordination of the catalytic molybdenum. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* **13**: 737-753.
- Nakano MM (2002) Induction of ResDE-dependent gene expression in *Bacillus subtilis* in response to nitric oxide and nitrosative stress. *J Bacteriol* **184**: 1783-1787.
- Nellen-Anthamatten D, Rossi P, Preisig O, Kullik I, Babst M, Fischer HM & Hennecke H (1998) *Bradyrhizobium japonicum* FixK₂, a crucial distributor in the FixJ-dependent regulatory cascade for control of genes inducible by low oxygen levels. *J Bacteriol* **180**: 5251-5255.
- Newton E (2007) *Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of Nitrogen Fixation*. Elsevier, The Netherlands.
- Nicholas DJD & Nason A (1957) Determination of nitrate and nitrite. *Methods Enzymol* **3**: 981-984.
- Ninfa AJ, Reitzer LJ & Magasanik B (1987) Initiation of transcription at the bacterial *glnAp2* promoter by purified *E. coli* components is facilitated by enhancers. *Cell* **50**: 1039-1046.
- North AK, Klose KE, Stedman KM & Kustu S (1993) Prokaryotic enhancer-binding proteins reflect eukaryote-like modularity: the puzzle of nitrogen regulatory protein C. *J Bacteriol* **175**: 4267-4273.
- Novichkov PS, Kazakov AE, Ravcheev DA, *et al.* (2013) RegPrecise 3.0--a resource for genome-scale exploration of transcriptional regulation in bacteria. *BMC genomics* **14**: 745.
- Ogawa K, Akagawa E, Yamane K, Sun ZW, LaCelle M, Zuber P & Nakano MM (1995) The *nasB* operon and *nasA* gene are required for nitrate/nitrite assimilation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **177**: 1409-1413.
- Ohashi Y, Shi W, Takatani N, Aichi M, Maeda S, Watanabe S, Yoshikawa H & Omata T (2011) Regulation of nitrate assimilation in cyanobacteria. *J Exp Bot* **62**: 1411-1424.
- Olmo-Mira MF, Cabello P, Pino C, Martinez-Luque M, Richardson DJ, Castillo F, Roldan MD & Moreno-Vivian C (2006) Expression and characterization of the assimilatory NADH-nitrite reductase from the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1. *Arch Microbiol* **186**: 339-344.
- Ouellet H, Ouellet Y, Richard C, Labarre M, Wittenberg B, Wittenberg J & Guertin M (2002) Truncated hemoglobin HbN protects *Mycobacterium bovis* from nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 5902-5907.
- Overton TW, Justino MC, Li Y, Baptista JM, Melo AM, Cole JA & Saraiva LM (2008) Widespread distribution in pathogenic bacteria of di-iron proteins that repair oxidative and nitrosative damage to iron-sulfur centers. *J Bacteriol* **190**: 2004-2013.

Patel BA, Moreau M, Widom J, Chen H, Yin L, Hua Y & Crane BR (2009) Endogenous nitric oxide regulates the recovery of the radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* from exposure to UV light. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 18183-18188.

Pathania R, Navani NK, Gardner AM, Gardner PR & Dikshit KL (2002) Nitric oxide scavenging and detoxification by the Mycobacterium tuberculosis haemoglobin, HbN in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **45**: 1303-1314.

Patriarca EJ, Tatè R & Iaccarino M (2002) Key Role of Bacterial NH₄⁺ Metabolism in *Rhizobium*-Plant Symbiosis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66**: 203-222.

Pawlowski K, Klosse U & de Bruijn FJ (1991) Characterization of a novel *Azorhizobium caulinodans* ORS571 two-component regulatory system, NtrY/NtrX, involved in nitrogen fixation and metabolism. *Mol Gen Genet* **231**: 124-138.

Peters JM, Vangeloff AD & Landick R (2011) Bacterial transcription terminators: the RNA 3'-end chronicles. *J Mol Biol* **412**: 793-813.

Peters JW, Boyd ES, Hamilton T & Rubio LM (2011) *Biochemistry of Mo-Nitrogenase*. Caister Academic Press, York, UK.

Pino C, Olmo-Mira F, Cabello P, Martínez-Luque M, Castillo F, Roldán MD & Moreno-Vivián C (2006) The assimilatory nitrate reduction system of the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1. *Biochem Soc Trans* **34**: 127-129.

Pioszak AA, Jiang P & Ninfa AJ (2000) The *Escherichia coli* PII signal transduction protein regulates the activities of the two-component system transmitter protein NRII by direct interaction with the kinase domain of the transmitter module. *Biochemistry* **39**: 13450-13461.

Pisliakov AV, Hino T, Shiro Y & Sugita Y (2012) Molecular dynamics simulations reveal proton transfer pathways in cytochrome C-dependent nitric oxide reductase. *PLoS computational biology* **8**: e1002674.

Pittman MS, Elvers KT, Lee L, Jones MA, Poole RK, Park SF & Kelly DJ (2007) Growth of *Campylobacter jejuni* on nitrate and nitrite: electron transport to NapA and NrfA via NrfH and distinct roles for NrfA and the globin Cgb in protection against nitrosative stress. *Mol Microbiol* **63**: 575-590.

Poock SR, Leach ER, Moir JW, Cole JA & Richardson DJ (2002) Respiratory detoxification of nitric oxide by the cytochrome c nitrite reductase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **277**: 23664-23669.

Poole RK (2005) Nitric oxide and nitrosative stress tolerance in bacteria. *Biochem Soc Trans* **33**: 176-180.

Poole RK, Anjum MF, Membrillo-Hernandez J, Kim SO, Hughes MN & Stewart V (1996) Nitric oxide, nitrite, and Fnr regulation of hmp (flavo-hemoglobin) gene expression in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **178**: 5487-5492.

- Potter L, Angove H, Richardson D & Cole J (2001) Nitrate reduction in the periplasm of gram-negative bacteria. *Adv Microb Physiol* **45**: 51-112.
- Preisig O, Zufferey R, Thony-Meyer L, Appleby CA & Hennecke H (1996) A high-affinity cbb3-type cytochrome oxidase terminates the symbiosis-specific respiratory chain of *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* **178**: 1532-1538.
- Prendergast-Miller MT, Baggs EM & Johnson D (2011) Nitrous oxide production by the ectomycorrhizal fungi *Paxillus involutus* and *Tylospora fibrillosa*. *FEMS Microbiol Lett* **316**: 31-35.
- Pullan ST, Monk CE, Lee L & Poole RK (2008) Microbial responses to nitric oxide and nitrosative stress: Growth, "omic," and physiological methods. *Methods in Enzymology* **437**: 499-519.
- Ramesh A, DebRoy S, Goodson JR, Fox KA, Faz H, Garsin DA & Winkler WC (2012) The mechanism for RNA recognition by ANTAR regulators of gene expression. *PLoS Genet* **8**: e1002666.
- Ravishankara AR, Daniel JS & Portmann RW (2009) Nitrous oxide (N₂O): The dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century. *Science* **326**: 123-125.
- Regensburger B & Hennecke H (1983) RNA polymerase from *Rhizobium japonicum*. *Arch Microbiol* **135**: 103-109.
- Reitzer L (2003) Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* **57**: 155-176.
- Reitzer LJ & Magasanik B (1985) Expression of *glnA* in *Escherichia coli* is regulated at tandem promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 1979-1983.
- Rhee KY, Erdjument-Bromage H, Tempst P & Nathan CF (2005) S-nitroso proteome of *Mycobacterium tuberculosis*: Enzymes of intermediary metabolism and antioxidant defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 467-472.
- Richardson D, Felgate H, Watmough N, Thomson A & Baggs E (2009) Mitigating release of the potent greenhouse gas N₂O from the nitrogen cycle - could enzymic regulation hold the key? *Trends Biotechnol* **27**: 388-397.
- Richardson DJ (2011) *Redox complexes of the nitrogen cycle*. Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- Richardson DJ & Watmough NJ (1999) Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. *Curr Opin Chem Biol* **3**: 207-219.
- Richardson DJ, van Spanning RJM & Ferguson SJ (2007) Chapter 2 - The Prokaryotic Nitrate Reductases. *Biology of the Nitrogen Cycle*, p. 21-35. Elsevier, Amsterdam.
- Richardson DJ, Berks BC, Russell DA, Spiro S & Taylor CJ (2001) Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. *Cell Mol Life Sci* **58**: 165-178.

Rinaldo S & Cutruzzolá F (2007) Nitrate reductases in denitrification. *Biology of the Nitrogen Cycle*, (Bothe H, Ferguson SJ & Newton WE, eds.), p. 37-55. Elsevier Science, Amsterdam.

Rinaldo S, Arcovito A, Giardina G, Castiglione N, Brunori M & Cutruzzola F (2008) New insights into the activity of *Pseudomonas aeruginosa* cd1 nitrite reductase. *Biochem Soc Trans* **36**: 1155-1159.

Rinaldo S, Castiglione N, Giardina G, Caruso M, Arcovito A, Longa SD, D'Angelo P & Cutruzzola F (2012) Unusual heme binding properties of the dissimilative nitrate respiration regulator, a bacterial nitric oxide sensor. *Antioxid Redox Signal* **17**: 1178-1189.

Robles EF, Sanchez C, Bonnard N, Delgado MJ & Bedmar EJ (2006) The *Bradyrhizobium japonicum* napEDABC genes are controlled by the FixLJ-FixK(2)-NnrR regulatory cascade. *Biochem Soc Trans* **34**: 108-110.

Rodgers KR (1999) Heme-based sensors in biological systems. *Current Opinion in Chemical Biology* **3**: 158-167.

Rodgers KR & Lukat-Rodgers GS (2005) Insights into heme-based O₂ sensing from structure-function relationships in the FixL proteins. *J Inorg Biochem* **99**: 963-977.

Rodionov DA, Dubchak I, Arkin A, Alm E & Gelfand MS (2004) Reconstruction of regulatory and metabolic pathways in metal-reducing delta-proteobacteria. *Genome biology* **5**: R90.

Rodionov DA, Dubchak IL, Arkin AP, Alm EJ & Gelfand MS (2005) Dissimilatory metabolism of nitrogen oxides in bacteria: comparative reconstruction of transcriptional networks. *PLoS computational biology* **1**: e55.

Romeo A, Sonnleitner E, Sorger-Domenigg T, Nakano MM, Eisenhaber B & Bläsi U (2012) Transcriptional regulation of nitrate assimilation in *Pseudomonas aeruginosa* occurs via transcriptional antitermination within the *nirBD-PA1779-cobA* operon. *Microbiology* **158**: 1543-1552.

Rompf A, Hungerer C, Hoffmann T, Lindenmeyer M, Romling U, Gross U, Doss MO, Arai H, Igarashi Y & Jahn D (1998) Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* hemF and hemN by the dual action of the redox response regulators Anr and Dnr. *Mol Microbiol* **29**: 985-997.

Rowley G, Hensen D, Felgate H, *et al.* (2012) Resolving the contributions of the membrane-bound and periplasmic nitrate reductase systems to nitric oxide and nitrous oxide production in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Biochem J* **441**: 755-762.

Rubio LM & Ludden PW (2008) Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Annu Rev Microbiol* **62**: 93-111.

Sabat J, Egawa T, Lu C, Stuehr DJ, Gerfen GJ, Rousseau DL & Yeh SR (2013) Catalytic intermediates of inducible nitric-oxide synthase stabilized by the W188H mutation. *J Biol Chem* **288**: 6095-6106.

Salgo MG, Stone K, Squadrito GL, Battista JR & Pryor WA (1995) Peroxynitrite causes DNA nicks in plasmid pBR322. *Biochem Biophys Res Commun* **210**: 1025-1030.

Sambrook J & Russell D (2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Sanchez C, Gates AJ, Meakin GE, Uchiumi T, Girard L, Richardson DJ, Bedmar EJ & Delgado MJ (2010) Production of nitric oxide and nitrosylhemoglobin complexes in soybean nodules in response to flooding. *Mol Plant Microbe Interact* **23**: 702-711.

Sánchez C, Cabrera JJ, Gates AJ, Bedmar EJ, Richardson DJ & Delgado MJ (2011) Nitric oxide detoxification in the rhizobia-legume symbiosis. *Biochem Soc Trans* **39**: 184-188.

Sánchez C, Itakura M, Okubo T, Matsumoto T, Yoshikawa H, Gotoh A, Hidaka M, Uchida T & Minamisawa K (2014) The nitrate-sensing NasST system regulates nitrous oxide reductase and periplasmic nitrate reductase in *Bradyrhizobium japonicum*. *Environ Microbiol* **16**: 3263-3274.

Sander R (1999) Compilation of Henry's Law Constants for Inorganic and Organic Species of Potential Importance in Environmental Chemistry. Max-Planck Institute of Chemistry, Air Chemistry Department.

Sanford RA, Wagner DD, Wu Q, *et al.* (2012) Unexpected nondenitrifier nitrous oxide reductase gene diversity and abundance in soils. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 19709-19714.

Schafer A, Tauch A, Jager W, Kalinowski J, Thierbach G & Puhler A (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.

Schinko T, Berger H, Lee W, Gallmetzer A, Pirker K, Pachlinger R, Buchner I, Reichenauer T, Guldener U & Strauss J (2010) Transcriptome analysis of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans* reveals connections to nitric oxide metabolism. *Mol Microbiol* **78**: 720-738.

Schumacher J, Behrends V, Pan Z, *et al.* (2013) Nitrogen and carbon status are integrated at the transcriptional level by the nitrogen regulator NtrC in vivo. *MBio* **4**: e00881-00813.

Scott JD & Ludwig RA (2004) *Azorhizobium caulinodans* electron-transferring flavoprotein N electrochemically couples pyruvate dehydrogenase complex activity to N₂ fixation. *Microbiology* **150**: 117-126.

Serpe M & Zhang X (2006) The Principles, Development and Application of Microelectrodes for the In Vivo Determination of Nitric Oxide. *Electrochemical Methods for Neuroscience*, p. 465-487. CRC Press.

Seth D, Hausladen A, Wang YJ & Stamler JS (2012) Endogenous protein S-Nitrosylation in *E. coli*: regulation by OxyR. *Science* **336**: 470-473.

Shapleigh JP (2006) *The denitrifying prokaryotes*. Springer Science +Business Media, New York.

Shatalin K, Gusarov I, Avetissova E, Shatalina Y, McQuade LE, Lippard SJ & Nudler E (2008) *Bacillus anthracis*-derived nitric oxide is essential for pathogen virulence and survival in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 1009-1013.

Shimizu K (2016) Metabolic Regulation and Coordination of the Metabolism in Bacteria in Response to a Variety of Growth Conditions. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **155**: 1-54.

Shimoda Y, Shimoda-Sasakura F, Kucho K, Kanamori N, Nagata M, Suzuki A, Abe M, Higashi S & Uchiumi T (2009) Overexpression of class 1 plant hemoglobin genes enhances symbiotic nitrogen fixation activity between *Mesorhizobium loti* and *Lotus japonicus*. *Plant J* **57**: 254-263.

Shiro Y, Sugimoto H, Tosha T, Nagano S & Hino T (2012) Structural basis for nitrous oxide generation by bacterial nitric oxide reductases. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* **367**: 1195-1203.

Shu CJ, Ulrich LE & Zhulin IB (2003) The NIT domain: a predicted nitrate-responsive module in bacterial sensory receptors. *Trends Biochem Sci* **28**: 121-124.

Simon J (2002) Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification. *FEMS Microbiol Rev* **26**: 285-309.

Simon J & Klotz MG (2013) Diversity and evolution of bioenergetic systems involved in microbial nitrogen compound transformations. *Biochim Biophys Acta* **1827**: 114-135.

Simon J, van Spanning RJ & Richardson DJ (2008) The organisation of proton motive and non-proton motive redox loops in prokaryotic respiratory systems. *Biochim Biophys Acta* **1777**: 1480-1490.

Simon R, Priefer U & Pühler A (1983) Vector plasmids for in vivo and in vitro manipulation of Gram-negative bacteria. *Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction*, (Pühler A, ed.) p. 98-106 Springer, Heidelberg.

Smith HK, Shepherd M, Monk C, Green J & Poole RK (2011) The NO-responsive hemoglobins of *Campylobacter jejuni*: concerted responses of two globins to NO and evidence in vitro for globin regulation by the transcription factor NssR. *Nitric Oxide* **25**: 234-241.

Socolow RH (1999) Nitrogen management and the future of food: lessons from the management of energy and carbon. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6001-6008.

Souza JM, Peluffo G & Radi R (2008) Protein tyrosine nitration--functional alteration or just a biomarker? *Free radical biology & medicine* **45**: 357-366.

Spiro S (2011) Nitric oxide metabolism: physiology and regulatory mechanisms. *Nitrogen Cycling in Bacteria: Molecular Analysis*, (Moir JWB, ed.) p. 177-196. Caister Academic Press, Norfolk.

Spiro S (2012) Nitrous oxide production and consumption: regulation of gene expression by gas-sensitive transcription factors. *Phil Trans R Soc B* **367**: 1213-1225.

Stern AM & Zhu J (2014) An introduction to nitric oxide sensing and response in bacteria. *Advances in applied microbiology* **87**: 187-220.

Stern AM, Liu B, Bakken LR, Shapleigh JP & Zhu J (2013) A novel protein protects bacterial iron-dependent metabolism from nitric oxide. *J Bacteriol* **195**: 4702-4708.

- Stevanin TM, Ioannidis N, Mills CE, Kim SO, Hughes MN & Poole RK (2000) Flavohemoglobin Hmp affords inducible protection for *Escherichia coli* respiration, catalyzed by cytochromes bo' or bd, from nitric oxide. *J Biol Chem* **275**: 35868-35875.
- Stewart V (1994) Regulation of nitrate and nitrite reductase synthesis in enterobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **66**: 37-45.
- Stewart V & van Tilbeurgh H (2012) Found: the elusive ANTAR transcription antiterminator. *PLoS Genet* **8**: e1002773.
- Stock AM, Robinson VL & Goudreau PN (2000) Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**: 183-215.
- Stuven R & Bock E (2001) Nitrification and denitrification as a source for NO and NO₂ production in high-strength wastewater. *Water Res* **35**: 1905-1914.
- Suharti de Vries S & Pouvreau LAM (2007) Chapter 4 - Nitric Oxide Reductase: Structural Variations and Catalytic Mechanism A2 - Bothe, Hermann. *Biology of the Nitrogen Cycle*, (Ferguson SJ & Newton WE, eds.), p. pp. 57-66. Elsevier, Amsterdam.
- Szeto WW, Nixon BT, Ronson CW & Ausubel FM (1987) Identification and characterization of the *Rhizobium meliloti* ntrC gene: *R. meliloti* has separate regulatory pathways for activation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic cells. *Journal of Bacteriology* **169**: 1423-1432.
- Takaya N (2002) Dissimilatory nitrate reduction metabolisms and their control in fungi. *Journal of bioscience and bioengineering* **94**: 506-510.
- Taylor BL & Zhulin IB (1999) PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 479-506.
- ter Beek J, Krause N, Reimann J, Lachmann P & Adelroth P (2013) The nitric-oxide reductase from *Paracoccus denitrificans* uses a single specific proton pathway. *J Biol Chem* **288**: 30626-30635.
- Terpolilli JJ, Hood GA & Poole PS (2012) What determines the efficiency of N(2)-fixing Rhizobium-legume symbioses? *Adv Microb Physiol* **60**: 325-389.
- Thompson JD, Higgins DG & Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research* **22**: 4673-4680.
- Tinajero-Trejo M, Vreugdenhil A, Sedelnikova SE, Davidge KS & Poole RK (2013) Nitric oxide reactivities of the two globins of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*: roles in protection from nitrosative stress and analysis of potential reductants. *Nitric Oxide* **34**: 65-75.
- Tischner R & Kaiser W (2007) *Nitrate Assimilation in Plants*. The Netherlands.
- Toledo JC, Jr. & Augusto O (2012) Connecting the chemical and biological properties of nitric oxide. *Chem Res Toxicol* **25**: 975-989.

Torres MJ, Rubia MI, Bedmar EJ & Delgado MJ (2011) Denitrification in *Sinorhizobium meliloti*. *Biochem Soc Trans* **39**: 1886-1889.

Torres MJ, Bueno E, Mesa S, Bedmar EJ & Delgado MJ (2011) Emerging complexity in the denitrification regulatory network of *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochem Soc Trans* **39**: 284-288.

Torres MJ, Argandoña M, Vargas C, Bedmar EJ, Fischer HM, Mesa S & Delgado MJ (2014) The global response regulator RegR controls expression of denitrification genes in *Bradyrhizobium japonicum*. *PLoS ONE* **9**: e99011.

Torres MJ, Simon J, Rowley G, Bedmar EJ, Richardson DJ, Gates AJ & Delgado MJ (2016) Nitrous Oxide Metabolism in Nitrate-Reducing Bacteria: Physiology and Regulatory Mechanisms. *Adv Microb Physiol* **68**: 353-432.

Tosques IE, Shi J & Shapleigh JP (1996) Cloning and characterization of nnrR, whose product is required for the expression of proteins involved in nitric oxide metabolism in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3. *J Bacteriol* **178**: 4958-4964.

Treusch AH, Leininger S, Kletzin A, Schuster SC, Klenk HP & Schleper C (2005) Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environ Microbiol* **7**: 1985-1995.

Trunk K, Benkert B, Quack N, *et al.* (2010) Anaerobic adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: definition of the Anr and Dnr regulons. *Environ Microbiol* **12**: 1719-1733.

Tucker NP, Ghosh T, Bush M, Zhang X & Dixon R (2010) Essential roles of three enhancer sites in sigma54-dependent transcription by the nitric oxide sensing regulatory protein NorR. *Nucleic acids research* **38**: 1182-1194.

Tucker NP, Hicks MG, Clarke TA, Crack JC, Chandra G, Le Brun NE, Dixon R & Hutchings MI (2008) The transcriptional repressor protein NsrR senses nitric oxide directly via a [2Fe-2S] cluster. *PLoS One* **3**: e3623.

Udvardi M & Poole PS (2013) Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annu Rev Plant Biol* **64**: 781-805.

van den Berg WA, Hagen WR & van Dongen WM (2000) The hybrid-cluster protein ('prismane protein') from *Escherichia coli*. Characterization of the hybrid-cluster protein, redox properties of the [2Fe-2S] and [4Fe-2S-2O] clusters and identification of an associated NADH oxidoreductase containing FAD and [2Fe-2S]. *Eur J Biochem* **267**: 666-676.

van Grinsven HJ, Rabl A & de Kok TM (2010) Estimation of incidence and social cost of colon cancer due to nitrate in drinking water in the EU: a tentative cost-benefit assessment. *Environ Health* **9**: 58.

van Heeswijk WC, Westerhoff HV & Boogerd FC (2013) Nitrogen assimilation in *Escherichia coli*: putting molecular data into a systems perspective. *Microbiol Mol Biol Rev* **77**: 628-695.

- Van Spanning RJ (2011) *Structure, function, regulation and evolution of the nitrite and nitrous oxide reductase: Denitrification enzymes with a b-propeller fold*. Caister Academic Press, Norfolk UK.
- Van Spanning RJ, Richardson DJ & Ferguson SJ (2007) *Introduction to the biochemistry and molecular biology of denitrification*. Elsevier Science, Amsterdam.
- Van Spanning RJ, Houben E, Reijnders WN, Spiro S, Westerhoff HV & Saunders N (1999) Nitric oxide is a signal for NNR-mediated transcription activation in *Paracoccus denitrificans*. *J Bacteriol* **181**: 4129-4132.
- Vargas C, McEwan AG & Downie JA (1993) Detection of c-type cytochromes using enhanced chemiluminescence. *Anal Biochem* **209**: 323-326.
- Velasco L, Mesa S, Delgado MJ & Bedmar EJ (2001) Characterization of the *nirK* gene encoding the respiratory, Cu-containing nitrite reductase of *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochim Biophys Acta* **1521**: 130-134.
- Velasco L, Mesa S, Xu CA, Delgado MJ & Bedmar EJ (2004) Molecular characterization of nosRZDFYLX genes coding for denitrifying nitrous oxide reductase of *Bradyrhizobium japonicum*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **85**: 229-235.
- Vieira J & Messing J (1982) The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**: 259-268.
- Vincent JM (1974) Root-nodule symbioses with *Rhizobium*. *The Biology of Nitrogen Fixation*, (Quispel A, ed.) p. 265-341. American Elsevier Publishing Co., New York.
- Vine CE & Cole JA (2011) Unresolved sources, sinks, and pathways for the recovery of enteric bacteria from nitrosative stress. *FEMS Microbiol Lett* **325**: 99-107.
- Vine CE & Cole JA (2011) Nitrosative stress in *Escherichia coli*: reduction of nitric oxide. *Biochem Soc Trans* **39**: 213-215.
- Vine CE, Purewal SK & Cole JA (2011) NsrR-dependent method for detecting nitric oxide accumulation in the *Escherichia coli* cytoplasm and enzymes involved in NO production. *FEMS Microbiol Lett* **325**: 108-114.
- Waller ZA, Pinchbeck BJ, Buguth BS, Meadows TG, Richardson DJ & Gates AJ (2016) Control of bacterial nitrate assimilation by stabilization of G-quadruplex DNA. *Chem Commun (Camb)* **52**: 13511-13514.
- Wang B, Pierson LS, Rensing C, Gunatilaka MK & Kennedy CK (2012) NasT-Mediated Antitermination Plays an Essential Role in the Regulation of the Assimilatory Nitrate Reductase Operon in *Azotobacter vinelandii*. *Appl Environ Microbiol* **78**: 6558-6567.
- Wang W, Kinkel T, Martens-Habbena W, Stahl DA, Fang FC & Hansen EJ (2011) The *Moraxella catarrhalis* nitric oxide reductase is essential for nitric oxide detoxification. *J Bacteriol* **193**: 2804-2813.

Weiss B (2006) Evidence for mutagenesis by nitric oxide during nitrate metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**: 829-833.

Weiss V, Claverie-Martin F & Magasanik B (1992) Phosphorylation of nitrogen regulator I of *Escherichia coli* induces strong cooperative binding to DNA essential for activation of transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 5088-5092.

Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM, *et al.* (1991) DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* **254**: 1001-1003.

Wolfe MT, Heo J, Garavelli JS & Ludden PW (2002) Hydroxylamine reductase activity of the hybrid cluster protein from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**: 5898-5902.

Woodmansee AN & Imlay JA (2002) Reduced flavins promote oxidative DNA damage in non-respiring *Escherichia coli* by delivering electrons to intracellular free iron. *J Biol Chem* **277**: 34055-34066.

Wu G, Wainwright LM & Poole RK (2003) Microbial globins. *Adv Microb Physiol* **47**: 255-310.

Wu SQ, Chai W, Lin JT & Stewart V (1999) General Nitrogen Regulation of Nitrate Assimilation Regulatory Gene *nasR* Expression in *Klebsiella oxytoca* M5a1. *Journal of Bacteriology* **181**: 7274-7284.

Yang CS, Yuk JM & Jo EK (2009) The role of nitric oxide in mycobacterial infections. *Immune network* **9**: 46-52.

Yoon S, Sanford RA & Löffler FE (2013) *Shewanella* spp. Use acetate as an electron donor for denitrification but not ferric iron or fumarate reduction. *Appl Environ Microbiol* **79**: 2818-2822.

Yoon S, Cruz-Garcia C, Sanford R, Ritalahti KM & Löffler FE (2015) Denitrification versus respiratory ammonification: environmental controls of two competing dissimilatory NO₃(-)/NO₂(-) reduction pathways in *Shewanella loihica* strain PV-4. *The ISME journal* **9**: 1093-1104.

Yukl ET, Elbaz MA, Nakano MM & Moenne-Loccoz P (2008) Transcription Factor NsrR from *Bacillus subtilis* Senses Nitric Oxide with a 4Fe-4S Cluster (dagger). *Biochemistry* **47**: 13084-13092.

Zimmer DP, Soupene E, Lee HL, Wendisch VF, Khodursky AB, Peter BJ, Bender RA & Kustu S (2000) Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: scavenging as a defense against nitrogen limitation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 14674-14679.

Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research* **31**: 3406-3415.

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

Zumft WG (2005) Biogenesis of the bacterial respiratory CuA, Cu-S enzyme nitrous oxide reductase. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **10**: 154-166.

Zumft WG & Körner H (2007) Chapter 5 - Nitrous Oxide Reductases A2 - Bothe, Hermann. *Biology of the Nitrogen Cycle*, (Ferguson SJ & Newton WE, eds.), p. 67-81. Elsevier, Amsterdam.

9

ANEXOS

9.1. Abreviaturas y símbolos

A	Adenina	fHb	Flavohemoglobina
aa	Aminoácido	sdHb	Hemoglobina de dominio único
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>	tHb	Hemoglobina truncada
ADN/DNA	Ácido desoxirribonucleico	Lb	Leghemoglobina
ADNc/cDNA	ADN complementario	LbNO	Nitrosil-leghemoglobina
ADP	Adenosin difosfato	HCP	<i>Hybrid cluster protein</i>
AEBSF	<i>4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride</i>	IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
ANTAR	<i>AmiR/NasR transcription antitermination regulator</i>	K_M	Constante Michaelis-Menten
Ap	Ampicilina	Km	Kanamicina
APS	Persulfato amónico	MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
ARN/RNA	Ácido ribonucleico	Mo-bis-MGD	Mo-bis-molibdeptorin guanina dinucleotido
ARNm/mRNA	ARN mensajero	MV	Metil viológeno
ATP	Adenosin trifosfato	N	Nucleótido
b	Base nitrogenada	NAD ⁺ /NADH	Nicotin adenin dinucleótido
pb/bp	Par de bases	NADP ⁺ /NADPH	Nicotin adenin dinucleótido fosfato
C	Citosina	NCBI	<i>National center for biotechnology information</i>
Cm	Cloranfenicol	Nir/NiR	Nitrito reductasa
CRP	<i>Cyclic AMP receptor protein</i>	NNEDA	N-(1-Naftill)etilenodiamina
C-terminal	Carboxi terminal	NnrR	<i>Nitrite/nitric oxide reductase regulator</i>
DEPC	Dietil policarbonato	Nor	Óxido nítrico reductasa
DMSO	Dimetilsulfóxido	cNor	tipo c
DNIC	<i>Dinitrosyl Iron Complex</i>	qCu _A Nor	tipo qCu _A
DNR	<i>Dissimilative nitrate respiration regulator</i>	qNor	tipo q
DNRA	<i>Dissimilatory nitrate reduction to ammonium</i>	NOS	Óxido nítrico sintasa
DO/OD/D	Densidad óptica	Nos	Óxido nitroso reductasa
DTT	Ditiotreitol	NR	Nitrato reductasa
EBP	<i>Enhancer-binding protein</i>	Nap	Nitrato reductasa periplásmica
ECD	Detector de captura electrónica	Nar	Nitrato reductasa de membrana
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	Nas	Nitrato reductasa asimilativa
FAD	Flavin adenin dinucleótido	NrtABC	Transportador de NO ₃ ⁻ tipo ABC
Fe-S	Grupo hierro-azufre	NssR	<i>Nitrosative stress-sensing regulator</i>
Flp	Flavoproteína	N-terminal	Amino terminal
FMN	Flavin mononucleótido	NtrBC	Nitrogen two-component regulatory system
FNR	<i>Fumarate-nitrate reductase regulator</i>	ONPG	Orto-nitrofenil- β -galactósido
G	Guanina	ORF	<i>Open reading frame</i>
GC	Cromatografía de gases	p	Promotor
GDH	Glutamato deshidrogenasa	PAS	<i>Per-arnt-sim</i>
Gm	Gentamicina	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
GOGAT	Glutamato sintasa	r	Resistencia
GS	Glutamina sintetasa	RACE	<i>Rapid amplification of cDNA ends</i>
GSNO	S-nitrosoglutatión		
Hb	Hemoglobina		
Bjgb	Hemoglobina de dominio único de <i>B. diazoefficiens</i>		

RNS	<i>Reactive nitrogen species</i>	μ	Micro
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>		
rpm	Revoluciones por minuto	n	Nano
RT-PCR	PCR con transcripción inversa	p	Pico
SAP	<i>Shrimp alkaline phosphatase</i>		
SDS	Dodecilsulfato sódico		<i>Moléculas inorgánicas:</i>
Sm	Estreptomicina	CH ₄	Metano
S-NO	Sulfo-nitrosotiol	CO	Monóxido de carbono
SNP	Nitroprusiato sódico	CO ₂	Dióxido de carbono
SOD	Superóxido dismutasa	CO ₃ ⁻	Carbonato
Spc	Espectinomicina	CuSO ₄	Sulfato de cúprico
T	Timina	FeCl ₃	Cloruro férrico
Tat	<i>Twin arginine translocation</i>	FeSO ₄	Sulfato ferroso
Tc	Tetraciclina	H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
TCS	<i>Two-component system</i>	H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
TEMED	Tetrametiletilendiamina	H ₃ BO ₃	Ácido bórico
TSS	Transcription start site	HCl	Ácido clorhídrico
UFC	Unidades formadoras de colonias	HNO ₂	Ácido nitroso
UFC/CFU	Unidades formadoras de colonias	HNO ₃	Ácido nítrico
UM/MU	Unidades Millers	KCl	Cloruro potásico
UMP	Uridin monofosfato	KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotásico
UTP	Uridin trifosfato	MgCl ₂	Cloruro magnésico
v/v	Volumen/volumen	MgSO ₄	Sulfato magnésico
w/v	Peso/volumen	MnCl ₂	Cloruro de magnesio
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido	N ₂	Nitrógeno molecular
::	Fusión	N ₂ O	Óxido nitroso
μ	Ratio de crecimiento	Na ₂ CO ₃	Carbonato sódico
Δ	Delta, delección	Na ₂ MoO ₄	Molibdato de sodio
σ	Factor sigma	Na ₂ PO ₄	Fosfato disódico
	<i>Unidades:</i>	NaCl	Cloruro sódico
°C	Grado centígrado	NaH ₂ PO ₄	Fosfato monosódico
A	Amperio	NaHCO ₃	Bicarbonato sódico
Da	Dalton	NaOH	Hidróxido sódico
h	Hora	NH ₂ OH	Hidroxilamina
j	Julio	NH ₃	Amoniacó
l	Litro	NH ₄ ⁺	Amonio
m	Metro	NO ⁻	Nitroxilo
M	Molar	NO	Óxido nítrico
min	Minuto	NO ⁺	Nitrosonio
Pa	Pascal	NO ₂	Dióxido de nitrógeno
s	Segundo	NO ₂ ⁻	Nitrito
	<i>Prefijos:</i>	NO ₃ ⁻	Nitrato
T	Tera	O ₂	Oxígeno molecular
M	Mega	OH	Hidroxilo
k	Kilo	ONOO ⁻	Peroxinitrito
m	Mili	ZnSO ₄	Sulfato de cinc
			<i>Carga atómica:</i>
		X ⁻	Anión
		X ⁺	Catión
		X [·]	Radical libre

9.2. Abreviaturas de especies

<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Al. faecalis</i>
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Az. caulinodans</i>
<i>Azotobacter vinelandii</i>	<i>A. vinelandii</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>As. niger</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Ba. Subtilis</i>
<i>Bacillus vireti</i>	<i>Ba. vireti</i>
<i>Bacillus azotoformans</i>	<i>Ba. azotoformans</i>
<i>Bacillus bataviensis</i>	<i>Ba. Bataviensis</i>
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Ba. anthracis</i>
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	<i>B. diazoefficiens</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i>
<i>Ensifer meliloti</i>	<i>En. meliloti</i>
<i>Haloferax mediterranei</i>	<i>H. mediterranei</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>K. oxytoca</i>
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>N. gonorrhoeae</i>
<i>Paracoccus denitrificans</i>	<i>Pa. denitrificans</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>Ps. stutzeri</i>
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	<i>R. capsulatus</i>
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	<i>R. sphaeroides</i>
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	<i>Sa. Typhimurium</i>
<i>Shewanella loihica</i>	<i>Sh. Loihica</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>St. aureus</i>
<i>Wolinella succinogenes</i>	<i>W. succinogenes</i>

9.3. Índice de figuras

Figura 2.1. Principales rutas metabólicas del ciclo del nitrógeno _____	19
Figura 2.2. Organización genética y funcional de los sistemas para la asimilación de nitrato y nitrito en organismos modelo _____	28
Figura 2.3. Agrupación de los genes implicados en asimilación de nitrato y nitrito en especies de diferentes familias _____	33
Figura 2.4. Esquema funcional del sistema de dos componentes NasST en respuesta a ausencia y presencia de nitrato _____	39
Figura 2.5. Dominios estructurales de las tres clases de Hb bacterianas. _____	55
Figura 2.6. Representación esquemática de la ruta de la desnitrificación en <i>B. diazoefficiens</i> _____	72
Figure 5.1.1. Organisation of regulatory and structural genes for the assimilatory $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ reductase pathway in <i>B. diazoefficiens</i> _____	141
Figure 5.1.2. RT PCR. Organisation of regulatory and structural genes for the assimilatory $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ reductase pathway in <i>B. diazoefficiens</i> _____	153
Figure 5.1.3. Sequence comparison of <i>B. diazoefficiens</i> NarK (blr2806) with selected bacterial major facilitator superfamily (MFS) proteins _____	155
Figure 5.1.4. Intracellular NO_2^- levels for <i>B. diazoefficiens</i> WT and <i>narK</i> strains _____	157
Figure 5.1.5. NO_3^- -dependent growth of <i>B. diazoefficiens</i> _____	158
Figure 5.1.6. NO_2^- -dependent growth of <i>B. diazoefficiens</i> _____	159
Figure 5.1.7. Glutamic acid dependent growth of <i>B. diazoefficiens</i> _____	160
Figure 5.1.8. Growth curves for the <i>B. diazoefficiens</i> <i>nasS</i> and <i>nasT</i> mutants _____	161
Figure 5.1.9. Analysis of <i>narK</i> and <i>nirA</i> promoter regions _____	167
Figure 5.1.10. Growth inhibition curves and cell viability assays for <i>B. diazoefficiens</i> WT, <i>bjgb</i> , <i>flp</i> , <i>norC</i> and <i>bjgb;norC</i> strains in response to nitrosative stress induced by addition of SNP _____	169
Figure 5.1.11. Nitric oxide consumption curves for <i>B. diazoefficiens</i> WT, <i>bjgb</i> , <i>flp</i> , <i>norC</i> and <i>bjgb;norC</i> strains _____	170
Figure 5.1.12. Expression of <i>B. diazoefficiens</i> <i>nor</i> genes during NO_3^- -dependent growth _____	172
Figure 5.1.13. Proposed biochemical pathway for NO_3^- -assimilation and NO-detoxification, alongside well-characterised systems for dissimilatory NO_3^- respiration in <i>B. diazoefficiens</i> _____	174
Figure 5.2.1. Nitrate-dependent aerobic growth of wild-type <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 and 110 <i>spc4</i> strains and the <i>ntrC</i> , and <i>rpoN_{1/2}</i> mutants in Evans minimal medium with 10 mM nitrate as N-source _____	188
Figure 5.2.2. Ammonium effect on the nitrate-dependent aerobic growth of the wild-type <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 and the <i>ntrC</i> mutant in Evans minimal medium with 10 mM sodium nitrate as the sole N-source _____	189
Figure 5.2.3. Nitrite-dependent aerobic growth of the wild-type strains <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 and 110 <i>spc4</i> and the mutant strains <i>ntrC</i> and <i>rpoN_{1/2}</i> in minimal medium with 1 mM sodium nitrite as the sole N-source _____	190

Figure 5.2.4. **Methyl viologen dependent nitrate reductase (MV-NR) and nitrite reductase (MV-NiR) activities of *B. diazoefficiens* USDA 110 and 110*spc4* wild-type strains and *ntrC* and *rpoN*_{1/2} mutant strains incubated aerobically for 48 h in Evans minimum medium with 10 mM nitrate as the nitrogen source** _____ 191

Figure 5.2.5. **β -galactosidase activity derived from the *narK-lacZ* and *nirA-lacZ* fusions present in the WT strains *B. diazoefficiens* USDA 110 or 110*spc4* and the *ntrC* or *rpoN*_{1/2} mutants** _____ 193

9.4. Índice de tablas

Tabla 4.1. Cepas bacterianas	89
Tabla 4.2. Plásmidos	92
Tabla 4.3. Oligonucleótidos	95
Tabla 4.4. Medios de cultivo	97
Tabla 4.5. Antibióticos	98
Tabla 4.6. Soluciones y reactivos	102
Tabla 4.7. Mezcla de reacción para PCR	120
Tabla 4.8. Programas para reacciones de PCR	120
Tabla 4.9. Endonucleasas de restricción	126
Tabla 4.10. Programa PCR RACE	133
Tabla 4.11. Programas bioinformáticos	134
Table 5.1.1. Apparent maximum specific growth rate [μ_{\max} (app)] values (h^{-1}) for <i>B. diazoefficiens</i> strains calculated from growth curve data	162
Table 5.1.2. Methyl viologen-dependent NO_3^- -reductase (MV-NR) and NO_2^- -reductase (MV-NiR) activities of <i>B. diazoefficiens</i> strains incubated aerobically in minimal medium with NO_3^- as sole N-source	164
Table 5.1.3. β -Galactosidase activity for <i>narK-lacZ</i> and <i>nirA-lacZ</i> fusions in <i>B. diazoefficiens</i> WT, <i>nasS</i> or <i>nasT</i> strains	165
Table 5.1.4. NO consumption activity and N_2O levels for <i>B. diazoefficiens</i> WT, <i>bjgb</i> , <i>flp</i> , <i>norC</i> and <i>bjgb;norC</i>	171