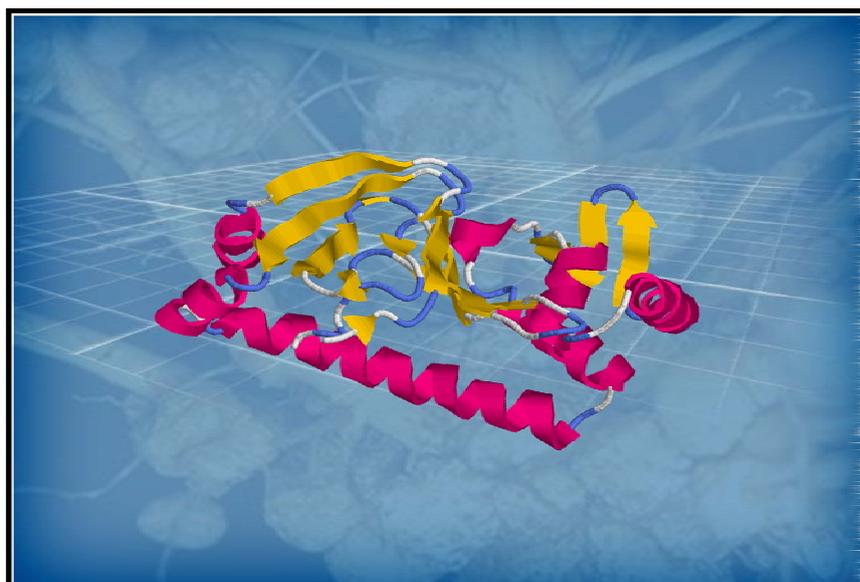




UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS



**REGULACIÓN POR ÓXIDOS DE NITRÓGENO DE LOS GENES
DE LA DESNITRIFICACIÓN EN *Bradyrhizobium japonicum*.
CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA NnrR.**



Eloy Francisco Robles Cortés
TESIS DOCTORAL
2006

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Eloy Francisco Robles Cortés
D.L.: Gr. 2212 - 2006
ISBN: 84-338-4146-7

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS



REGULACIÓN POR ÓXIDOS DE NITRÓGENO DE LOS GENES
DE LA DESNITRIFICACIÓN EN *Bradyrhizobium japonicum*.
CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA NnrR.

Eloy Francisco Robles Cortés

TESIS DOCTORAL

2006

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

REGULACIÓN POR ÓXIDOS DE NITRÓGENO DE LOS GENES
DE LA DESNITRIFICACIÓN EN *Bradyrhizobium japonicum*.
CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA NnrR.

Memoria que presenta el Licenciado en Biología Eloy Francisco Robles Cortés para aspirar
al grado de Doctor

Fdo. Eloy Francisco Robles Cortés

Vº Bº El Director

Vº Bº La Codirectora

Fdo. Eulogio J. Bedmar Gómez

Fdo. María Jesús Delgado Igeño

Profesor de Investigación del CSIC

Científico Titular del CSIC

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín (C.S.I.C.), Granada, durante los años 2003 - 2006.

Agradecimientos

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

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

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

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

A los doctores Haucke Hennecke, Robert Gunsalus y Francesca Cutruzzolá, por haberme acogido en sus laboratorios para realizar estancias breves.

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

agradable. Mención especial al doctor Tino Krell, por su ayuda con los experimentos de calorimetría.

Por último, doy las gracias de modo general a la gente de la Estación Experimental del Zaidín, que me han ofrecido su ayuda en diversos campos. Especial recuerdo a la gente del grupo de Investigación del que he formado parte. Han sido muchos los que han formado parte de él a lo largo de estos años, y de todos he obtenido ayuda. Algunos quizás no hayan sido conscientes de lo importante que ha sido para mí esta ayuda. Que Dios os lo pague a todos.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
-------------	---

1. INTRODUCCIÓN

1.1. DESNITRIFICACIÓN.....	3
1.1.1. Nitrato reductasas.....	5
1.1.2. Nitrito reductasas.....	7
1.1.3. Óxido nítrico reductasas.....	8
1.1.4. Óxido nitroso reductasas.....	9
1.2. REGULACIÓN DE LA DESNITRIFICACIÓN.....	10
1.2.1. Regulación por oxígeno.....	10
1.2.1.1. Reguladores Fnr/Crp.....	10
1.2.1.2. Reguladores FixK ₂ /FixLJ.....	15
1.2.2. Regulación por óxidos de nitrógeno.....	17
1.2.2.1. Regulación por nitrato/nitrito: Los sistemas de dos componentes NarXL y NarQP.....	17
1.2.2.2. Regulación por óxido nítrico.....	18
1.3. DESNITRIFICACIÓN EN EL ORDEN <i>Rhizobiales</i>	23
1.4. DESNITRIFICACIÓN EN <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	25
1.4.1. Nitrato reductasa periplásmica.....	25
1.4.2. Nitrito reductasa.....	26
1.4.3. Óxido nítrico reductasa.....	26
1.4.4. Óxido nitroso reductasa.....	27
1.5. REGULACIÓN DE LA DESNITRIFICACIÓN EN <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	28
1.5.1. Regulación por microaerobiosis.....	28
1.5.2. Regulación por óxidos de nitrógeno.....	29
1.6. OBJETIVOS.....	31

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS.....	35
2.1.1. Cepas bacterianas y plásmidos.....	35
2.1.2. Medios de cultivo.....	38
2.1.3. Antibióticos.....	39
2.1.4. Conservación de cepas bacterianas.....	40
2.1.5. Cultivo de células de <i>B. japonicum</i>	40

2.1.5.1. Cultivo aeróbico.....	40
2.1.5.2. Cultivo microaeróbico (condiciones limitantes de oxígeno).....	40
2.1.5.3. Cultivos inducidos.....	40
2.1.6. Aislamiento de las fracciones solubles (citosol) y particulada (membranas) de <i>B. japonicum</i>	41
2.1.6.1. Cultivo de células.....	41
2.1.6.2. Preparación de membranas celulares.....	41
2.1.7. Detección de citocromos <i>c</i>	42
2.1.7.1. Electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (PAGE-SDS)....	42
2.1.7.2. Transferencia a membranas de nitrocelulosa.....	42
2.1.7.3. Detección de citocromos <i>c</i> mediante quimioluminiscencia.....	43
2.1.8. Detección de NapA.....	44
2.1.8.1. Electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (PAGE-SDS)....	44
2.1.8.2 Transferencia a membranas de nitrocelulosa.....	45
2.1.8.3. Detección de NapA mediante quimioluminiscencia.....	45
2.2. TÉCNICAS ANALÍTICAS.....	47
2.2.1. Determinación de actividad nitrato reductasa.....	47
2.2.2. Determinación de nitrito.....	47
2.2.3. Determinación de actividad β -galactosidasa.....	48
2.2.3.1. Ensayo para <i>B. japonicum</i>	48
2.2.3.1.1. Ensayo en tubo.....	48
2.2.3.1.2. Ensayo en placa ELISA.....	49
2.2.3.2. Ensayo para <i>E. coli</i>	49
2.2.4. Determinación de proteína.....	50
2.2.5. Detección de óxido nítrico (NO).....	50
2.2.5.1. Preparación del sistema electrodo/funda de membrana.....	50
2.2.5.2. Calibración del sistema.....	51
2.2.5.3. Determinación de NO.....	51
2.3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	53
2.3.1. Obtención de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> (minipreps).....	53
2.3.1.1. Método de Rusconi (método rápido).....	53
2.3.1.2. Método de la lisis alcalina.....	53
2.3.1.3. Método STET.....	54
2.3.1.4. Método TENS.....	55
2.3.2. Obtención de ADN plasmídico de <i>B. japonicum</i>	56
2.3.3. Obtención de ADN total.....	56
2.3.3.1. Método tradicional.....	56

2.3.3.2. Métodos comerciales.....	57
2.3.4. Determinación de la concentración de ADN y ARN.....	58
2.3.5. Digestión total de ADN con endonucleasas de restricción.....	59
2.3.6. Identificación de fragmentos de restricción mediante electroforesis en geles de agarosa.....	59
2.3.6.1. Electroforesis de ADN.....	59
2.3.6.2. Revelado de geles y fotografía.....	60
2.3.6.3. Estimación del tamaño molecular de fragmentos de restricción.....	60
2.3.7. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.....	60
2.3.8. Ligación de fragmentos de restricción en vectores de clonación.....	61
2.3.8.1. Ligación en vectores de clonación.....	61
2.3.8.2. Defosforilación de vectores de clonación.....	61
2.3.9. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	62
2.3.9.1. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> con RbCl.....	62
2.3.9.2. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	63
2.3.10. Transferencia de ADN a <i>B. japonicum</i> mediante conjugación.....	63
2.3.11. Experimentos de hibridación ADN-ADN.....	64
2.3.11.1. Transferencia de ADN a filtros de nylon (método tradicional).....	64
2.3.11.2. Transferencia de ADN a filtros de nylon (método del vacío).....	65
2.3.11.3. Marcaje de sondas no radiactivas.....	66
2.3.11.4. Hibridación ADN-ADN con sondas no radiactivas.....	66
2.3.12. Secuenciación de ADN de doble cadena.....	67
2.3.12.1. Aislamiento de ADN para secuenciación.....	67
2.3.12.2. Mezcla de reacción y reacción de secuenciación.....	68
2.3.12.3. Análisis informático de secuencias de ADN y proteínas.....	69
2.3.13. Transcripción <i>in vitro</i> del gen <i>nrrR</i>	69
2.3.13.1. Preparación del ADN molde.....	69
2.3.13.2. Reacción de transcripción.....	71
2.3.13.3. Marcadores de ADN.....	73
2.3.13.4. Electroforesis en gel de secuenciación urea/archilamida.....	73
2.4. SOBREEXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA NnrR.....	75
2.4.1. Mutación dirigida del gen <i>nrrR</i>	75
2.4.2. Sobreexpresión de NnrR en <i>E. coli</i>	76
2.4.2.1. Construcción del vector de expresión de <i>nrrR</i>	76
2.4.2.2. Sobreexpresión del gen <i>nrrR</i> a partir de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) transformada con pBG0704.....	77
2.4.2.2.1. Efecto del IPTG.....	77

2.4.2.2.2. Efecto del tiempo de incubación.....	77
2.4.2.2.3. Solubilidad de la proteína recombinante.....	77
2.4.3. Purificación de la proteína NnrR.....	78
2.4.3.1. Inducción de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) transformada con pBG0704.....	78
2.4.3.2. Fraccionamiento celular.....	78
2.4.3.3. Cromatografía de intercambio iónico.....	79
2.4.3.4. Filtración en gel.....	80
2.4.3.5. Cromatografía de afinidad.....	80
2.4.3.6. Electroforesis de proteína en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS).....	81
2.4.3.6.1. Preparación de las muestras.....	81
2.4.3.6.2. Electroforesis.....	82
2.4.3.6.3.-Detección.....	82
2.5. CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA NnrR.....	84
2.5.1. Integridad proteica.....	84
2.5.2. Coeficiente de extinción molar.....	84
2.5.3. Espectrometría de masas.....	84
2.5.4. Estado de agregación.....	85
2.5.5. Determinación de posibles sitios de unión a ligandos.....	85
2.6. UNIÓN NnrR-ADN.....	87
2.6.1. Ensayos de retardo en gel.....	87
2.6.1.1. Amplificación del ADN.....	87
2.6.1.2. Marcaje del ADN amplificado.....	88
2.6.1.3. Mezcla de reacción.....	89
2.6.1.4. Electroforesis en geles nativos de poliacrilamida al 7,5 % y revelado.....	89
2.6.2. Microcalorimetría.....	90
2.6.2.1. Preparación del ADN.....	90
2.6.2.1.1. Oligonucleótidos.....	90
2.6.2.1.2. Formación de oligonucleótidos de doble cadena.....	91
2.6.2.2. Determinación del desprendimiento de calor.....	91
2.7. ENSAYOS DE CRISTALIZACIÓN.....	92

3. RESULTADOS

3.1. Regulación de la desnitrificación por microaerobiosis en <i>B. japonicum</i>	95
3.1.1. Efecto de la microaerobiosis en la expresión de los genes <i>napEDABC</i>	95
3.1.1.1. Construcción de una fusión transcripcional $P_{napE}lacZ$	95

3.1.1.2. Expresión de la fusión P_{napE} - <i>lacZ</i> en diferentes fondos genéticos.....	97
3.1.1.3. Detección de NapA y actividad nitrato reductasa.....	98
3.2. Regulación de la desnitrificación por óxidos de nitrógeno.....	100
3.2.1. Construcción de fusiones transcripcionales P_{napE} - <i>lacZ</i> , P_{nirK} - <i>lacZ</i> y P_{norC} - <i>lacZ</i>	100
3.2.2. Actividad β -galactosidasa de las fusiones P_{napE} - <i>lacZ</i> , P_{nirK} - <i>lacZ</i> y P_{norC} - <i>lacZ</i> en diferentes fondos genéticos.....	101
3.2.3. Efecto del nitrito en la actividad β -galactosidasa de las fusiones P_{napE} - <i>lacZ</i> , P_{nirK} - <i>lacZ</i> , y P_{norC} - <i>lacZ</i>	103
3.2.4. Efecto del nitroprusiato sódico en la expresión de las fusiones P_{napE} - <i>lacZ</i> , P_{nirK} - <i>lacZ</i> y P_{norC} - <i>lacZ</i>	104
3.2.5. Efecto del nitroprusiato sódico en el número de células viables.....	105
3.2.6. Producción de óxido nítrico.....	106
3.2.7. Experimentos de cocultivo.....	107
3.2.8. Efecto del óxido nítrico en la expresión de la fusión P_{norC} - <i>lacZ</i>	108
3.2.9. Efecto de los óxidos de nitrógeno en la detección de NorC.....	109
3.3. Efecto del gen <i>araC</i> en la expresión de los genes <i>nap</i>	111
3.4. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NnrR.....	114
3.4.1. Construcción del plásmido de expresión.....	114
3.4.2. Sobreexpresión de la proteína recombinante.....	114
3.4.2.1. Efecto del IPTG.....	114
3.4.2.2. Efecto del tiempo de incubación.....	116
3.4.3. Purificación de NnrR.....	117
3.4.4. Características de NnrR.....	119
3.4.4.1. Integridad de la estructura secundaria.....	119
3.4.4.2. Coeficiente de extinción molar.....	120
3.4.4.3. Masa molecular.....	120
3.4.4.4. Estado de agregación.....	121
3.4.4.5. Determinación de posibles sitios de unión.....	122
3.4.5. Actividad de la proteína recombinante.....	123
3.4.5.1. Actividad <i>in vivo</i>	123
3.4.5.1.1 En un sistema homólogo.....	123
3.4.5.1.2. En un sistema heterólogo.....	124
3.4.5.2. Actividad <i>in vitro</i>	125
3.4.6. EXPERIMENTOS DE UNIÓN ADN-NnrR.....	127
3.4.6.1. Geles de retardo.....	127
3.4.6.2. Calorimetría isotérmica de titulación.....	128
3.4.7. CRISTALIZACIÓN DE NnrR.....	130

3.4.8. MODELO ESTRUCTURAL DE NnrR.....	130
4. DISCUSIÓN	
4.1. Regulación de los genes <i>napEDABC</i> de <i>B. japonicum</i>	135
4.2. Regulación por óxidos de nitrógeno.....	137
4.3. Sobreexpresión, purificación y caracterización de la proteína NnrR.....	141
5.	
CONCLUSIONES	153
6. BIBLIOGRAFÍA	157

RELACIÓN DE FIGURAS

Figura 1.1. Ciclo biogeoquímico del Nitrógeno.....	3
Figura 1.2. Árbol filogenético de los miembros del grupo Dnr y NnrR de la familia Fnr/Crp de reguladores transcripcionales.....	20
Figura 1.3. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína NnrR de <i>B. japonicum</i>	21
Figura 1.4. Regulación de los genes de la desnitrificación en <i>P. aeruginosa</i> (A), <i>P. stutzeri</i> (B), <i>P. denitrificans</i> (C) y <i>R. sphaeroides</i> (D).....	22
Figura 1.5. Organización de los genes <i>nap</i> , <i>nir</i> , <i>nor</i> y <i>nos</i> en <i>B. japonicum</i>	26
Figura 1.6. Sistema regulador FixLJ/FixK ₂ /NnrR de <i>B. japonicum</i>	30
Figura 3.1. Estrategia para la construcción del plásmido pBG0614.....	96
Figura 3.2. Detección de señales de hibridación en el ADN genómico de <i>B. japonicum</i>	97
Figura 3.3. Inmunodetección de la proteína NapA en <i>B. japonicum</i>	99
Figura 3.4. Detección de señales de hibridación en el ADN genómico de <i>B. japonicum</i>	100
Figura 3.5. Detección de citocromo NorC en <i>B. japonicum</i>	110
Figura 3.6. Estrategia para la construcción de la cepa mutante 1801 de <i>B. japonicum</i>	112
Figura 3.7. Curva de crecimiento de las cepas USDA110 y 1801 de <i>B. japonicum</i>	113
Figura 3.8. Estrategia para la construcción del plásmido pBG0704.....	115
Figura 3.9. Efecto del IPTG en la expresión de NnrR.....	116
Figura 3.10. Efecto del tiempo de incubación en la expresión de NnrR.....	117
Figura 3.11 Purificación de NnrR.....	118
Figura 3.12. Espectro de dicroísmo circular de NnrR.....	119
Figura 3.13. Espectro de dicroísmo circular de NnrR sobrecalentada.....	120
Figura 3.14. Espectrometría de masas de proteína NnrR.....	121
Figura 3.15. Determinación del estado de agregación de NnrR.....	122
Figura 3.16. Determinación del sitio de unión a ligandos.....	123
Figura 3.17. Curva de crecimiento de las cepas USDA110, 0722 y 0723 de <i>B. japonicum</i>	124
Figura 3.18. Activación <i>in vitro</i> de los genes <i>nirK</i> y <i>norCBQD</i>	126
Figura 3.19. Retardo en gel de NnrR.....	127
Figura 3.20. Titulación mediante calorimetría de fragmentos de ADN conteniendo secuencias de los promotores <i>napEDABC</i> y <i>norCBQD</i> con la proteína NnrR en condiciones de aerobiosis y microaerobiosis.....	129
Figura 3.21. Modelo estructural predictivo de NnrR de <i>B. japonicum</i>	130

Figura 3.22. Modelo estructural predictivo de NnrR de <i>B. japonicum</i> Aminoácidos posiblemente implicados en la actividad.....	131
Figura 4.1. Modelo propuesto de regulación de los genes <i>napEDABC</i> de <i>B. japonicum</i>	136
Figura 4.2. Modelo propuesto de regulación por óxidos de nitrógeno de los genes de la desnitrificación en <i>B. japonicum</i>	149

TABLAS

Tabla 1.1. Cajas Fnr/FixK en <i>B. japonicum</i>	17
Tabla 2.1. Cepas bacterianas.....	35
Tabla 2.2. Plásmidos.....	36
Tabla 2.3. Antibióticos.....	39
Tabla 3.1. Actividad β -galactosidasa de la fusión P_{napE} - <i>lacZ</i> en diferentes fondos genéticos de <i>B. japonicum</i>	98
Tabla 3.2. Actividad nitrato reductasa en diferentes cepas de <i>B. japonicum</i>	99
Tabla 3.3. Actividad β -galactosidasa de la fusión P_{napE} - <i>lacZ</i> en diferentes fondos genéticos de <i>B. japonicum</i>	102
Tabla 3.4. Actividad β -galactosidasa de la fusión P_{nirK} - <i>lacZ</i> en diferentes fondos genéticos de <i>B. japonicum</i>	102
Tabla 3.5. Actividad β -galactosidasa de la fusión P_{norC} - <i>lacZ</i> en diferentes fondos genéticos de <i>B. japonicum</i>	103
Tabla 3.6. Actividad β -galactosidasa de las fusiones P_{napE} - <i>lacZ</i> , P_{nirK} - <i>lacZ</i> , y P_{norC} - <i>lacZ</i> en diferentes fondos genéticos de <i>B. japonicum</i>	104
Tabla 3.7. Efecto del nitroprusiato sódico (SNP) en la actividad β -galactosidasa de la fusión P_{napE} - <i>lacZ</i>	105
Tabla 3.8. Efecto del nitroprusiato sódico (SNP) en el número de células viables de <i>B. japonicum</i> 0602.....	106
Tabla 3.9. Producción de óxido nítrico por diferentes cepas de <i>B. japonicum</i>	107
Tabla 3.10. Efecto del óxido nítrico en la expresión de actividad β -galactosidasa de <i>B. japonicum</i> 0109 cuando se cocultiva con la cepa GRC131.....	108
Tabla 3.11. Actividad β -galactosidasa de la fusión P_{norC} - <i>lacZ</i> en diferentes fondos genéticos de <i>B. japonicum</i>	109
Tabla 3.12. Expresión β -galactosidasa de la fusión P_{norC} - <i>lacZ</i> en <i>E. coli</i> JRG1728.....	125

1. INTRODUCCIÓN

1.1. DESNITRIFICACIÓN

La desnitrificación es un proceso clave en el ciclo biogeoquímico del nitrógeno (N) en la biosfera, ya que es el mecanismo mediante el cual se devuelve a la atmósfera el dinitrógeno atmosférico fijado (N_2) (Figura 1.1). La desnitrificación es la principal reacción para eliminar el exceso de nitratos que, consecuencia del abuso en la utilización de fertilizantes nitrogenados en la práctica agrícola, contaminan los ecosistemas terrestres y acuáticos. El óxido nítrico y el óxido nitroso, productos intermediarios de la desnitrificación, tienen también un enorme impacto sobre la contaminación atmosférica, ya que son gases que se liberan a la atmósfera e intervienen en la formación de la lluvia ácida, en el calentamiento global de la atmósfera, y en la destrucción de la capa de ozono de la misma. El óxido nítrico es, por otra parte, una importante molécula señal que participa en mecanismos de defensa frente a patógenos en eucariotas.

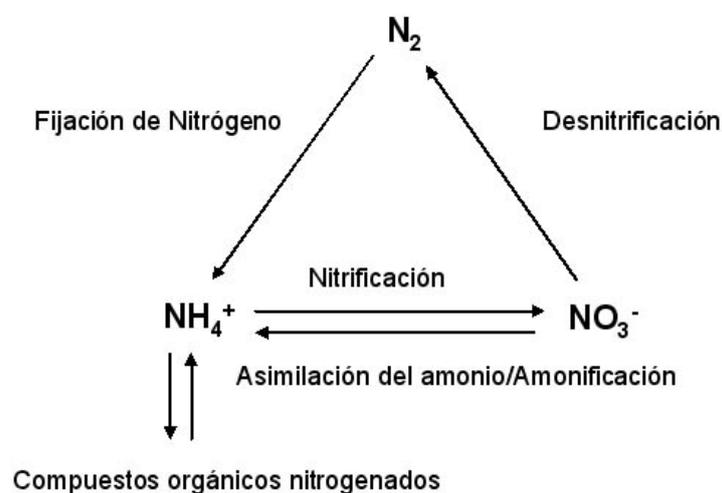


Figura 1.1. Ciclo biogeoquímico del Nitrógeno (adaptado de Zumft et al. 1997)

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



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

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

La reducción del nitrato (NO₃⁻) a dinitrógeno (N₂) lleva consigo la formación de nitrito (NO₂⁻), óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N₂O), reacción que se lleva a cabo de forma secuencial por la actuación de las enzimas nitrato reductasa (Nap/Nar), nitrito reductasa (CuNir/c_{d1}Nir), óxido nítrico reductasa (qNor/cNor) y óxido nitroso reductasa (Nos), codificadas por los genes *nap/nar*, *niK/nirS*, *cnor/qnor* y *nos* respectivamente. Aunque la reducción de nitrato inicia la desnitrificación, se considera que la reducción de NO₂⁻ a NO es, en sentido estricto, la reacción clave que define el proceso ya que la reducción de nitrato también puede ocurrir en microorganismos no desnitrificantes. De hecho, *Escherichia coli*, una de las bacterias donde más se ha estudiado la fisiología, bioquímica y genética de la respiración del nitrato, es, sin embargo, incapaz de desnitrificar.

Mientras que la desnitrificación consiste en la reducción de nitrato/nitrito a N₂, se han descrito bacterias que sólo llevan a cabo una desnitrificación parcial, incompleta, ya que no poseen, o no expresan, el equipo enzimático necesario para llevar a cabo la desnitrificación. El ejemplo más extendido es el de aquellas que carecen de óxido nitroso reductasa como *Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas aerofaciens* y diversas especies de la familia *Rhizobiaceae*. *Wollinella succinogenes* posee óxido nítrico y óxido nitroso reductasas y *Campylobacter fetus* sólo contiene óxido nitroso reductasa (Zumft, 1993). En *Rhizobium loti* se han descrito cepas que varían en el contenido de los genes de la desnitrificación, de manera que algunas sólo contienen genes *nir*, otras sólo genes *nor* y, unas terceras, sólo genes *nos* (Monza et al. 2006). En general, se considera que un microorganismo es un verdadero desnitrificante si es capaz de crecer microaeróbicamente con nitrato o nitrito como única fuente de nitrógeno y de energía.

1.1.1. Nitrato reductasas

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

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

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

entre otros. *E. coli* posee también el operon *narZYWV*, que codifica una nitrato reductasa, enzima con función similar a la del producto del operon *narGHJI* (Blasco et al. 1990).

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

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

1.1.2. Nitrito reductasas

Existen dos tipos de nitrito reductasas en la naturaleza, las que contienen un tetrahemo cd_1 en el centro activo de la enzima (NirS, tipo cd_1), y las que contienen un cobre en el sitio activo (NirK, tipo Cu). Ambas proteínas son periplásmicas y catalizan la reducción de nitrito a óxido nítrico. Las enzimas parecen ser mutuamente excluyentes en la naturaleza, ya que se ha demostrado su coexistencia a nivel de género, pero no a nivel de especie. Los dos tipos de enzima no parecen tener ninguna relación estructural ni evolutiva.

Las nitrito reductasas tipo Cu están codificadas por un único gen, al que se denomina *nirK*. Este gen se ha clonado y secuenciado en *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3 (Tosques et al. 1997), *Pseudomonas* G-179 (Ye et al. 1992), *Achromobacter cycloclastes* (Chen et al. 1996), *P. aureofaciens* (Glockner et al. 1993) y *Sinorhizobium meliloti* (Braker et al. 1998). En algunas especies, junto al gen *nirK* se encuentra el gen *nirV*, de función desconocida (Bedzyk et al. 1999; Jain y Shapleigh, 2001). El gen *nirK* suele localizarse aislado en el genoma, sin formar parte de ningún operon, y sin que en las proximidades se hallen genes relacionado con la desnitrificación (Zumft, 1997).

En contraste con la sencilla organización de *nirK*, los genes que codifican las nitrito reductasas tipo cd_1 forman parte de operones complejos en los que se encuentran genes implicados tanto en la síntesis como en el procesamiento de los grupos hemo que formarán el centro activo de la enzima. El número y organización de los genes *nir* difiere según las distintas especies. Los mejores caracterizados son los de *P. aeruginosa* (*nirSMCFDLGHJEN*) (Arai et al. 1994), *P. denitrificans* (*nirXISECFDLGHJN*) (De Boer et al. 1994) y *P. stutzeri* (*nirSTBMCDFDLGH* y *nirJEN*) (Palmedo et al. 1995). A modo de ejemplo, en *P. stutzeri* el gen *nirS* codifica la subunidad catalítica, caracterizado por la existencia de grupos hemo de tipo c y d_1 en su molécula, *nirT* codifica un citocromo tetrahemínico implicado en el transporte de electrones, *nirB* es el responsable de la síntesis de un citocromo b552 con actividad peroxidasa, *nirM* codifica un citocromo b551 que actúa como donador de electrones a la nitrito reductasa, y los demás genes están implicados en la síntesis del grupo hemo cd_1 .

Revisiones sobre las enzimas nitrito reductasa se deben a Stach et al. (2000), Cutruzzola, (1999); Van Spanning et al. (2005).

1.1.3. Óxido nítrico reductasas

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

Las enzimas qNor se encuentran en diversos grupos taxonómicos, incluyendo proteobacterias, como es el caso de *Ralstonia*, bacterias gram positivas, como en varias especies de *Bacillus*, y en arqueobacterias tales como *Pyrobaculum aerophilum* y *Sulpholobus solfataricus*. La más estudiada ha sido la de *Ralstonia eutropha*. La enzima consiste en una subunidad, NorB, de 75 kDa, que comprende dos regiones transmembrana y un dominio periplásmico (Cramm et al. 1997). *R. eutropha* posee dos copias del gen que codifica la enzima, una denominada *norB1*, a la que también se designa como *norB*, y otra *norB2*, conocida igualmente como *norZ*. Asociados a los genes *norB* se encuentran el gen *norA*, que presenta homología con el gen *fnrN* de *P. stutzeri* de función desconocida, y el gen *norR*, cuyo producto, la proteína NorR, pertenece a la familia NtrC de factores transcripcionales, y está implicada en la regulación de los genes *norB* (Pholmann et al. 2000).

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

elevadas de NO, posiblemente por unión del NO a la enzima en estado oxidado (Girsch y De Vries, 1997).

Los genes responsables de la síntesis de las enzimas cNor están agrupados en operones, cuya organización presenta ciertas diferencias entre los organismos desnitrificantes. La organización característica la encontramos en *Nitrosomonas europaea* y *R. sphaeroides*, que presentan el operon *norCBQD* (Bartnikas et al. 1997). Los genes *norC* y *norB* codifican las subunidades NorC y NorB respectivamente (Arai et al. 1995; De Boer et al. 1996). El gen *norQ* codifica una proteína citoplasmática que contiene un motivo de unión a ATP, y *norD* codifica una proteína de función desconocida. Ambas proteínas se requieren para la activación de la enzima Nor (Arai et al. 1994; De Boer et al. 1996). Algunos desnitrificantes, como *P. denitrificans*, presentan en su organización génica, además, los genes *norE* y *norF*, cuyos productos están implicados en la maduración o la estabilidad de la enzima Nor (De Boer et al. 1996). Para revisiones sobre las enzimas Nor se puede consultar a Hendriks et al. (2000), Zumft (2005), y Van Spanning et al. (2005).

1.1.4. Óxido nítrico reductasas

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

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

nosDFYL (Honisch y Zumft, 2003). Para una revisión ver Zumft (2005); Van Spanning et al. (2005).

1.2. Regulación de la desnitrificación

La desnitrificación es un proceso regulado a dos niveles. En primer lugar, existe un control en relación con la tensión de oxígeno, de forma que, en aerobiosis, no se activa la síntesis de las enzimas que intervienen en el proceso, lo que se debe a que la respiración oxigénica es un mecanismo más favorable desde el punto de vista energético. En segundo término, se requiere la presencia de nitrato, o un óxido de nitrógeno derivado. Las enzimas de la desnitrificación actúan de modo secuencial reduciendo cada óxido de nitrógeno, de modo que el producto de una enzima actúa como el sustrato de la siguiente. Ya que el nitrito y el óxido nítrico son tóxicos para la célula, su producción debe controlarse para mantener sus niveles por debajo del nivel de citotoxicidad (De Boer et al. 1994; Zumft, 1997). Las proteínas que intervienen en la regulación a ambos niveles, así como la cooperación entre las mismas, difiere de unos microorganismos desnitrificantes a otros, lo que hace que existan diferencias en los circuitos de control de la desnitrificación (Zumft, 1997; 2002; van Spanning et al. 2005).

1.2.1. Regulación por oxígeno

Durante la desnitrificación se han descrito dos sistemas que actúan como sensor de la concentración intracelular de oxígeno, representados, respectivamente, por las proteínas Fnr y FixK₂/FixLJ.

1.2.1.1. Reguladores Fnr/Crp

La existencia de Fnr se describió en *E. coli* para explicar la existencia de cepas mutantes incapaces de usar fumarato, nitrato o nitrito como aceptores de electrones durante el crecimiento en microaerobiosis. Precisamente, el término Fnr (*fumarate and nitrate reduction*) hace referencia a la deficiencia de las cepas mutantes en la reducción microaeróbica del fumarato y del nitrato (Lambden y Guest, 1976). Fnr es una proteína citoplasmática que presenta homología estructural y funcional con la proteína Crp (*Cyclic-AMP receptor protein*) de *E. coli* (Shaw et al. 1983), también llamada Cap (*Catabolite activator protein*). Fnr de *E.*

coli está implicada en la expresión de más de cuarenta genes y operones que requieren limitación de oxígeno para su expresión, entre otros, los genes que codifican la alcohol deshidrogenasa, la aconitasa, el transporte del dicarboxilato, las citocromo *o* y *d* oxidasas, la dimetil sulfóxido reductasa, la fumarato reductasa, las nitrato y nitrito reductasas, la biosíntesis del cofactor de molibdeno, la hidrogenasa, etc. (ver revisión de Guest et al. 1996; Körner et al. 2003).

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

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

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

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

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

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

La holoenzima ARNP tiene una masa molecular de 450 kDa, y está compuesta por las subunidades $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ (Chamberlin, 1976). La subunidad α tiene un tamaño molecular de 37 kDa y está formada, a su vez, por dos dominios, el N-terminal, α NT, responsable de su dimerización y de la interacción con la ARNP, y el C-terminal, α CTD, responsable de la interacción con el ADN, así como con otras moléculas que puedan actuar como activadores, represores o terminadores de la transcripción. Ambas subunidades están unidas por un puente de unos 13 aminoácidos que posee cierta flexibilidad, lo que le permite establecer diferentes contactos, según el modelo de activación, o el tipo de complejo de la transcripción (Blatter et al. 1994; Busby y Ebright, 1994). La subunidad β , de 151 kDa, es responsable de la actividad catalítica (Miller et al. 1997) y la subunidad σ , 70 kDa, es la responsable del reconocimiento de los elementos -35 y -10 de los promotores (Busby y Ebright, 1994). Existen otros factores σ de distinta masa molecular, que pueden reconocer otras secuencias específicas en los promotores, aunque el mecanismo de activación de la ARNP es similar. En *E. coli* se han identificado seis factores σ alternativos. El factor σ^{54} (54 kDa), codificado por el gen *rpoN*, está implicado en la expresión de gran variedad de genes, incluyendo los relacionados con la

fijación y asimilación del nitrógeno (Magasanik, 1982). Los factores σ^{32} (32 kDa) y σ^{24} (24 kDa), están codificados por los genes *rpoH* y *rpoE*, respectivamente, e intervienen en respuesta al choque térmico (*heat shock genes*) (Erickson et al. 1987; Erickson y Gross, 1989). El factor sigma σ^{38} (38 kDa), el producto del gen *rpoS*, es un elemento clave en la respuesta al estrés durante la transición de la fase de crecimiento exponencial al estacionario (Hengge-Aronis, 1993). El factor σ^{28} (28 kDa) está codificado por el gen *rpoS* y controla la transcripción de los genes implicados en la formación del flagelo y en quimiotaxis (Arnosti y Chamberlin, 1989). Por último, FecI, una proteína implicada en el transporte de citrato férrico, se considera también un factor σ^{32} con funciones extracitoplasmáticas (Angerer et al. 1995).

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

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

Los promotores incluidos en la clase II requieren para su activación por Cap que, además de AR1, la proteína posea otra región activadora, AR2, comprendida entre los aminoácidos His19, His21, Glu21 y Lys101 de su extremo N-terminal (Niu et al. 1996). Para la interacción con Cap, la ARNP requiere, además de los determinantes 265 y 287 de α CTD (Savery et al. 1998), un determinante adicional formado por los residuos 162 a 165 de α NTD

(Niu et al. 1996). En el mecanismo de activación propuesto, el sitio de unión de Cap a los promotores de la clase II se solaparía con el elemento -35 del promotor y la transcripción se iniciaría a partir de la interacción de AR1 con α CTD y de AR2 con α NTD. Mientras que la unión entre Cap y la α CTD, como ya se ha indicado, incrementa la afinidad de la ARNP por el promotor (Niu et al. 1996; Rhodius et al. 1997), la interacción entre AR2 y α NTD facilita la formación del complejo cerrado al complejo abierto necesario para que se inicie la transcripción. Además de estas dos interacciones, la que ocurre entre el Glu58 de una tercera región activadora (AR3) de Cap y la subunidad σ^{70} de la ARNP es esencial para la activación (Williams et al. 1991; Niu et al. 1996) ya que dicha interacción parece implicada en la formación del complejo abierto (Busby y Ebright, 1997).

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

Entre las más de las 1.200 proteínas con un motivo de unión a ADN similar al localizado en N-terminal de Cap/Fnr, se han indentificado 369 que, además, poseen en su C-terminal un motivo HTH de unión a ADN. Por sus relaciones filogenéticas, se han clasificado en 14 grupos, cada uno de ellos representado, respectivamente, por las proteínas ArcR, CoxA, Cprk, Crp, Dnr, FixK, Flp, Fnr, FnrN, MalR, NnrR, NtcA, PrfA y YeiL, que responden a un amplio espectro de señales tanto exógenas como intracelulares (Körner et al. 2003). Entre ellas, además de Fnr, otras proteínas implicadas en regulación de la desnitrificación son Anr

de *P. aeruginosa* (Ye et al. 1995) y FnrP de *P. denitrificans* (Van Spanning et al. 1997), que controlan la expresión del operón *nar* y fueron los primeros reguladores tipo Fnr descritos en bacterias desnitrificantes. La expresión del gen *aniA*, que codifica la Cu-NirK nitrito reductasa de *Neisseria gonorrhoeae*, también depende de un regulador de la familia Crp/Fnr (Lissenden et al. 2000).

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

1.2.1.2. Reguladores FixK₂/FixLJ

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

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

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

hemo con gran afinidad por el oxígeno (Gilles-Gonzalez et al. 1994; Bertolucci et al. 1996). En aerobiosis, el oxígeno se une al grupo hemo y FixL es inactiva (Tuckerman et al. 2002; Dunham et al. 2003). La variabilidad en los residuos aminoacídicos del dominio PAS confiere a FixL una gran versatilidad ya que, además de oxígeno, puede unirse a monóxido de carbono y óxido nítrico (para revisión ver Gilles-Gonzalez y Gonzalez, 2005).

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

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

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

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

Gen	Secuencia	Posición respecto al sitio de inicio de la transcripción	Referencia
<i>nnrR</i>	TTGCGctatCGCAA	Desconocido	Mesa et al. 2003
<i>napE</i>	TTGATccagATCAA	-66,5	Delgado et al. 2003
<i>nirK</i>	TTGTTgcagCGCAA	Desconocido	Velasco et al. 2001
<i>norC</i>	TTGCGccctGACAA	-45,5	Mesa et al. 2002
<i>nosR</i>	TTGATccagCGCAA	Desconocido	Velasco et al. 2004
Secuencia consenso Fnr	TTGAT-N ₄ -ATCAA	-41,5	Spiro y Guest, 1990
Secuencia consenso FixK	TTGAT-N ₄ -GTCAA	-40,5	Fischer, 1994

1.2.2. Regulación por óxidos de nitrógeno

1.2.2.1. Regulación por nitrato/nitrito: Los sistemas de dos componentes NarXL y NarQP

Como ya se ha indicado, la máxima expresión de la desnitrificación requiere, además de limitación de oxígeno, la presencia de nitrato/nitrito. En los microorganismos desnitrificantes se han encontrado tres tipos de sistemas, NarXL, NarQP y NarR, capaces de actuar como sensores de la concentración intracelular de tales aniones.

NarXL y NarQP son sistemas reguladores de dos componentes. Aunque NarX y NarQ responden tanto a la presencia de nitrato como de nitrito, NarX posee mayor afinidad por el nitrato y NarQ por el nitrito (Rabin y Stewart, 1993). NarX y NarQ activan, respectivamente, a NarL y NarP que, a su vez, controlan la expresión de los genes *nar* y *nap* (Darwin y Stewart, 1996; Darwin et al. 1998). La activación de los genes *nar* requiere, además, la presencia del factor de integración del hospedador (IHF) (Rabin et al. 1992). Aunque se desconoce la posible interacción entre IHF, NarL o NarP, y Fnr, la presencia de los sitios de reconocimiento para NarL/NarP y Fnr es esencial para la máxima expresión de la transcripción (Darwin et al. 1997,1998; Guest et al. 1996). La NarL/NarP reconoce una secuencia heptamérica localizada en la región promotora del gen que regula que se

corresponde con la secuencia consenso 5'-TAC-(C/T)-N-(A/C)-T-3', de localización algo variable (Li et al. 1994).

Sistemas homólogos a NarXL/NarQP se han descrito en las β y γ proteobacterias. En *Neisseria gonorrhoeae* se han identificado los genes *narQP*, cuyos productos controlan la expresión de los genes *nir* y *nor* en respuesta al nitrito (Lissenden et al. 2000).

NarR es un miembro de la familia Fnr/Crp que, en *P. pantotrophus* y *P. denitrificans*, es necesario para la transcripción de los genes *narKGHJI* en respuesta al nitrito. NarR carece de cisteínas, por lo que no parece que pueda unir grupos [Fe-S], y se activa por azida, por lo que pudiera tratarse de una metaloproteína (Wood et al. 2001, 2002). Puesto que se ha encontrado en α -proteobacterias carentes de *narXL*, NarR pudiera ser un sustituto de NarXL en esos microorganismos

1.2.2.2. Regulación por óxido nítrico

La primera observación relativa a una proteína sensor de NO en organismos desnitrificantes se debe a Zumft y colaboradores (1994), cuando observaron que una mutación en el gen estructural *nirS* de *P. stutzeri* ocasionaba simultáneamente una disminución tanto en la actividad nitrito reductasa como NO reductasa. Igualmente, la mutación en los genes *norB* o *norC* producía un cese de la actividad nitrito reductasa. Resultados similares a los *P. stutzeri* se obtuvieron en *P. denitrificans* (Palmedo et al. 1995), por lo que se propuso que el NO podría ser la molécula señal responsable de la inducción de los genes de la desnitrificación. Este papel se demostró por primera vez en *R. sphaeroides* mediante el empleo de fusiones transcripcionales entre las regiones promotoras de los genes *nirK* y *norC* con *lacZ*. Cuando cepas mutadas, o que carecían de *nirK*, se incubaron con nitroprusiato sódico (SNP), un agente generador de NO^+ (Bates et al. 1991) no se detectó actividad β -galactosidasa (Tosques et al. 1996, 1997; Kwiatkowski et al. 1996). Además, cuando *R. sphaeroides* 2.4.1, que carece de *nirK*, se cultivó con *A. cycloclastes*, que sí produce NO, se detectó expresión de actividad (Kwiatkowski et al. 1997). Resultados similares (Van Spanning et al. 1999; Hutchings et al. 2000; Lee et al. 2006) se obtuvieron cuando cepas de *P. denitrificans* mutadas en los genes *nirI*, *nirS* y *norC*, y transformadas con las correspondientes fusiones transcripcionales, se cultivaron con SNP o S-nitrosoglutatión (GSNO), este último utilizado también como productor de NO (De Groote et al. 1995). Igualmente, cuando la mutante *nirI* se cultivó junto con una cepa mutante en el gen *norC* se detectó actividad β -galactosidasa (Van Spanning et al. 1999). Los estudios de detección de ARNm en *P. stutzeri* demostraron que tanto el SNP

como el GSNO pueden activar la expresión de los promotores de los genes *nirS* y *norC*, aunque los máximos valores de actividad se obtuvieron en presencia de NO gas a una concentración de 5 nM, valor que corresponde con la concentración de NO estacionaria durante el proceso de desnitrificación (Vollack y Zumft, 2001).

Hasta la fecha, todos los reguladores transcripcionales que responden al NO se clasifican en dos grandes grupos, Dnr y NnrR, que toman sus nombres de los primeros miembros identificado de cada grupo, la proteína Dnr (*Dissimilatory nitrate respiration regulator*) de la γ -proteobacteria *Pseudomonas* y la NnrR (*Nitrite and nitric oxide reductase regulator*) de la α -proteobacteria *R. sphaeroides*. Aunque Dnr y NnrR se incluyen en la familia Crp/Fnr, ambas proteínas están filogenéticamente separadas (Mesa et al. 2002; Körner et al. 2003).

Todos los miembros del grupo Dnr carecen del motivo de cisteínas que se requiere para la unión de los grupos [4Fe-4S], aunque algunos de ellos presentan alguna cisteína en su secuencia (Figura 1.3). Presentan en el extremo C-terminal una secuencia consenso representada por los aminoácidos EXXSR, que establecen contacto con las bases TA y GC de la secuencia de ADN que reconocen (Spiro, 1994). A este grupo pertenecen Dnr de *P. aeruginosa* (Arai et al. 1995), Nnr de *P. denitrificans* (van Spanning et al. 1997), DnrD de *P. stutzeri* (Vollack et al. 1999) (Figuras 1.2 y 1.3). Todos ellos son responsables de mantener la homeostasis intracelular de NO mediante el control de la expresión coordinada, en condiciones microaeróbicas, de las enzimas que intervienen en el metabolismo del NO, esto es la nitrito y la óxido nítrico reductasas. También pertenecen a este grupo la proteína NarR de *P. pantotrophus*, implicada, como ya se ha indicado, en la expresión del operón *nar* y de *narK* que codifica un putativo transportador de nitrato/nitrito (Wood et al. 2001).

El grupo NnrR recibe su nombre de la proteína NnrR de *R. sphaeroides* 2.4.3, implicada en la expresión simultánea de la nitrito reductasa y la NO reductasa (Tosques et al. 1996). A este grupo pertenecen también NnrR de *R. sphaeroides* 2.4.1. (Kwiatkowski et al. 1997), Nnr de *R. sphaeroides* sp. *denitrificans* (Sabaty et al. 1999), NnrR de *Pseudomonas* G-179 (Bedzyk et al. 1999) y NnrR de *Bradyrhizobium japonicum* (Mesa et al. 2003) (Figura 1.2). En contraste con el motivo EXXSR de las proteínas Dnr, los miembros del grupo NnrR presentan en su extremo C-terminal la secuencia HXXSR, en la que el glutamato de Dnr se sustituye por una histidina, en la secuencia de reconocimiento del ADN. También se ha sugerido que Dnr y NnrR parecen estar relacionados con la regulación de las nitrito reductasas de tipo *cd₁* y de tipo Cu, respectivamente (Mesa et al. 2003).

Como en Dnr, los miembros del grupo NnrR carecen del motivo de cisteínas y, en general, presentan una secuencia más homogénea entre sus miembros que los del grupo Dnr (Figura 1.2).

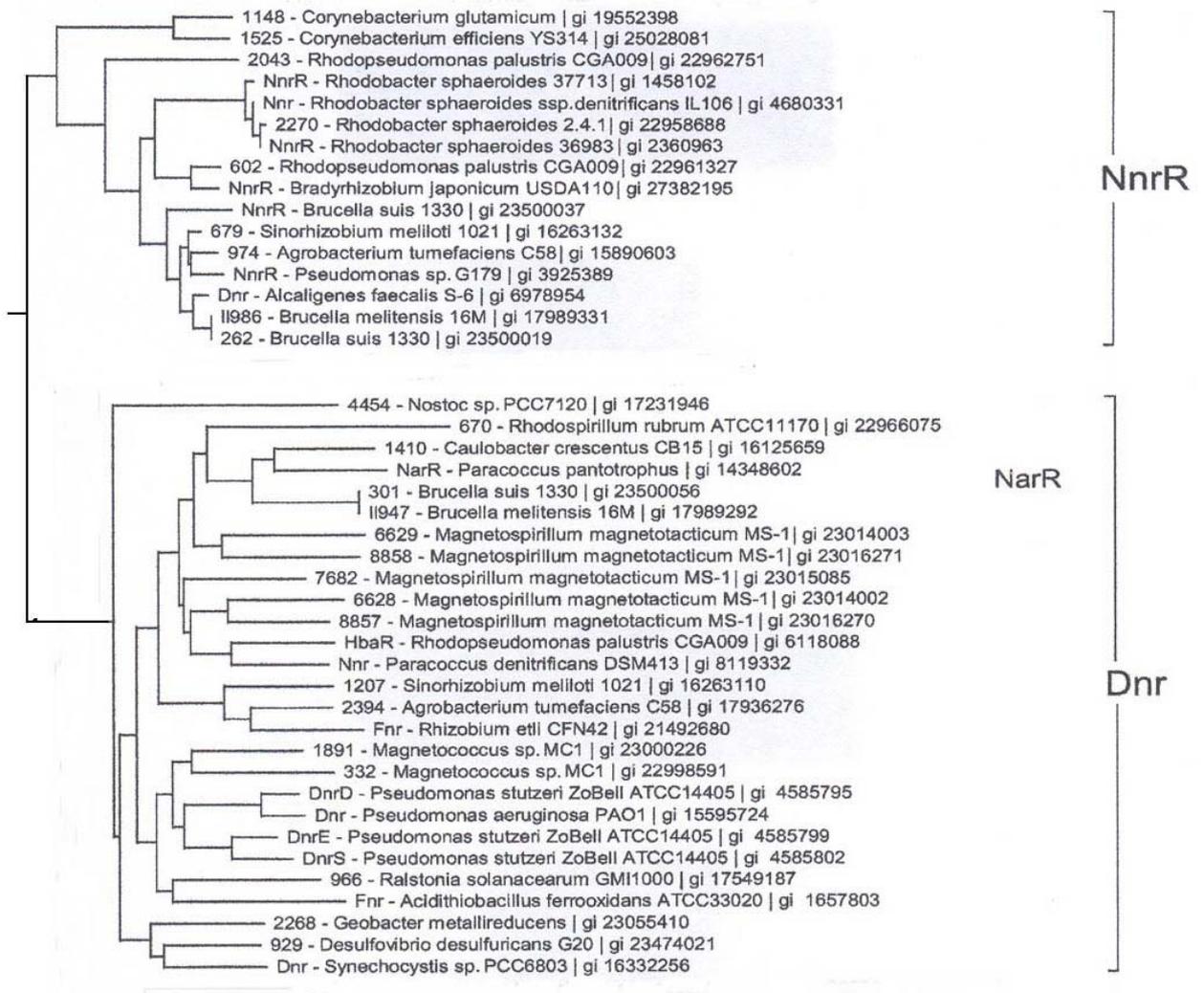


Figura 1.2. Árbol filogenético de los miembros del grupo Dnr y NnrR de la familia Fnr/Crp de reguladores transcripcionales. Se presenta el nombre de la proteína o el código de la misma en los casos en los que no ha sido caracterizada, seguido del nombre de la especie y su número de identificación (número GI) según la base de datos del NCBI (Körner et al. 2003).

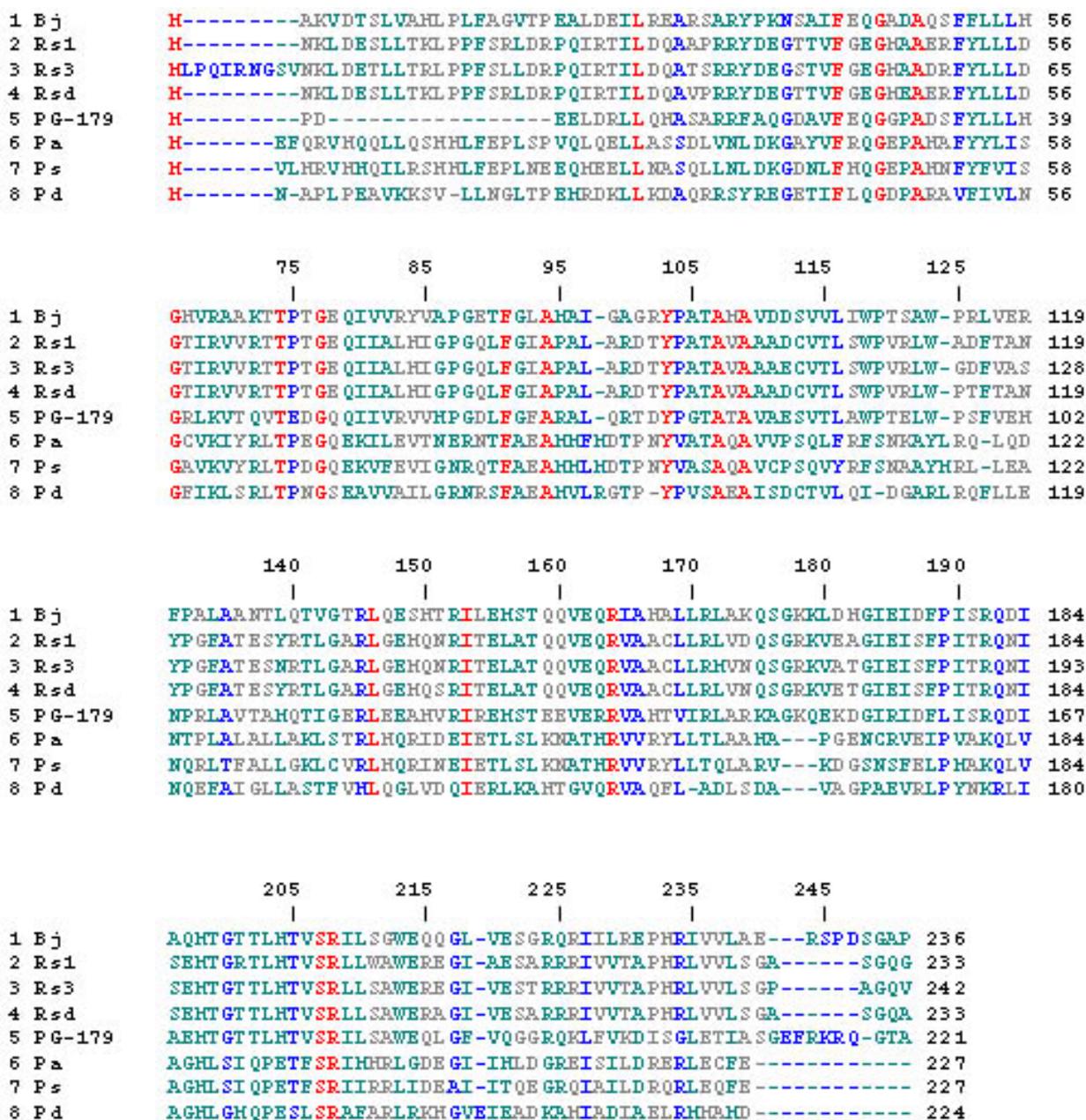


Figura 1.3. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína NnrR de *B. japonicum* (Bj; número de identificación AJ311165, Mesa et al. 2003) con las proteínas NnrR de *R. sphaeroides* 2.4.1 (Rs1; AF016258, Kwiatkowski et al. 1997), NnrR de *R. sphaeroides* 2.4.3 (Rs3; U62403, Tosques et al. 1996), Nnr de *R. sphaeroides* sp. *denitrificans* (Rsd; AF126490, Sabaty et al. 1999), NnrR de *Pseudomonas* G-179 (PG-179; AF083948, Bedzyk et al. 1999), Dnr de *P. aeruginosa* (Pa; D50019, Arai et al. 1995), DnrD de *P. stutzeri* (Ps; AJ131715, Vollack et al. 1999), y Nnr de *P. denitrificans* (Pd; U17435, van Spanning et al. 1995). En rojo se indican los aminoácidos idénticos en todas las secuencias; en azul, cuando presentan, al menos, un 75% de identidad; en verde, aquellos cuya identidad oscila entre el 50 y el 75%; en gris, los aminoácidos cuya identidad es inferior al 50%.

Un esquema de los circuitos de regulación de los genes de la desnitrificación por las proteínas de los grupos Dnr y NnrR se presenta en la Figura 1.4.

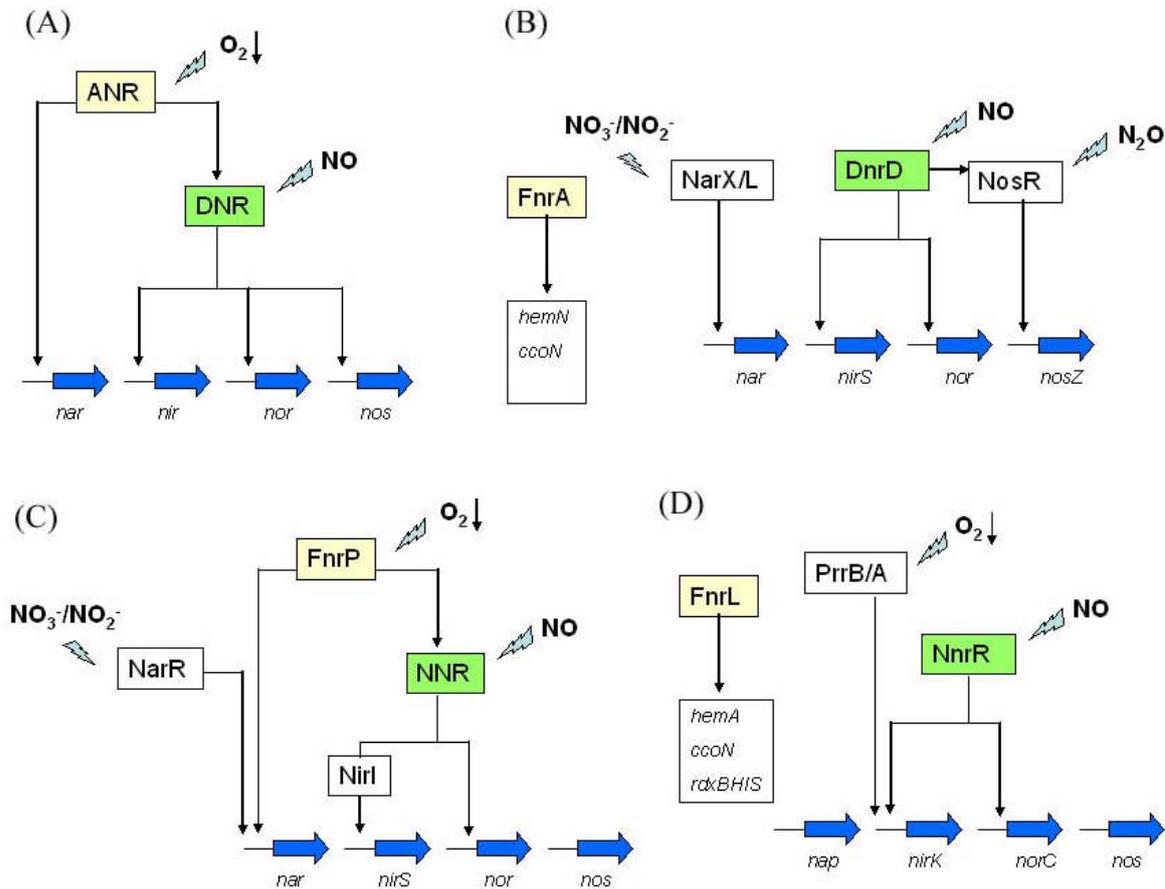


Figura 1.4. Regulación de los genes de la desnitrificación en *P. aeruginosa* (A), *P. stutzeri* (B), *P. denitrificans* (C) y *R. sphaeroides* (D). En el recuadro verde se representa la proteína del grupo Dnr/NnrR de la familia Crp/Fnr de reguladores transcripcionales, mientras que en el recuadro naranja aparecen las proteínas de los grupos Fnr/FnrN de la misma superfamilia, implicados en el metabolismo anaerobio.

En la región promotora de todos los genes controlados por Dnr y NnrR existe una secuencia consenso homóloga a las cajas de anaerobiosis reguladas por Fnr, que se localiza entre las posiciones -40,5 a -43,5 respecto del sitio de inicio de la transcripción, lo que sugiere que los promotores que regulan la expresión de *nir* y *nor* pertenecen a la clase II. Hasta la fecha no se ha demostrado la interacción directa de ninguno de estos reguladores con su

promotor. No obstante, las cepas de *P. denitrificans* mutadas en la secuencia palindrómica y transformadas con plásmidos que contenían una fusión entre la región promotora de los genes *nirS* o *norC* y el gen *lacZ*, carecen de actividad β -galactosidasa cuando se incuban en condiciones desnitrificantes (Saunders et al. 1999).

En *E. coli*, Fnr actúa como sensor de NO ya que se ha demostrado su intervención en la desrepresión del gen *hmpA*, gen que codifica una flavohemoglobina que elimina el exceso de NO mediante su reducción a N₂O en microaerobiosis (Poole et al. 1996, Poole y Hughes, 2000).

1.3. Desnitrificación en el orden *Rhizobiales*

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

Aunque en 1938 Rajagopalan observó la capacidad de los rizobios para desnitrificar, fue Evans, en 1954, el primero en demostrar la presencia de un sistema activo de reducción de nitrato en *B. japonicum*. Más tarde, Kennedy et al. (1975) detectaron actividad nitrato reductasa tanto en el citosol como en las membranas de *B. japonicum*. Sin embargo, la capacidad de desnitrificar no está muy extendida entre los rizobios, ya que sólo *B. japonicum* y *A. caulinodans* son los únicos capaces de crecer cuando se cultivan en condiciones limitantes de oxígeno y presencia de nitrato como aceptor final de electrones. Se ha sugerido que la capacidad de desnitrificar pudiera constituir una ventaja competitiva para la

permanencia y distribución en el suelo y para la capacidad de colonización de aquellas bacterias que la posean.

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

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

R. etli forma simbiosis fijadoras de nitrógeno con *Phaseolus vulgaris*. El análisis de la secuencia del genoma de *R. etli* CFN42 revela la existencia de los genes *norCBQD* y *nirK*, que codifican enzimas de tipo cNor y Cu-Nir, respectivamente (<http://www.kazusa.or.jp/rhizobase>). Esta cepa carece de los genes *nap* y *nos*, por lo que es incapaz de crecer en microaerobiosis con nitrato como único aceptor de electrones, y carece de actividad nitrato reductasa (Bueno et al. 2005). Sin embargo, *R. etli* CFN42 crece con nitrito como aceptor final de electrones, y una mutante en el gen *nirK* es incapaces de crecer en presencia de nitrito. Puesto que la mutante expresa una actividad Nir reducida y un consumo de nitrito disminuido, se ha propuesto que la enzima NirK pudiera estar implicada en la respiración y en la detoxificación del nitrito en *R. etli* (Bueno et al. 2005).

En el genoma de *S. meliloti* 1021, concretamente en el plásmido simbiótico pSymA, se han localizado genes que presentan homología con los genes *nap*, *nir*, *nor* y *nos* de otras bacterias desnitrificantes (<http://www.kazusa.or.jp/rhizobase>). No obstante, *S. meliloti* 1021 no crece en microaerobiosis con nitrato o nitrito como aceptores finales de electrones.

Mutantes en los genes *nos* forman simbiosis efectivas con *Medicago sativa*, lo que demostró, por primera vez, que la desnitrificación no es esencial para la fijación del nitrógeno en *S. meliloti* 1021 (Holloway et al. 1996).

1.4. Desnitrificación en *Bradyrhizobium japonicum*

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

1.4.1. Nitrato reductasa periplásmica

En una serie de experimentos de secuenciación al azar de fragmentos de ADN capaces de codificar péptidos de localización periplásmica, se identificó una región del cromosoma de *B. japonicum* cuya secuencia presentaba homología con la de los genes *nap* de otros microorganismos. Así, se identificaron los genes *napE*, *napD*, *napA*, *napB* y *napC*, que codifican proteínas de 6.6, 11.8, 94.5, 16.9 y 23.9 kDa, respectivamente (Figura 1.5). De acuerdo con el análisis de las secuencias de aminoácidos deducidas de la secuencia de nucleótidos, NapA es la subunidad catalítica, que contiene un cofactor de molibdopterina y guanina y un centro [4Fe-4S], NapB es un citocromo con dos grupos hemo *c* que recibe electrones de NapC, un citocromo de membrana con cuatro grupos hemo *c*. NapE es una proteína transmembrana de función desconocida, y NapD es una proteína soluble que podría participar en la maduración del complejo NapAB (Delgado et al. 2003)

La mutación en *napA* dio lugar a una cepa que carece de la proteína NapA; consecuentemente, la cepa no expresa actividad nitrato reductasa y es incapaz de crecer microaeróbicamente con nitrato. Por tanto, la enzima nitrato reductasa periplásmica es la responsable del crecimiento de *B. japonicum* en condiciones desnitrificantes (Delgado et al. 2003).

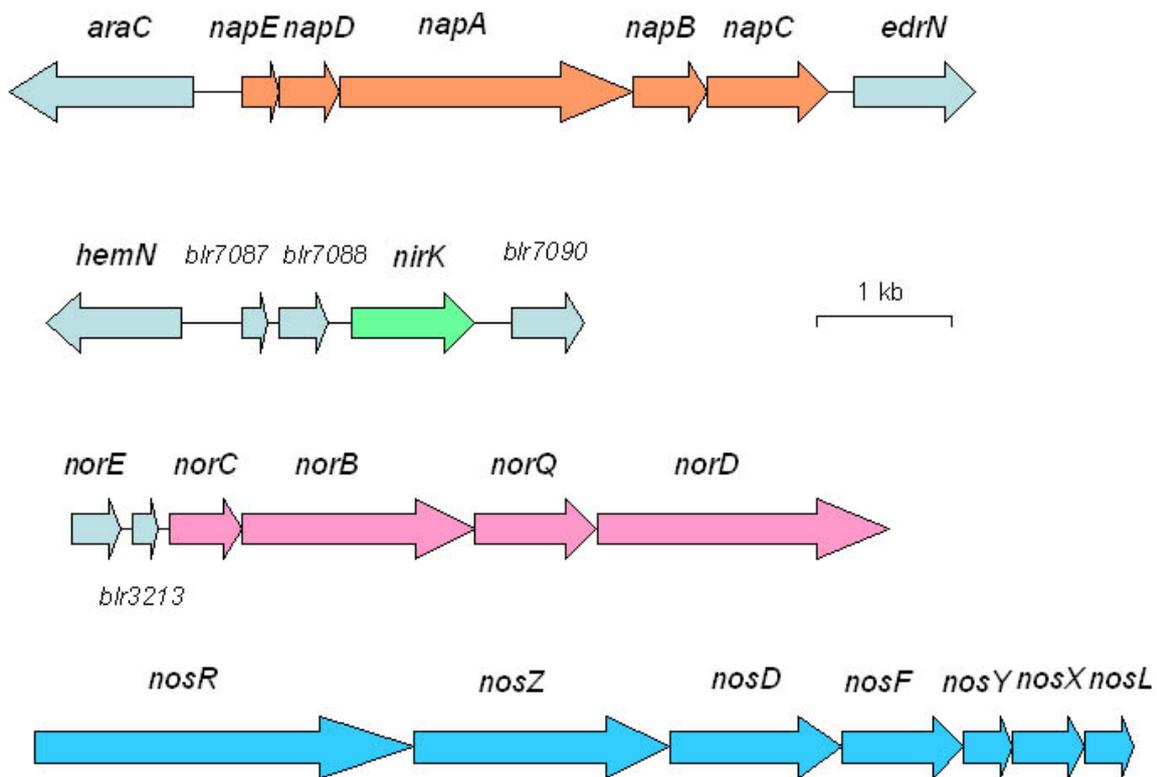


Figura 1.5. Organización de los genes *nap*, *nir*, *nor* y *nos* en *B. japonicum*. Junto a los nombres de los genes identificados, se incluyen los códigos de identificación de la Rhizobase.

1.4.2. Nitrito reductasa

En *B. japonicum* se ha identificado el gen *nirK* (Figura 1.8) que codifica una proteína de 34,4 kDa cuya identidad con otras nitrito reductasas de tipo Cu oscila entre el 78 % de *Alcaligenes faecalis* y el 68 % de *R. sphaeroides*. La secuencia en el extremo N-terminal posee el motivo (S/T)RRXFLK característico de metaloproteínas periplásmicas que se exportan mediante el sistema Tat. Una cepa deficiente en *nirK* es incapaz de crecer en microaerobiosis con nitrato, carece de actividad nitrito reductasa y acumula nitrito en el medio (Velasco et al. 2001).

1.4.3. Óxido nítrico reductasa

Los genes *nor* de *B. japonicum* se identificaron mediante hibridación con los genes *norCB* de *P. denitrificans*. La posterior secuenciación del ADN correspondiente mostró que

se organizan en los genes *norCBQD* (Figura 1.8), que codifican proteínas de 17, 40.5, 28.8 y 70 kDa, respectivamente. La secuencia primaria de NorC y NorB tienen entre el 49 y el 85 % de identidad con las secuencias de las enzimas Nor de *P. stutzeri*, *P. aeruginosa*, *P. denitrificans*, *R. sphaeroides*, *Pseudomonas* sp. G-179 y *A. faecalis*. NorC es un citocromo *c* asociado a membrana, capaz de unirse a la proteína NorB que, a su vez, es homóloga a la subunidad I (FixN) de la oxidasa terminal *cbb₃* de distintas bacterias. Los productos de los genes *norQ* y *norD* tienen funciones desconocidas, aunque se han implicado en el ensamblaje y maduración de la enzima (Mesa et al. 2002). La inactivación de uno de los genes *norC* o *norB* dio lugar a cepas mutantes incapaces de crecer en microaerobiosis con nitrato como fuente de energía. El análisis de grupos hemo *c* mediante detección de su actividad peroxidasa intrínseca reveló la ausencia de una proteína de 17 kDa en las membranas de la cepa mutante *norC* (Mesa et al. 2002).

1.4.4. Óxido nítrico reductasa

Los genes *nos* de *B. japonicum* se identificaron mediante hibridación de su ADN genómico con el gen *nosZ* de *P. stutzeri*. El aislamiento y secuenciación de la región de ADN que mostraba hibridación con la sonda permitió establecer la existencia de siete marcos abiertos de lectura, que se identificaron como los genes *nosRZDFYLX* (Figura 1.8). Los genes *nosR*, *nosZ*, *nosD*, *nosF*, *nosY*, *nosL* y *nosX* codifican proteínas de 85, 72, 49, 33, 28, 19 y 38.5 kDa, respectivamente. La secuencia primaria de NosZ tiene entre un 50% y un 77 % de identidad con las secuencias NosZ de otros organismos desnitrificantes, entre ellos *P. stutzeri*, *R. eutropha*, *P. denitrificans*, *S. meliloti*, *A. cycloclastes* y *P. fluorescens*. NosZ contiene dos centros de cobre, Cu_A y Cu_Z, de los que el último actúa como centro catalítico. Las proteínas NosDFY constituyen un transportador de tipo ABC que cataliza el transporte de Cu al interior celular. NosL se ha identificado como una chaperona. NosX posee en su extremo N-terminal un motivo de argininas que sugiere que NosX puede plegarse en el citoplasma y adquirir sus cofactores antes de su transporte al periplasma. El gen *nosR* codifica una proteína reguladora con seis regiones transmembrana en cuyo extremo C-terminal se localizan dos agrupaciones de cisteínas, similares a las de algunas ferredoxinas bacterianas que se unen a centros de tipo [4Fe-4S] (Velasco et al. 2004).

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

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

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

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

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

1.5.1. Regulación por microaerobiosis

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

FixLJ es un sistema regulador de dos componentes, en el que, como ya se ha indicado, FixL es la proteína sensor que activa al regulador FixJ mediante fosforilación. El único gen diana de FixJ identificado hasta la fecha en *B. japonicum* es *fixK₂*, que está sujeto a autorregulación por su propio producto (Nellen-Anthamatten et al. 1998). Como ya se ha indicado FixK₂ pertenece al grupo FixK de la familia Fnr/Crp de factores transcripcionales (Körner et al. 2003). Además de controlar la expresión de los genes *nir*, *nor* y *nos*, también regula otros genes y operones relacionados con el metabolismo microaeróbico, entre ellos

fixNOQP/fixGHIS y *rpoN*₁ que codifican, respectivamente, la síntesis de la oxidasa terminal *cbb*₃ y uno de los genes σ^{54} (Nellen-Anthamatten et al. 1998), *hupA*, responsable de la síntesis de una hidrogenasa (Durmowicz y Maier, 1998), y de los genes *hemN*₁ y *hemN*₂ implicados en la síntesis de la enzima coproporfirinógeno III oxidasa independiente de oxígeno (Fischer et al. 2001). FixK₂ también activa a *fixK*₁, aunque se desconocen los genes regulados por FixK₁. Un esquema de los genes que controla el sistema regulador FixLJ/FixK₂ se indica en la Figura 1.6.

En la región promotora de todos los genes de la desnitrificación de *B. japonicum* regulados por FixK₂ se han localizado secuencias homólogas a la de la caja FixK (5'-TTGAT-N₄-GTCAA-3'), a las que podría unirse para activar la transcripción (Tabla 1.1).

1.5.2. Regulación por óxidos de nitrógeno

En *B. japonicum* se ha identificado el gen *nnrR*, de 710 pares de bases cuyo producto, la proteína NnrR de 236 aminoácidos, comparte del 47% al 78 % de identidad con otros reguladores transcripcionales de la familia Fnr/Crp (Mesa et al. 2003). NnrR carece de los motivos de cisteínas y presenta en su dominio C-terminal el motivo HXXSR de unión a ADN (Figura 1.6), por lo que se incluye en el grupo NnrR de la familia Fnr/Crp. Una cepa mutante en *nnrR* es incapaz de crecer en microaerobiosis con nitrato como aceptor final de electrones, y carece de actividad nitrato y nitrito reductasa (Mesa et al. 2003).

La expresión de *nnrR* está controlada por FixK₂, y en su región promotora se encuentra una secuencia de tipo FixK (Tabla 1.1). Mientras que la activación microaeróbica de una fusión traduccional entre *nnrR* y *lacZ* requiere las proteínas FixLJ y FixK₂, la inducción de los genes *nir* y *nor* mediada por óxidos de nitrógeno requiere NnrR (Mesa et al. 2003). Se ha propuesto, por tanto, que NnrR constituye un sistema adicional de control de la desnitrificación, de manera que, en *B. japonicum*, el proceso estaría controlado por una cascada de regulación formada por el sistema FixLJ-FixK₂ (Figura 1.9) (Mesa et al. 2003).

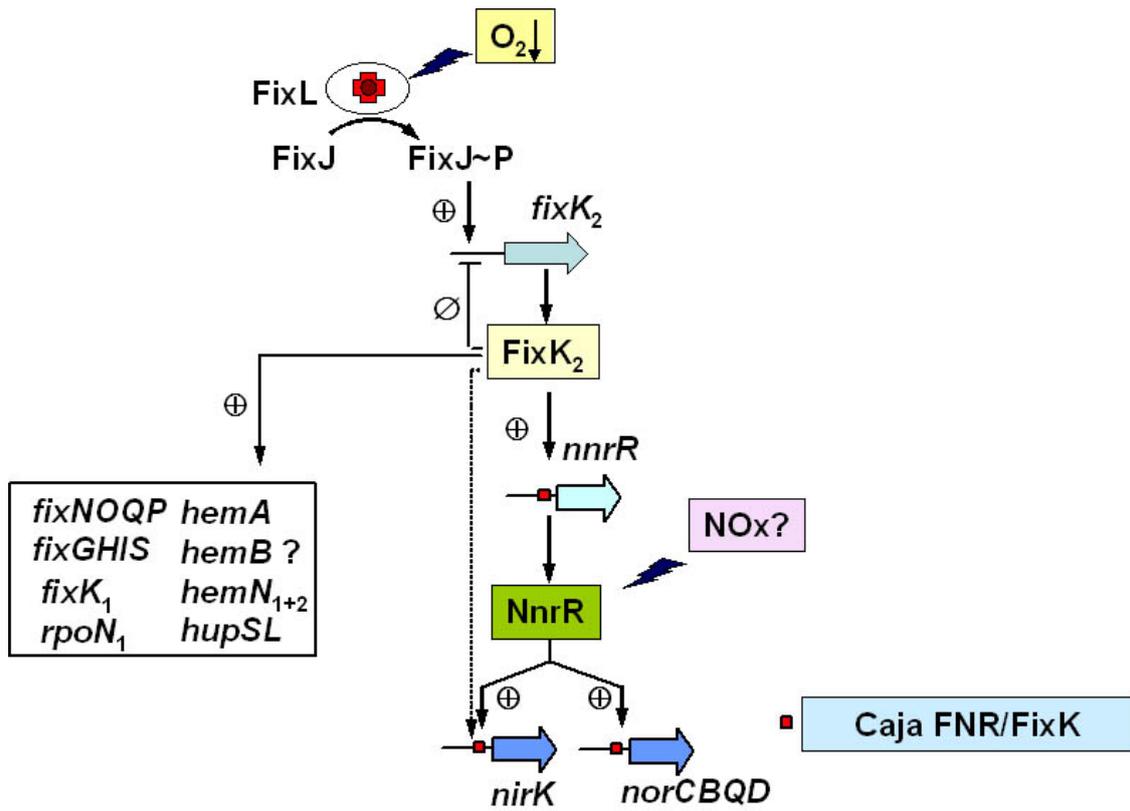


Figura 1.6. Sistema FixLJ/FixK₂/NnrR de *B. japonicum* (tomado de Mesa et al. 2003). NO_x: óxidos de nitrógeno.

1.6. OBJETIVOS

Durante el trabajo de investigación realizado en el Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín, CSIC, sobre metabolismo anaerobio del nitrato en *Bradyrhizobium japonicum* se han aislado y caracterizado los genes *napEDABC*, *nirK*, *norCBQD* y *nosRZDFYLX*, cuyos productos se han identificado como las enzimas nitrato reductasa periplásmica, nitrito reductasa, óxido nítrico reductasa y óxido nitroso reductasa, respectivamente. Estas enzimas llevan a cabo, de modo secuencial, la reducción del nitrato a dinitrógeno molecular, proceso conocido como desnitrificación. Cepas de *B. japonicum* alteradas en los genes *nap*, *nir* y *nor* no crecen cuando se cultivan en microaerobiosis con nitrato como única fuente de energía.

También se ha identificado el gen *nnrR*, cuyo producto pertenece al grupo NnrR de la familia de reguladores transcripcionales Fnr/Crp, que controlan la expresión de los genes *nir* y *nor* en respuesta al óxido nítrico (NO). En *B. japonicum*, NnrR parece controlar la expresión de los genes *nir* y *nor* en respuesta al nitrato, o a un óxido de nitrógeno derivado de él, ya que cepas mutantes en *nnrR* carecen de actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa.

Los estudios de regulación han demostrado que la expresión en microaerobiosis de los genes *nirK*, *norCBQD* y *nosRZDEFLXY* está controlada por el sistema regulador de dos componentes FixLJ y el activador transcripcional FixK₂. Por otra parte, la inducción de los genes *nir* y *nor* mediada por óxidos de nitrógeno requiere NnrR y la expresión del gen que la codifica, *nnrR*, está controlada por FixK₂. De esta manera, NnrR se añade al sistema regulador FixLJ-FixK₂ como un nuevo elemento, integrando la señal correspondiente al óxido de nitrógeno implicado en la inducción de los genes de la desnitrificación.

A diferencia de los genes *nir*, *nor* y *nos* no se ha estudiado si la expresión de los genes *nap* en microaerobiosis está controlada por la cascada de regulación FixLJ-FixK₂. Además de la limitación de oxígeno necesaria para la desnitrificación, se desconoce la molécula señal, bien sea el nitrato, nitrito, óxido nítrico u óxido nitroso, responsable de la inducción del gen *nnrR*.

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

- 1.- Regulación de la expresión de los genes *napEDABC* por limitación de oxígeno. Intervención del sistema regulador FixLJ-FixK₂-NnrR en la expresión de dichos genes. Estudio de otras proteínas implicadas en su regulación.

2.- Regulación de la desnitrificación por óxidos de nitrógeno. Función del nitrato, nitrito, óxido nítrico y óxido nitroso en la expresión de los genes *napEDABC*, *nirK*, *norCBQD* y *nosRZDEFLXY*.

3.- Sobreexpresión y purificación de la proteína NnrR

4.- Caracterización de NnrR como regulador transcripcional de los genes de la desnitrificación

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS

2.1.1. Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas de *Bradyrhizobium japonicum* y *Escherichia coli*, así como los plásmidos utilizados en este trabajo, junto con sus características más relevantes, se indican en las Tablas 2.1 y 2.2, respectivamente.

Tabla 2.1. Cepas bacterianas

Cepa	Características relevantes	Fuente o referencia
<i>B. japonicum</i>		
USDA110	Cepa parental; Cm ^r	US Department of Agriculture, Beltsville, MD, USA
110 <i>spc4</i>	Cepa parental; Cm ^r , Spc ^r	Regensburger y Hennecke, 1983
GRPA1	USDA110 <i>napA::Ω</i> ; Cm ^r , Spc ^r , Sm ^r	Delgado et al. 2003
GRK308	USDA110 <i>nirK::Ω</i> ; Cm ^r , Spc ^r , Sm ^r	Velasco et al. 2001
GRC131	USDA110 <i>norC::aphII-PSP</i> ; Cm ^r , Km ^r	Mesa et al. 2002
GRB993	USDA110 <i>norB::aphII-PSP</i> ; Cm ^r , Km ^r	Mesa et al. 2002
7403	USDA110 <i>spc4 fixL::aphII</i> ; Cm ^r , Spc ^r , Km ^r	Nellen-Anthamatten y Hennecke, 1992
7360	USDA110 <i>spc4 fixJ::aphII</i> ; Cm ^r , Spc ^r , Km ^r	Nellen-Anthamatten y Hennecke, 1992
9043	USDA110 <i>spc4 fixK2::Ω</i> ; Cm ^r , Spc ^r , Sm ^r	Nellen-Anthamatten et al. 1998
8678	USDA110 <i>nnrR::aphII</i> en la orientación opuesta a <i>nnrR</i> ; Cm ^r , Km ^r	Mesa et al. 2003
GRZ3035	USDA110 <i>nosZ::Ω</i> ; Cm ^r , Spc ^r , Sm ^r	Velasco et al. 2004
0602	USDA110 con pBG0614; Cm ^r , Tc ^r	Robles et al. 2006
1204	7403 con pBG0614; Cm ^r , Spc ^r , Km ^r , Tc ^r	Robles et al. 2006
1305	7360 con pBG0614; Cm ^r , Spc ^r , Km ^r , Tc ^r	Robles et al. 2006
1108	9043 con pBG0614; Cm ^r , Sm ^r , Spc ^r , Tc ^r	Robles et al. 2006
0715	8678 con pBG0614; Cm ^r , Km ^r , Tc ^r	Robles et al. 2006
0609	USDA110 <i>napC::Ω</i> ; Cm ^r , Spc ^r , Sm ^r	Proporcionado por N. Bonnard
0603	GRPA1 con pBG0614; Cm ^r , Sm ^r , Spc ^r , Tc ^r	Este trabajo
0604	GRPA1 con pRJ2498; Cm ^r , Sm ^r , Spc ^r , Tc ^r	Este trabajo
0605	GRPA1 con pRJ2499; Cm ^r , Sm ^r , Spc ^r , Tc ^r	Este trabajo
0107	GRK308 con pBG0614; Cm ^r , Sm ^r , Spc ^r , Tc ^r	Este trabajo
0108	GRK308 con pRJ2498; Cm ^r , Sm ^r , Spc ^r , Tc ^r	Este trabajo

0109	GRK308 con pRJ2499; Cm ^r , Sm ^r , Spc ^r , Tc ^r	Este trabajo
0407	GRC131 con pBG0614; Cm ^r , Km ^r , Tc ^r	Este trabajo
0408	GRC131 con pRJ2498; Cm ^r , Km ^r , Tc ^r	Este trabajo
0409	GRC131 con pRJ2499; Cm ^r , Km ^r , Tc ^r	Este trabajo
0304	GRZ3035 con pRJ2499; Cm ^r , Sm ^r , Spc ^r , Tc ^r	Este trabajo
1801	USDA110 <i>araC</i> :: Ω; Cm ^r , Spc ^r , Sm ^r	Este trabajo
0722	8678 con pRJ8845; Cm ^r , Km ^r , Spc ^r , Sm ^r	Este trabajo
0723	8678 con pPP375Ω.1; Cm ^r , Km ^r , Spc ^r , Sm ^r	Este trabajo
<i>E. coli</i>		
S17.1	<i>thi, pro, recA, hsdR, hsdM</i> , RP4Tc::Mu, Km::Tn7; Tp ^r , Sm ^r , Spc ^r	Simon et al. 1983
DH5α	<i>supE44, ΔlacU169, f80, lacZAM, 5hsdR171, recA1, endA1, gyrA96, thi1, relA1</i>	BRL®
HB101	<i>supE44, hsdS20, recA13, ara 14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20, xyl5mtl1</i>	Bolívar y Backman, 1979
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	Novagen®
0703	DH5α con el plásmido pBG0703; Km ^r	Este trabajo
0704	DH5α con el plásmido pBG0704; Ap ^r	Este trabajo
JRG1728	MC1000 Δ (<i>tyrR fnr rac try</i>)	Shaw y Guest, 1982
1705	JRG1728 con pRJ2499; Tc ^r	Este trabajo
1706	1705 con pRJ8843; Km ^r , Tc ^r	Este trabajo
1707	1705 con pBBR-MCS2; Km ^r , Tc ^r	Este trabajo

Tabla 2.2. Plásmidos

Plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
pUC18	Vector de clonación ; Ap ^r	Yanisch-Perron et al. 1985
pBSKS (+)	Vector de clonación; Ap ^r , <i>lacZ, ori fl</i>	Stratagene®
pK18 <i>mobsacB</i>	Vector de clonación, <i>mob</i> ⁺ , <i>oriT</i> (RP4), <i>lacZ, sacB</i> , Km ^r	Schäfer et al. 1994
pBBR1MCS-2	Vector de clonación; Km ^r	Kovach et al. 1994
pSUP3535	Vector de clonación; <i>lacZ</i> , Tc ^r	Mesa et al. 2003
pPP375Ω.1	Vector de clonación; Sm ^r , Spc ^r	Proporcionado por H. Hennecke/H.M. Fisher
pJQ200	Vector de clonación; Gm ^r	Quandt y Hynes, 1993
pPM200P9134	pJQ200 que contiene los genes <i>araC</i> y <i>napEDABC</i> de <i>B. japonicum</i> ; Gm ^r	Delgado et al. 2003
pBG0614	pSUP3535 con la fusión transcripcional P _{<i>napE</i>} - <i>lacZ</i> ; Tc ^r	Robles et al. 2006

pRJ2498	pSUP3535 con la fusión transcripcional P_{nirK} - <i>lacZ</i> ; Tc ^r	Mesa et al. 2003
pRJ2499	pSUP3535 con la fusión transcripcional P_{norC} - <i>lacZ</i> ; Tc ^r	Mesa et al. 2003
pMP220	Vector de clonación, <i>lacZ</i> ; Tc ^r	Spaink et al. 1987
pUCBM20	Vector de clonación derivado de pUC18; <i>lacZ</i> , Ap ^r	Roche®
pRJ8676	pUCBM20 con un fragmento <i>MluI/PvuII</i> de 2.390 pares de bases de pRJ8658 con el gen <i>nrrR</i> y el extremo 5' de <i>nrrS</i> de <i>B. japonicum</i> ; Ap ^r	Mesa et al. 2003
pRJ8658	pUC18 con un fragmento <i>SacI</i> de 10.510 pares de bases de <i>B. japonicum</i> que contiene los genes <i>nrrR</i> y <i>nrrS</i> ; Ap ^r	Proporcionado por H. Hennecke/H.M. Fisher
pHP45Ω	Plásmido con el interposón omega (Ω); Sm ^r , Spc ^r	Prentki y Kirsch, 1984
pET3a(+)	Vector de expresión; Ap ^r	Novagen®
pET28a(+)	Vector de expresión; Km ^r	Novagen®
pRJ8819	pET28a(+) con un fragmento <i>NdeI/EcoRI</i> de pRJ8676; Km ^r	Proporcionado por S. Mesa
pBG0703	pRJ8819 con un sitio <i>EcoRI</i> transformado en otro <i>BamHI</i> mediante mutagénesis dirigida; Km ^r	Este trabajo
pBG0704	pET3a(+) con un fragmento <i>NdeI/BamHI</i> de pBG0703; Ap ^r	Este trabajo
pBG1801	pBS KS (+) con el fragmento <i>BamHI</i> de 5 kb de pPM200P9134; Ap ^r	Este trabajo
pBG1802	pK18 <i>mobsacB</i> con el fragmento <i>HindIII/BamHI</i> de pBG1801; Km ^r	Este trabajo
pBG1803	pBG1802 con el fragmento <i>SmaI</i> de pHP45Ω; Sm ^r , Spc ^r	Este trabajo
pNE2	pUC18 con el fragmento <i>EcoRI/SacI</i> de pBG1801; Ap ^r	Este trabajo
pNE3	pUCBM20 con el fragmento <i>NcoI</i> de pRJ8676; Ap ^r	Este trabajo
pRJ8843	pBBR-MCS2 con el fragmento <i>EcoRI/HindIII</i> de pNE3; Km ^r	Este trabajo
pRJ8845	pPP375Ω.1 con el fragmento <i>XbaI/HindIII</i> de pNE3; Sm ^r , Spc ^r	Este trabajo
pSUP202	Vector de clonación pBR325:: <i>mob</i> , <i>oriT</i> de RP4; Tc ^r , Cm ^r , Ap ^r	Simon et al. 1983
pCR4-TOPO	Vector de clonación; Ap ^r , Km ^r	Invitrogen®
pBG0618	pCR4-TOPO con el fragmento <i>EcoRI/BamHI</i> que contiene la región promotora de los genes <i>napEDABC</i> . Ap ^r , Km ^r	Este trabajo
pBG0103	pBS KS(+) con el fragmento <i>EcoRI/BamHI</i> que contiene la región promotora de el gen <i>nirK</i> . Ap ^r	Este trabajo
pBG0402	pBS KS(+) con un fragmento <i>EcoRI/BamHI</i> que contiene la región promotora de los genes <i>norCBQD</i> . Ap ^r	Este trabajo
pRJ9601	pBS KS (+) con un fragmento <i>SacI-SmaI</i> que contiene la región promotora del gen <i>rrn</i> de <i>B. japonicum</i> y su terminador; Ap ^r	Beck et al. (1997)
pRJ9519	pBS KS (+) con un fragmento <i>BstXI-KpnI</i> que contiene el terminador <i>rrn</i> de <i>B. japonicum</i> ; Ap ^r	Beck et al. 1997
pRJ8822	pRJ9519 con un fragmento <i>EcoRI/BamHI</i> que contiene la región	Proporcionado por S.

pRJ8839	promotora de el gen <i>nirK</i> ; Ap ^r pRJ9519 con un fragmento <i>EcoRI/BamHI</i> que contiene la región promotora de los genes <i>norCBQD</i> ; Ap ^r	Mesa Este trabajo
---------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------

2.1.2. Medios de cultivo

Las cepas de *E. coli* se cultivaron de forma rutinaria en medio LB (Luria-Bertani, Miller 1972): NaCl, 5 g; triptona, 10 g; extracto de levadura, 5 g; agua (desionizada), 1 litro. Para preparar medio sólido, se adicionó agar bacteriológico a una concentración de 15 g/litro. El medio se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Medio Lactato-Nitrato (LN, Spencer y Guest, 1973): KH₂PO₄, 5,44 g; K₂HPO₄, 10,49 g; (NH₄)₂SO₄, 2 g; MgSO₄ x 7H₂O, 0,05 g; MnSO₄ x 4H₂O, 5 mg; FeSO₄ x 7H₂O, 0,125 mg; CaCl₂, 0,5 mg; lactato sódico, 0,04 M; KNO₃, 0,04 M; agua (desionizada), 1 litro.

Para *B. japonicum* se han empleado los siguientes medios:

Medio PSY (peptone-mineral salts-yeast extract, Regensburger y Hennecke 1983): KH₂PO₄, 0,3 g; Na₂HPO₄, 0,3 g; CaCl₂ x 2H₂O, 0,05 g; MgSO₄ x 7H₂O, 0,10 g; extracto de levadura, 1 g; peptona, 3 g; 10 ml de solución concentrada 100x de elementos traza; agua desionizada, 1 litro. Para preparar medio sólido se adicionó agar bacteriológico a una concentración de 15 g/litro.

Medio YEM (yeast extract mannitol, Vincent, 1970): Manitol, 5 g; NaCl, 0,1 g; extracto de levadura, 1 g; K₂HPO₄, 0,5 g; MgSO₄ x 7 H₂O, 0,2 g; agua (desionizada), 1 litro. Para preparar medio sólido se adicionó agar bacteriológico a una concentración de 15 g/litro.

Medio YEMN: Medio YEM suplementado con 10 mM de KNO₃.

Medio YEMN2: Medio YEM suplementado con 1 mM de KNO₂.

Medio Bergersen (Bergersen, 1977): Medio mínimo para *B. japonicum*: K₂HPO₄, 0,23 g; MgSO₄ x 7 H₂O, 0,10 g; glicerol, 4 ml; glutamato sódico, 1,1 g; 10 ml de solución

concentrada 100x de elementos traza; agua desionizada, 1 litro. Para preparar medio sólido se adicionó agar bacteriológico a una concentración de 15 g/litro.

Solución concentrada de elementos traza (100x): H₃BO₃, 1g; ZnSO₄ x 7H₂O, 0,1 g; CuSO₄ x 5H₂O, 0,05 g; Mn Cl₂, 0,05 g; Na₂MoO₄ x 2H₂O, 0,01 g; FeCl₃, 0,1 g; agua desionizada, 1 litro.

2.1.3. 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 filtros Minisart[®] NML (Sartorius) de 0,2 µm de tamaño de poro. En el caso de la tetraciclina y del cloramfenicol no fue necesaria la esterilización por filtración ya que se empleó alcohol o una mezcla hidroalcohólica para disolverlos. La concentración final de los distintos antibióticos fue la que se indica en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Antibióticos

Antibiótico	Concentración (µg/ml)		
	<i>B. japonicum</i>		<i>E. coli</i>
	Líquido	Sólido	Líquido y sólido
Dihidrocloruro de espectinomicina (Spe)	100	200	25
Sulfato de estreptomicina (Sm)	100	200	25
Hidrocloruro de tetraciclina* (Tc)	25	100	10
Sulfato de kanamicina (Km)	100	200	20
Ampicilina sódica (Ap)	-	-	200
Cloramfenicol** (Cm)	20	20	50

-*La solución concentrada de Tc se preparó en metanol:agua (1:1) o metanol dependiendo de la concentración de la misma (1 ó 10 mg/ml, respectivamente).

-**Para la solución concentrada de Cm se utilizó etanol.

2.1.4. Conservación de cepas bacterianas

Para la conservación prolongada de las distintas cepas se han utilizado criotubos que contenían alícuotas de cultivos en fase logarítmica adicionados de glicerol estéril a una concentración final del 20%. En el caso de las cepas de *B. japonicum*, se emplearon suspensiones bacterianas que se obtuvieron a partir de cultivo sólido. Los criotubos se almacenaron a -80 °C.

2.1.5. Cultivo de *B. japonicum*

2.1.5.1. Cultivo aeróbico

Los cultivos de células de *B. japonicum* en medio líquido se llevaron a cabo, de forma rutinaria, a partir de precultivos de 3 ml con los que se inocularon (dilución 1:100) tubos, frascos o matraces de mayor volumen provistos de tapón de algodón o de tapón metálico ajustable. Cuando fue necesario, estos cultivos, a su vez, se emplearon para inocular (dilución 1:100) cantidades mayores de medio de cultivo. Las células se incubaron en un agitador orbital (120 r.p.m.) a 30 °C durante 4-6 días.

2.1.5.2. Cultivo microaeróbico (condiciones limitantes de oxígeno)

Para el cultivo microaeróbico de *B. japonicum* se utilizaron tubos, frascos o matraces de distinto volumen, llenos de medio, y tapados herméticamente con tapón de goma perforable. Las células se incubaron con agitación (120 r.p.m.) a 30 °C durante 8-10 días.

2.1.5.3. Cultivos inducidos

Puesto que muchas de las cepas mutantes de *B. japonicum* que se emplean en este estudio son incapaces de crecer microaeróbicamente con nitrato como única fuente de nitrógeno, algunos estudios se llevaron a cabo utilizando cultivos inducidos. Para ello, las células se cultivan en aerobiosis para obtener masa celular y, después de lavarlas mediante centrifugación, se utilizaron para inocular de forma masiva los medios apropiados para incubar las células en las condiciones adecuadas al estudio a realizar.

2.1.6. Aislamiento de las fracciones soluble (citosol) y particulada (membranas) de *B. japonicum*

2.1.6.1. Cultivo de células

Las células de *B. japonicum* se cultivaron aeróbicamente en matraces de 2 l que contenían 500 ml de medio PSY, se lavaron dos veces mediante centrifugación (8.000 r.p.m., 12 minutos, 4 °C) y se resuspendieron en medio YEMN (2,5 ml/l). Mientras que la mitad de la suspensión celular se congeló a -20 °C para su análisis posterior, la otra mitad se empleó para inocular (2.5 ml/l, DO₆₀₀ ~ 0,2) frascos de 1 l llenos de medio YEMN. Los cultivos microaeróbicos así preparados se incubaron a 120 r.p.m. durante 96 h.

2.1.6.2. Preparación de membranas celulares

- 1.- Después de la incubación, lavar dos veces con tampón de lavado (50 mM de NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 6,8; 1 mM MgCl₂; 0,1 mM CaCl₂ y 0,9% NaCl) y resuspender el sedimento en 3 ml de tampón de fraccionamiento adicionado de 1 mM de fluoruro de ácido fenil sulfónico (PMSF), DNAsa (20 µg/ml) y RNAsa (20 µg/ml).
- 2.- Romper las células en una célula de presión (SLM, Aminco) preenfriada en hielo mediante diferencias presión (120 MPa) utilizando una prensa de French (SLM, Aminco). Repetir el proceso 2-3 veces.
- 3.- Centrifugar el extracto celular resultante (10.000 r.p.m., 10 min, 4 °C) para sedimentar las células que no se hayan roto. Recoger el sobrenadante y recentrifugar (45.000 r.p.m., 1 h, 4 °C). Se utilizó una ultracentrífuga Beckman[®] provista de un rotor modelo 70Ti.
- 4.- Recoger el sobrenadante (citosol).
- 5.- Resuspender el sedimento (membranas) en 100 µl de tampón de fraccionamiento, distribuirlo en tubos de microfuga (20 µl/tubo) y conservar a -20 °C hasta su uso.

- Tampón de lavado: 50 mM de NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 6,8; 1 mM MgCl₂; 0,1 mM CaCl₂ y 0,9% NaCl.

- Tampón de fraccionamiento: Tampón de lavado suplementado con 1mM de 4-amidino-fenilmetano fluoruro de sulfonilo (*p*-APMSF), ADNasa (20 µg/ml) y ARNasa (20 µg/ml).

2.1.7. Detección de citocromos c

2.1.7.1 Electroforesis en geles desnaturalizantes (sodio dodecil sulfato, SDS) de poliacrilamida (PAGE- SDS)

Se ha empleado el método descrito por Laemmli (1970). Los geles de separación y de empaquetado se prepararon a una concentración final del 12% y del 5% de acrilamida:bisacrilamida, respectivamente, como se indica a continuación:

Gel de separación (12%)		Gel de empaquetado (5%)	
Agua destilada	4,6 ml	Agua destilada	3,1 ml
Tris 1,5 M pH 8,8 + SDS 0.4 %	5 ml	Tris 0.25 M pH 6,8 + SDS 0.4 %	5,0 ml
EDTA 0,1 M pH 7,5	0,4 ml	EDTA 0,1 M pH 7,5	0,2 ml
SDS 10%	0,2 ml	SDS 10%	0,1 ml
Acrilamida:Bisacrilamida (29,2:0,8), 30%	8 ml	Acrilamida:Bisacrilamida (29,2:0,8), 30%	1,7 ml
Persulfato amónico 10%	200 µl	Persulfato amónico 10%	150 µl
TEMED	10 µl	TEMED	10 µl

Como molde se emplearon placas de vidrio de 7 x 10 cm y espaciadores de 0,75 mm. La electroforesis se llevó a cabo en una cubeta Miniprotean II (Biorad) rellena de tampón de electroforesis. La intensidad de la corriente fue de 20 mA y la temperatura de 4 °C. En cada carril se cargó 25 µg de proteína diluída (1/5 v/v) en tampón de carga.

- Tampón de carga (1x): Tris 30 mM pH 6.8, glicerol 10%, SDS 1 %, EDTA 1 mM, beta-mercaptoetanol 5%, azul-bromofenol 0.1%. Calentar a 100 °C 1 minuto.

- Tampón de electroforesis 1x. A partir de una solución stock 5x (Tris 15 g, glicina 72 g, agua destilada hasta 1 litro), adicionar 10 ml de SDS al 10% a 200 ml del stock y completar con agua destilada hasta 1 l.

2.1.7.2. Transferencia a membranas de nitrocelulosa

Después de la electroforesis (aproximadamente 3 h en las condiciones descritas anteriormente), las proteínas se transfirieron a membranas de Immobilon-P (Millipore) de la forma descrita por Bradley et al. (1988). Para ello:

1. Sumergir la membrana de Immobilon-P durante 15 s en metanol, 2 minutos en agua desionizada y, por lo menos, 5 min en tampón de transferencia.
2. Entre las dos esponjas de la cubeta de transferencia empapadas en tampón de transferencia se colocó, por este orden, una hoja de papel Whatman 3MM también empapado en tampón de transferencia, el gel de poliacrilamida, la membrana y, finalmente, otro papel Whatman. La unidad así preparada se colocó en la cubeta y la transferencia se llevó a cabo aplicando una intensidad de 10 mA durante 3 h.
3. Después de la transferencia, sumergir la membrana en PBS.

- Tampón de transferencia: Tris 25 mM; glicina 192 mM; metanol 20% v/v;; pH 8,3.

- PBS: Tampón fosfato salino: Na₂HPO₄ x 2H₂O 80 mM; NaH₂PO₄ x H₂O 20 mM; NaCl 100 mM; pH 7,5.

2.1.7.3. Detección de citocromos *c* mediante quimioluminiscencia

La detección de proteínas que pudieran contener hemo *c* unido covalentemente se realizó mediante la técnica descrita por Delgado et al. (2003) basada en la detección de actividad peroxidasa intrínseca del hemo *c*. Para ello:

1. Incubar la membrana con solución de quimioluminiscencia, en oscuridad durante 3 minutos.
2. Envolver la membrna en una bolsa de plástico transparente y ponerla en con una película autorradiográfica (Hyperfilm β-max, Amersham) durante 10-30 minutos.
3. Revelar la película utilizando revelador y fijador TETENAL[®], a las diluciones y tiempos recomendados por el fabricante.
4. Secar la película.
5. Teñir la membranas con rojo de Ponceau durante 5 minutos. Desteñir con agua desionizada.

- Solución de quimioluminiscencia: luminol (Roche®) 8,0 mg en 20 ml de solución Tris-HCl 50 mM pH 8,6 y NaCl 150 mM, a lo que antes de su utilización se añaden 200 µl de 4-yodofenol al 1% en dimetilsulfóxido y 3,2 µl de H₂O₂ 30%.

- Solución de rojo Ponceau: Rojo Ponceau S 0,4% (p/v) en ácido tricloroacético 3% (v/v).

2.1.8. Detección de NapA

El cultivo de *B. japonicum* y la obtención de las fracciones soluble y particulada se llevaron a cabo como se indica en los apartados 2.1.6.1 y 2.1.6.2., respectivamente.

2.1.8.1. Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (PAGE-SDS)

Se ha utilizado el método descrito por Laemmli (1970). Los geles de separación y de empaquetado se prepararon a una concentración final del 12% y del 5% de acrilamida:bisacrilamida, respectivamente, como se indica a continuación:

Gel de separación (12%)		Gel de empaquetado (5%)	
Agua destilada	6,6 ml	Agua destilada	6,80 ml
Tris 1,5 M pH 8,8	5,0 ml	Tris 1 M pH 6,8	1,25 ml
EDTA 0,1 M pH 7,5	0,4 ml	EDTA 0,1 M pH 7,5	0,20 ml
SDS 10%	0,2 ml	SDS 10%	0,10 ml
Acilamida:Bisacrilamida (29,2:0,8), 30%	8,0 ml	Acilamida:Bisacrilamida (29,2:0,8), 30%	1,70 ml
Persulfato amónico 10%	200 µl	Persulfato amónico 10%	100 µl
TEMED	10 µl	TEMED	10 µl

Como molde se emplearon placas de vidrio de 7 x 10 cm y espaciadores de 0,75 mm. La electroforesis se llevó a cabo a temperatura ambiente, en una cubeta Miniprotean II (Biorad) rellena de tampón de electroforesis. La intensidad de la corriente fue de 20 mA. Alícuotas de la proteína (25 µg) se diluyeron en tampón de carga (1/5 v/v), se calentaron a 100 °C durante 1 minuto y se cargaron en el gel.

- Tampón de carga (1x): Tris 30 mM pH 6.8, glicerol 10%, SDS 1 %, EDTA 1 mM, beta-mercaptoetanol 5%, azul-bromofenol 0.1%. Calentar a 100 °C 1 minuto.

- Tampón de electroforesis (5x): Tris 3 g, glicina 14,5 g, SDA, 1%, completar con agua destilada hasta 1 litro.

2.1.8.2. Transferencia a membranas de nitrocelulosa

Después de la electroforesis, aproximadamente 3 h en las condiciones descritas, las proteínas se transfirieron a filtros de Immobilon-P (Millipore) de la manera descrita para la detección de citocromos tipo *c* (apartado 2.1.7.2).

Posteriormente:

- 1.- Sumergir la membrana en PBS.
- 2.- Comprobar la bondad de la transferencia Para ello, se cortó la parte de la membrana que incluía el marcador y se tiñó con rojo Ponceau, durante 2- 3 minutos. Desteñir con agua desionizada.
- 3.- Sumergir el resto de la membrana en tampón de bloqueo y agitar durante 2 h a temperatura ambiente (también se puede mantener toda la noche a 4 °C).
- 4.- Lavar la membrana con tampón PBST.
- 5.- Incubarla en 10 ml de una dilución 1/1000 del anticuerpo anti-Nap de *P. pantotrophus* en tampón PBSTA, en agitación, durante 2 h, a temperatura ambiente.
- 6.- Lavarla con PBST durante 10 minutos manteniendo siempre la agitación. Repetir 2 veces.
7. Adicionar sobre la membrana una solución diluída 1/1000 (v/v) en PBSTA de una solución anti-IgG de conejo marcada con peroxidasa. Incubar, en agitación, durante 2 h a temperatura ambiente.
8. Lavar 3 veces con PBST y luego 2 veces con PBS, durante 6 minutos por lavado, manteniendo siempre la agitación.

2.1.8.3. Detección de NapA mediante quimioluminiscencia

Se realizó mediante la detección de luminiscencia debida a la actividad peroxidasa de los anticuerpos secundarios (Delgado et al. 2003). En esencia:

1. Sumergir la membrana en solución de quimioluminiscencia en agitación durante 2-3 minutos.
2. Escurrir la membrana, envolverla en un plástico transparente y ponerla en contacto con una película autorradiográfica (Hyperfilm β -max, Amersham), durante el tiempo apropiado según la intensidad de la luminiscencia (2-3 s de exposición fueron suficientes).

3. Revelar la película con revelador y fijador TETENAL[®] a las diluciones y tiempos recomendados por el fabricante. Mientras que la película se seca, la membrana se sumergió en PBS y luego se tiñó con la solución de rojo Ponceau S.

Solución de quimioluminiscencia: luminol (Roche[®]) 8,0 mg en 20 ml de solución Tris-HCl 50 mM pH 8,6 y NaCl 150 mM, a lo que antes de su utilización se añaden 200 µl de 4-yodofenol al 1% en dimetilsulfóxido y 3,2 µl de H₂O₂ 30%.

- Tampón de bloqueo: PBS adicionado de leche desnatada en polvo al 5%.
- Tampón PBST: PBS suplementado con Tween 20 al 0,1%.
- Tampón PBSTA: PBST adicionado de albúmina sérica bovina (Sigma) al 0,1% (p/v).

2.2. TÉCNICAS ANALÍTICAS

2.2.1. Determinación de actividad nitrato reductasa

La determinación de actividad nitrato reductasa en extractos celulares (ensayos *in vitro*) se realizó empleando la metodología descrita por Delgado et al. (1992). Para ello,

1.- Mezclar:

250 μ l de mezcla de reacción nitrato reductasa

200 μ l de 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 (8 mg/ml). Mezclar con suavidad e, inmediatamente, colocar los tubos a 30 °C.

3.- Mantener la reacción a 30 °C durante 15-30 minutos. Los controles se obtienen agitando las mezclas de reacción vigorosamente en el momento de la adición del ditionito sódico hasta la completa desaparición del color azul producido por éste.

Para la detección de actividad nitrato reductasa en células enteras (ensayos *in vivo*) se empleó la misma mezcla de reacción suplementada con 50 μ g/ml de alquil-trimetilbromuro de amonio (MTAB) para permeabilizar las células.

- Mezcla de reacción (por 100 ml): 40 ml de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5); 20 ml de KNO₃ 100 mM, 20 ml de metil viológeno 2 mM y 20 ml de agua destilada.

2.2.2. Determinación de nitrito

Para la valoración de nitrito se utilizó la reacción de diazotación de Griess-Yllosway que emplea la sulfanilamida y el ácido N-naftil-etilén-diamino (NNEDA) como reactivos (Hageman y Hucklesby, 1971):

1.- A un volumen de muestra se adicionan volúmenes iguales de sulfanilamida y de NNEDA. Agitar e incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos.

2.- Determinar la absorbancia a 540 nm de longitud de onda. La curva patrón de nitrito se preparó a partir de concentraciones conocidas de KNO₂ en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5).

- Sulfanilamida: Disolver 5 g de sulfanilamida en 100 ml de ácido clorhídrico concentrado (12 N). Diluir hasta 500 ml con agua destilada.
- Acido N-naftil-etilén-diamino (NNEDA): Disolver 100 mg de NNDA en 500 ml de agua destilada.
- Ambos reactivos deben preservarse de la luz, manteniéndolos en frascos color topacio o envueltos en papel de aluminio. Es aconsejable guardarlos a 4 °C

2.2.2. Determinación de actividad β -galactosidasa

Se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Sambrook et al. (1989).

2.2.2.1. Ensayo para *B. japonicum*

2.2.2.1.1. Ensayo en tubo

- 1.- Tomar 3 ml del cultivo ($DO_{600} = 0,4-0,5$) de *B. japonicum*. Centrifugar a 12.000 r.p.m. durante 5 minutos. Resuspender el sedimento en 300 μ l de medio YEM.
- 2.- Adicionar 400 μ l de tampón Z.
- 3.- Adicionar 100 μ l de cloroformo y 50 μ l de SDS al 0,1 % en tampón Z. Agitar en vórtex durante 30 s e incubar 5-10 minutos a 30 °C.
- 4.- Adicionar 150 μ l de ONPG en tampón fosfato 0,1 mM e incubar a 30 °C hasta que aparezca suficiente color amarillo. Adicionar 350 μ l de Na_2CO_3 1 M .
- 5.- Centrifugar 5 minutos. Recoger el sobrenadante y determinar la absorbancia espectrofotométricamente a 420 nm.

- La actividad β -galactosidasa se expresa en unidades Miller (UM), de acuerdo con la fórmula: $U = \{1000 \times DO_{420}\} / \{t \text{ (minutos)} \times V \text{ (ml)} \times DO_{600}\}$, donde DO_{420} y DO_{600} son los valores de DO determinados a 420 y 600 nm respectivamente; t= tiempo de incubación; V= volumen de cultivo.

- La actividad β -galactosidasa también se puede expresar de acuerdo con la fórmula:

$UM/mg \text{ proteína} = \{1000 \times DO_{420}\} / \{0,0045 \times t \text{ (minutos)} \times V \text{ (ml)} \times mg \text{ proteína/ml}\}$, donde 0,0045 es la absorbancia de 1 nmol de ONPG; DO_{420} y DO_{600} son los valores de DO determinados a 420 y 600 nm respectivamente; t= tiempo de incubación; V= volumen de cultivo.

- Tampón Z: $Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$ (60 mM), 1,068 g; $NaH_2PO_4 \times H_2O$ (40 mM), 0,551 g; KCl (10 mM), 0,074 g; $MgSO_4$ (1mM), 0,0246 g; β -mercaptoetanol (50 mM), 0,350 ml; agua destilada, 100 ml. Ajustar a pH 7,0.

- ONPG: 2-nitrofenil- β -D-galactopiranosido: 4 mg de ONPG/ml de tampón fosfato.

- Tampón fosfato: A: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,1 mM), 1,245 g/70 ml; B: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,1 mM), 0,689g/50 ml, 39 ml. Mezclar 61 ml de A y 39 ml de B.
- Carbonato sódico (Na_2CO_3 , 1 M): 10,6 g/ 100ml

2.2.2.1.2. Ensayo en placa ELISA

- 1.- Tomar 3 ml del cultivo ($\text{DO}_{600} = 0,4-0,5$) de *B. japonicum*. Centrifugar a 12.000 r.p.m. durante 5 minutos. Resuspender en 500 μl de medio YEM.
- 2.- Tomar 200 μl de la suspensión anterior y cargar en una placa ELISA (para determinar la D.O. a 600 nm (DO_{660})).
- 3.- De la misma suspensión, tomar 25 μl y cargar por triplicado en otra placa ELISA.
- 4.- Adicionar 20 μl de cloroformo.
- 5.- Adicionar 25 μl de SDS 0,1 % en tampón Z.
- 6.- A continuación, adicionar 100 μl de tampón Z. Incubar durante 5-10 minutos a 30 °C.
- 7.- Adicionar 150 μl de ONPG en tampón fosfato 0,1 mM e incubar a 30 °C hasta que aparezca suficiente color amarillo. Parar la reacción con 75 μl de Na_2CO_3 1M.
- 8.- Una vez parada la reacción, determinar la absorbancia a 420 y a 550 nm.

La actividad β -galactosidasa se expresa en unidades Miller (UM), calculadas en este caso de acuerdo a una variante la fórmula anterior: $\text{UM} = \{[\text{DO}_{420} - (1,7 \times \text{DO}_{550})] / (\text{DO}_{660} \times \text{V} \times \text{t})\} \times 1000$, donde DO_{420} , DO_{550} y DO_{660} son los valores de DO determinados a 420, 550 y 660 nm, respectivamente; t = tiempo de incubación; V = volumen de cultivo.

2.2.2.2. Ensayo para *E. coli* (ensayo en tubo)

- 1.- Tomar alícuotas de 100 μl de los cultivos de *E. coli* cultivados aprox. 16 h.
- 2.- Adicionar 885 μl de tampón Z y, a continuación, 5 μl de SDS al 0,1 % en tampón Z y 10 μl de cloroformo.
- 3.- Adicionar 200 μl de ONPG en tampón fosfato 0,1 mM y se incuba a 30 °C hasta que aparezca suficiente color amarillo. Parar la reacción adicionando 500 μl de Na_2CO_3 1M.
- 4.- Centrifugar 5 minutos. Recoger el sobrenadante y determinar la absorbancia espectrofotométricamente a 420 nm.

2.2.3. Determinación de proteína

Se ha utilizado el sistema comercial que emplea el reactivo de Biorad. Este método se empleó para determinar la concentración de proteína en células enteras y en extractos libres de células. En 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 N. Agitar en vórtex y hervir durante 20 minutos. Centrifugar a 12.000 r.p.m. durante 5 minutos para eliminar los restos celulares. Tomar alícuotas de 25-50 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 (Biorad).

4.- Agitar en vórtex e incubar entre 2 y 60 minutos. La concentración de proteína se calcula después de registrar los valores de absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 595 nm 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 bovina (Sigma).

2.2.4. Detección de óxido nítrico (NO)

El NO se determinó amperométricamente (Zhang y Broderick, 2000) usando un electrodo específico de NO modelo Apollo 4000[®] (World Precision Instruments, Inc., USA), utilizando el programa informático suministrado por el fabricante, ajustando la intensidad de la corriente a pA y el rango de actividad a 100 nA.

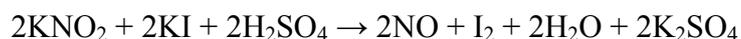
2.2.4.1. Preparación del sistema electrodo/funda de la membrana

1.- Sumergir el electrodo y la funda de la membrana en agua destilada durante, al menos, 15 minutos.

- 3.- Adicionar 100 µl de solución de electrolito® (World Precision Instruments, Inc., USA) al interior de la funda de la membrana.
- 4.- Enroscar suavemente la funda de la membrana al electrodo y dejar el sistema sumergido en agua destilada.

2.2.4.2. Calibración del sistema

La calibración se realizó determinando el NO producido mediante la reacción:



Para ello:

- 1.- Introducir el sistema electrodo/funda de la membrana en un recipiente con 10 ml de la solución I, en agitación. Esperar hasta que se estabilice la línea base de la señal.
 - 2.- Adicionar, de manera independiente, 50, 100 y 200 µl de la solución II, esperando cada vez a que se estabilice la señal.
 - 3.- Anotar los incrementos de la señal y calcular la curva patrón correspondiente. Los valores se expresan en nmoles de NO producidos.
-

Solución I: H₂SO₄ 0,1M; KI 0,1M.

Solución II: NaNO₂ 50 µl

Las soluciones I y II deben estar a temperatura ambiente.

2.2.4.3. Determinación de NO

- 1.- Centrifugar (10.000 r.p.m., 10 minutos, 4 °C) 125 ml de cultivo de *B. japonicum* (DO₆₀₀ 0.2). Lavar dos veces.
2. Resuspender las células en 500 µl de medio YEM
- 2.- Adicionar 100 µl de células y cerrar la cámara de anaerobiosis. Mantener la suspensión celular en agitación. Esperar hasta que la señal se haya estabilizado y el oxígeno se haya consumido (unos 5 minutos).
- 3.- Adicionar 90 µl de succinato sódico 1M con una jeringa.
- 4.- Adicionar 30 µl de NaNO₂ 100 mM con una jeringa.

- 5.-Anotar el incremento de la señal y calcular los nanomoles de NO producidos mediante interpolación en la recta patrón.
6. Expresar la producción de NO en nanomoles de NO producidos/mg de proteína x minuto.

2.3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

2.3.1. Obtención de ADN plasmídico de *E. coli* (“minipreps”).

2.3.1.1. Método de Rusconi

- 1.- Inocular 3 ml de medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes. Incubar a 37 °C durante 12-15 h. Se debe incluir un cultivo de la cepa de *E. coli* portadora del vector utilizado para emplearlo como control.
- 2.- Centrifugar 200-300 µl (dependiendo del número de copias del vector utilizado) en tubos eppendorf (12.000 r.p.m., 3 minutos). Tirar el sobrenadante.
- 3.- Resuspender el sobrenadante en 20 µl de solución de Rusconi. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
- 4.- Adicionar 10 µl de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Agitar con vórtex y centrifugar (12.000 r.p.m., 2 minutos).
- 5.- Tomar el sobrenadante y cargar directamente en un gel de agarosa.

- Solución de Rusconi: Tris-HCl 50 mM; EDTA 25 mM; glicerol 10% (v/v); 100 µg/ml RNAsa; 0,5 mg lisozima y una punta de espátula de azul de bromofenol.

2.3.1.2. Método de la lisis alcalina

Se ha utilizado el protocolo descrito en Sambrook et al. (1989). Para ello:

- 1.- Inocular 3 ml de medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes e incubar a 37 °C durante 12-15 h.
- 2.- Centrifugar las células en tubos de microfuga (12.000 r.p.m., 3 minutos). Tirar el sobrenadante. Eliminar los restos de sobrenadante mediante el empleo de micropuntas.
- 3.- Resuspender el sedimento en 250 µl de solución I.
- 4.- Adicionar inmediatamente 250 µl de solución II. Mezclar suavemente por inversión manual de los tubos. Dejar 5 minutos a temperatura ambiente.
- 5.- Adicionar 350 µl de solución III. Mezclar por inversión manual varias veces y centrifugar (12.000 r.p.m., 15 minutos).

- 6.- Recoger el sobrenadante y adicionar 1 volumen de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Agitar con vórtex y centrifugar (12.000 r.p.m., 5 minutos).
- 7.- Recoger en tubos nuevos la fase superior acuosa que contiene el ADN (se diferencia de la fase inferior por ser ésta de color amarilla debido a la 8-hidroxiquinoleína de la mezcla fenólica).
- 8.- Adicionar 1,5 volúmenes de etanol al 100% preenfriado a -20 °C. Dejar 15 minutos en hielo/agua. Centrifugar (12.000 r.p.m., 15 minutos).
- 9.- Eliminar el sobrenadante. Adicionar etanol al 70% y centrifugar (12.000 r.p.m., 2 minutos). Eliminar el sobrenadante.
- 10.- Secar el precipitado al vacío.
- 11.- Resuspender el precipitado en 20 µl de tampón TE.

- Solución I: Tris-HCl 50 mM; EDTA 10 mM; 100 µg/ml RNAsa A; pH 8.

- Solución II: NaOH 0,2 M; SDS 1%.

- Solución III: Acetato potásico 3 M; pH 5,5.

- Tampón TE: Tris 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0.

- RNAsa A: 100 µg/ml en NaCl 15 mM y Tris-HCl 10 mM, pH 7,5. Antes de su utilización, la solución concentrada de RNAsa se calentó a 100 °C durante 15 minutos, se dejó enfriar lentamente a temperatura ambiente, se prepararon alícuotas y se almacenaron a -20 °C.

- Mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (v/v) (25:24:1): Se prepara a partir de fenol al 100% que contenía 8-hidroxiquinoleína al 0,1% en Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0). Se deja en agitación a oscuridad durante una noche. A continuación se prepara la mezcla con cloroformo y alcohol isoamílico en la proporción indicada.

2.3.1.3. Método STET

Se ha utilizado el protocolo descrito en Sambrook et al. (1989). Para ello:

- 1.- Inocular 3 ml de medio LB líquido suplementado con los antibióticos adecuados, e incubar en agitación durante 12-14 h a 37 °C.
- 2.- Centrifugar las células en tubos de microfuga (12.000 r.p.m., 3 minutos). Eliminar el sobrenadante.
- 3.- Adicionar 350 µl de solución STET y resuspender el precipitado con vórtex. Adicionar 5 µl de lisozima (10 mg/ml).

- 4.- Colocar los tubos en agua hirviendo durante 40 s y centrifugar (12.000 r.p.m., 15 minutos). Eliminar el precipitado, que es viscoso, con un palillo higiénico.
- 5.- Adicionar 40 µl de acetato potásico 3M pH 5,5 y dos volúmenes de isopropanol. Mantener los tubos a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- 6.- Centrifugar (12.000 r.p.m., 15 minutos). Eliminar el sobrenadante.
- 7.- Adicionar etanol al 70% y centrifugar (12.000 r.p.m., 2 minutos). Eliminar el sobrenadante. Secar el precipitado al vacío.
- 8.- Resuspender el precipitado en 20 µl de tampón TE.

- STET: Sacarosa, 8%; Tritón X-100, 0,5%; EDTA, 50 mM pH 8; Tris-HCl, 50 mM, pH 8.

2.3.1.4. Método TEN

1. Inocular 3 ml de medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes e incubar a 37 °C durante 12-15 h.
2. Centrifugar las células en tubos de microfuga (12.000 rpm, 3 min).
3. Tirar el sobrenadante, dejando aproximadamente 50 µl.
4. Resuspender las células en el sobrenadante restante.
5. Adicionar 300 µl de tampón TENS.
6. Adicionar 150 µl de acetato sódico 3M pH 5,2. Agitar en vortex 5 s.
7. Centrifugar 5 minutos a 12.000 rpm.
8. Eliminar el sedimento retirándolo con un palillo de dientes.
9. Llenar el tubo con etanol al 100 %. Mezclar por inversión 10 veces.
10. Centrifugar 2 minutos a 12.000 r.p.m. Eliminar el sobrenadante.
11. Lavar con 200 µl de etanol 70 %.
12. Eliminar el etanol. Secar 10 minutos el pellet al vacío, y resuspender en 20 µl de TE.

Solución TENS: NaOH 0,1 N, SDS 0,5 % en TE.

2.3.2. Obtención de ADN plasmídico de *B. japonicum*

Se llevó a cabo para comprobar la presencia de plásmidos en células transformadas de *B. japonicum*. Para ello:

- 1.- Inocular 20 ml de medio PSY suplementado con los antibióticos correspondientes con la cepa adecuada de *B. japonicum*. Incubar a 30 °C durante 4-5 días.
- 2.- Centrifugar 5 ml (12.000 r.p.m., 3 minutos) en tubos de microfuga. Eliminar el sobrenadante.
3. Recoger el sedimento en 500 µl de NaCl 1M adicionado de Sarcosil al 1%. Lavar 2 veces con NaCl 1M.
- 4.- Resuspender el sedimento en 200 µl de solución MAXI.
- 5.- Adicionar 400 µl de solución de lisis (NaOH 0,2 M; SDS 1%). Mezclar por inversión manual de los tubos. Esperar 10-15 minutos hasta que se observe una lisis adecuada.
- 6.- Adicionar 200 µl de acetato sódico 3 M, pH 4,8. Mezclar por inversión, mantener en hielo 15 minutos.
- 7.- Centrifugar (12.000 r.p.m., 3 minutos). Recoger el sobrenadante en un tubo nuevo y adicionar un volumen de isopropanol.
- 7.- Centrifugar (12.000 r.p.m., 15 minutos). Eliminar el sobrenadante.
- 8.- Adicionar etanol al 70% y centrifugar (12.000 r.p.m., 2 minutos). Eliminar el sobrenadante. Secar el precipitado al vacío.
- 9.- Resuspender el precipitado en 20 µl de tampón TE.

Tras el aislamiento del ADN plasmídico, debido al bajo número de copias de los plásmidos en *B. japonicum*, es difícil, por regla general, detectarlo en geles de agarosa. Por ello, el ADN obtenido se empleó para transformar células competentes de *E. coli* DH5α, a partir de las cuales se obtuvo mayor cantidad de ADN plasmídico.

Solución MAXI: Tris-HCl 25 mM, pH 8; glucosa, 50 mM; EDTA 10 mM.

2.3.3. Obtención de ADN total

2.3.3.1. Método tradicional

Para la obtención del ADN total se empleó la siguiente metodología:

- 1.- Cultivo de 10 ml en PSY para *B. japonicum*
- 2.- Centrifugar (12.000 r.p.m., 3 minutos) en tubos de microfuga.
- 3.- Lavar con 250 µl de Sarcosyl 0,1% en TE.
- 4.- Resuspender en 345 µl de TE.
- 5.- Adicionar 5 µl de pronasa predigerida, e incubar a 37 °C durante 2 h.
- 6.- Adicionar 50 µl de SDS 5% en TE. Mezclar por inversión suavemente e incubar durante 1 hora a 37 °C.
- 7.- Adicionar 120 µl de NaCl 5 M en TE. Mezclar nuevamente por inversión e incubar en hielo durante 1 h. Centrifugar (12.000 r.p.m., 5 minutos) y pasar el sobrenadante a un nuevo tubo.
- 8.- Adicionar 1 volumen de fenol a pH 8 al sobrenadante y mezclar manualmente. Centrifugar (12.000 r.p.m., 5 minutos) y pasar el sobrenadante a un nuevo tubo.
- 9.- Adicionar al sobrenadante 75 µl de acetato sódico 3 M, pH 5,2.
- 10.- Adicionar 1 volumen de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Centrifugar (12.000 r.p.m., 5 minutos) y pasar el sobrenadante a un nuevo tubo. Repetir este paso dos veces más.
- 11.- Adicionar 2 volúmenes de isopropanol. Dejar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Centrifugar (12.000 r.p.m., 10 minutos). Eliminar el sobrenadante y lavar con etanol al 70%. Secar las muestras al vacío.
- 12.- Resuspender el ADN en 20 µl de TE.

- Pronasa: Disolver 50 µg/ml e incubar a 37 °C durante 2 h. Preparar alícuotas de 100 µl y congelar a -20 °C.

2.3.3.2. Métodos comerciales

Se ha utilizado el método comercial Realpure[®] (Real), siguiendo las instrucciones del fabricante.

- 1.- Cultivar 3 ml de *B. japonicum*
- 2.- Centrifugar (12.000 r.p.m., 3 min) en tubos eppendorf de 1,5 ml. Eliminar el sobrenadante.

- 3.- Pesar el pellet (20-40 mg) y resuspenderlo en 500 μ l de tampón de extracción[®] y 100 μ l de solución de PVP[®].
- 4.- Adicionar 60 μ l de solución de lisis[®] y 3 μ l de RNasaA. Agitar en vortex, incubar la muestra a 37 °C durante 30 minutos y enfriarla a temperatura ambiente.
- 5.- Adicionar 250 μ l de tampón de precipitación de proteínas[®] y agitar en vortex 30 s.
- 6.- Incubar a -20 °C durante 10 minutos.
- 7.- Centrifugar a 12.000 r.p.m. durante 5 minutos. Si quedan partículas en suspensión volver a centrifugar.
- 8.- Pasar el sobrenadante a un tubo que contenga 60 μ l de isopropanol. Mezclar por inversión varias veces.
- 9.- Centrifugar a 12.000 r.p.m. durante 3 min. Descartar sobrenadante.
- 10.- Adicionar 200 μ l de etanol al 70 %. Centrifugar a 12.000 r.p.m. durante 3 minutos. Eliminar el sobrenadante. Secar el pellet mediante vacío o a temperatura ambiente.
- 11.- Adicionar 50 μ l de solución de hidratación[®] e incubar a 65 °C durante 30 minutos.
- 12.- Centrifugar el ADN nuevamente (12.000 r.p.m., 3 minutos).
13. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.

2.3.4. Determinación de la concentración de ADN y ARN

Se ha empleado el método espectrofotométrico descrito en Sambrook et al. (1989). Las absorbancias A_{260} y A_{280} de las soluciones de ADN en agua o en TE se determinaron utilizando agua o TE como blanco, respectivamente. La concentración se calculó respecto a los valores estándar de $DO_{260} = 1$ para soluciones con 50 μ g/ml de ADN de cadena doble y para soluciones con 40 μ g/ml de ARN total. La relación DO_{260}/DO_{280} se empleó para estimar la pureza de la preparación, considerándose valores inferiores a 1,8 como indicadores de contaminación por proteínas o fenol. También es posible determinar la concentración de ADN mediante electroforesis de las muestras en geles de agarosa (apartado 2.3.6.1), y comparación de la intensidad de la fluorescencia con la de marcadores de ADN de concentración conocida (apartado 2.3.6.3).

2.3.5. Digestión total de ADN con endonucleasas de restricción

La digestión total de ADN con enzimas de restricción se llevó a cabo en las condiciones óptimas para cada enzima, siguiendo las indicaciones, en cuanto a temperatura y tampón, recomendadas por el proveedor (Roche®).

Las digestiones con más de una enzima de restricción se realizaron simultáneamente cuando las enzimas requerían el mismo tampón y temperatura. En caso contrario, se digirió primero con la enzima que requería el tampón de menor fuerza iónica, adicionando posteriormente el tampón y enzima para la segunda digestión. Cuando esto no fue posible, se llevó a cabo, primero, la digestión con una enzima. A continuación, se adicionó agua bidestilada estéril hasta un volumen mínimo de 300 µl y 1 volumen de mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), continuando el proceso conforme se indica en los pasos 6 a 10 del apartado 2.3.1.2, con la diferencia de que una vez realizada la fenolización se adicionó al sobrenadante un 10% (v/v) de una solución de LiCl 4M para precipitar el ADN. Se resuspendió en 20 µl de agua bidestilada y se llevó a cabo la digestión con la segunda enzima.

2.3.6. Identificación de fragmentos de restricción mediante electroforesis en geles de agarosa

2.3.6.1. Electroforesis de ADN

La separación de fragmentos de restricción se llevó a cabo mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa preparada en TBE 1x (Tris 50 mM; EDTA-Na₂ 2,5 mM; BO₃H₂ 50 mM; pH 8,2). El tampón de electroforesis fue TBE 1x y la concentración de agarosa del 0,7 % ó del 1%, según el tamaño de los fragmentos a resolver. El voltaje usual de trabajo ha sido de 100 V en cubetas de electroforesis de tamaño mediano y de 80 V en cubetas de electroforesis de tamaño pequeño. Como tampón de carga se ha utilizado una mezcla de sacarosa al 40% y azul de bromofenol al 0,25%, ambos preparados en agua bidestilada. El tampón de carga se empleó en proporción 1/5 con la muestra de ADN.

2.3.6.2. Revelado de geles y fotografía

Las muestras de ADN presentes en los geles de agarosa se visualizaron tras la inmersión de los geles en agua destilada que contenía 4-5 gotas de una solución de bromuro de etidio (10 mg/ml), durante 15-20 minutos. Posteriormente se observaron con luz UV (260 nm) en un transiluminador. Las fotografías de los geles se realizaron con un equipo de análisis de imagen (Biorad) que utiliza una videocámara acoplada a un sistema de impresión de imágenes (Gelprinter vm509).

2.3.6.3. Estimación del tamaño molecular de fragmentos de restricción

La determinación del tamaño molecular de los fragmentos de restricción se ha efectuado teniendo en cuenta la relación logarítmica entre el tamaño molecular relativo (M_r) de las moléculas marcadoras de ADN y la movilidad relativa (R_f) de las mismas en el gel de agarosa. Como marcadores de tamaño molecular se han utilizado los fragmentos de restricción del ADN del fago λ resultantes de la digestión con endonucleasa *HindIII* (Marcador II) o *EcoRI/HindIII* (Marcador III).

2.3.7. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Para la purificación de fragmentos de ADN de los geles de agarosa se ha utilizado el método comercial Qiaex-II[®] (Qiagen), de la manera descrita por el fabricante:

- 1.- Extraer la banda de ADN del gel de agarosa, colocarla en un tubo de microfuga y pesarla.
- 2.- Adicionar 3 volúmenes, respecto al peso de la agarosa, de tampón QX1[®].
- 3.- Agitar la resina Qiaex II[®] en vórtex, y adicionarla a la agarosa. El volumen a adicionar dependerá de la concentración de ADN en el gel, calculado conforme a las instrucciones del fabricante.
4. Incubar a 50 °C, hasta conseguir la disolución de la agarosa (aprox. 10 minutos), agitando el tubo por inversión manual cada 2 minutos.
- 5.- Centrifugar (12.000 r.p.m., 30 s), eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado, que contiene el ADN adherido a la matriz, en 0,5 ml de tampón QX1[®].

6.- Lavar dos veces el precipitado con 0,5 ml de tampón PE[®]. Secar a temperatura ambiente.

7.- Resuspender el precipitado en 20 µl de tampón TE y calentar a 50 °C durante 10 minutos.

8.- Eliminar la resina mediante centrifugación (12.000 r.p.m., 30 s). Recoger el sobrenadante con cuidado y pasarlo a un nuevo tubo eppendorf.

Los pasos 7 y 8 se pueden repetir para eluir el ADN que pudiera quedar retenido en la resina.

2.3.8. Ligación de fragmentos de restricción en vectores de clonación

2.3.8.1. Ligación en vectores de clonación

Se ha utilizado el siguiente protocolo:

1.- En un tubo eppendorf, adicionar:

x µl de vector*

y µl de inserto*

1 µl de ADN ligasa del fago T4 (1 unidad/µl)

2 µl de tampón de la ADN ligasa (concentrado 10x)

H₂O bidestilada, completar hasta 20 µl.

2.- Mezclar suavemente, centrifugar (1 pulso), e incubar a temperatura ambiente durante 3 h. También se puede dejar a 12-16 °C durante toda la noche.

*La proporción vector:inserto, expresada en moles, debe ser, como mínimo, 1:3.

La cantidad x + y debe ser, al menos, de 200 ng.

2.3.8.2. Defosforilación de vectores de clonación

Para evitar la posible religación y la ligación entre dos moléculas del vector, el mismo se puede defosforilar mediante tratamiento con fosfatasa alcalina según el protocolo que se detalla continuación:

- 1.- Digerir el vector con la enzima de restricción adecuada.
- 2.- En un tubo eppendorf, adicionar:
 - x µl de vector digerido con las enzimas adecuadas
 - 10 µl de tampón 10x de la fosfatasa alcalina
 - 3 µl de fosfatasa alcalina (1 U/µl)
 - H₂O bidestilada, completar hasta 100 µl
- 3.- Mezclar suavemente, centrifugar (1 pulso) e incubar a 37 °C durante 30 minutos.
- 4.- Precipitar el ADN con LiCl 4M, como se indica en el apartado 2.3.5.
- 5.- Resuspender en 20 µl de tampón TE.

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

2.3.9.1. Preparación de células competentes de *E. coli* con RbCl

Se ha realizado según la técnica descrita por Hanahan (1983):

- 1.- Cultivar *E. coli* (DH5α, S17.1, etc) en 5 ml de medio LB durante 12-15 h.
- 2.- Inocular 4 ml en 100 ml de LB suplementado con 10 mM de MgSO₄.
- 3.- Incubar a 37 °C hasta que el cultivo alcance la fase logarítmica de crecimiento (DO₆₀₀ de 0,4-0,6).

A partir de este momento, las células y soluciones deben mantenerse en hielo.

- 4.- Centrifugar (centrífuga preparativa Sorvall, 8.000 r.p.m., 10 minutos, 4 °C) en tubos estériles de 40 ml. Eliminar el sobrenadante.
- 5.- Resuspender suavemente el precipitado en 32 ml de solución RF1 estéril y preenfriada a 4 °C. Incubar en hielo durante 15 minutos.
- 6.- Centrifugar a 8.000 r.p.m. durante 10 minutos. Eliminar el sobrenadante.
- 7.- Resuspender en 4 ml de solución RF2 preenfriada a 4 °C
- 8.- Repartir en alícuotas de 100 µl en tubos eppendorf preenfriados a 4 °C.
- 9.- Guardar a -70 °C.

Solución RF1 (por 100 ml): 1,2 g de RbCl; 0,99 g de Mn Cl₂ x 4 H₂O; 0,294 g de acetato potásico; 0,15 g de CaCl₂ x H₂O; 11,9 ml de glicerol ; agua destilada hasta 100 ml. Ajustar el pH a 5,8 con una solución de ácido acético 0,2 M.

Solución RF2 (por 50 ml): 0,1046 g de ácido morfolino propanosulfónico (MOPS); 0,06 g de RbCl; 0,55 g de CaCl₂ x H₂O; 5,95 ml de glicerol ; agua destilada hasta 50 ml. Ajustar el pH a 6,8 con una solución diluída de NaOH.

Ambas soluciones se esterilizan mediante filtración y se guardan en oscuridad a 4 °C.

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

Para transformar células competentes con ADN plasmídico se siguió la técnica descrita por Rodríguez y Tait (1983), modificada como se indica a continuación:

- 1.- Descongelar, manteniéndolas en hielo, alícuotas de 100 µl de células competentes.
- 2.- Adicionar 50-100 ng del ADN que se pretenda emplear para transformar. Mezclar mediante agitación suave e incubar en hielo durante 45 minutos.
- 3.- Calentar (choque térmico) a 42 °C durante 90-120 s. Dejar en hielo de 2 a 5 minutos.
- 4.- Adicionar medio LB hasta 1 ml. Incubar a 37 °C durante 1 h, agitando suavemente cada 20 minutos. Preparar mientras tanto placas Petri con medio LB suplementado con los correspondientes antibióticos*.
- 5.- Sembrar las placas con las células transformadas e incubar a 37 °C.

*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) 20 mg/ml de dimetilformamida y 4 µl de 1-isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), 200 mg/ml.

2.3.10. Transferencia de ADN a *B. japonicum* mediante conjugación

La transferencia de ADN a cepas de *B. japonicum* se realizó mediante conjugación biparental utilizando *E. coli* S17.1 como cepa donadora.

- 1.- Preparar cultivos de la cepa donadora en fase logarítmica de crecimiento y de la cepa receptora en fase exponencial tardía.
- 2.- Centrifugar 5 ml de receptor (12.000 r.p.m., 3 minutos).
3. Sobre el sedimento de la cepa receptora, centrifugar 1 ml de la cepa donadora. Eliminar el sobrenadante. Lavar 2-3 veces con 1 ml de medio PSY.
- 4.- Resuspender el sedimento en 100 µl de PSY y adicionarlo, en forma de gota, sobre una placa Petri con medio PSY. Dejar secar e incubar 48 h a 30 °C.

- 5.- Recoger la mezcla de conjugación con 1 ml de medio Bergersen.
- 6.- Sembrar 50/100 μ l en placas Petri con medio Bergersen suplementado con los antibióticos adecuados para la selección de los transconjugantes. Incubar a 30 °C.

2.3.11. Experimentos de hibridación ADN-ADN

2.3.11.1. Transferencia de ADN a filtros de nylon (método tradicional)

Se llevó a cabo utilizando la técnica de Southern (1975). Para ello:

- 1.- Electroforesis en agarosa del ADN a transferir.
 - 2.- Tinción del gel con bromuro de etidio y fotografía del mismo.
 - 3.- Depurinización ácida del ADN: Sumergir el gel en HCl 0,25 N hasta viraje del azul de bromofenol a amarillo (10-15 minutos). Lavar con agua destilada.
 - 4.- Desnaturalización alcalina del ADN: Sumergir el gel durante 15 minutos en una solución de NaOH 0,5 N adicionada de 1,5 M NaCl. Repetir el proceso. Lavar el gel con agua destilada.
 - 5.- Neutralización del ADN: Sumergir el gel en Tris-HCl 0,5 M (pH 7,4) adicionado de NaCl 1,5 M durante 20 minutos. Lavar con agua bidestilada.
 - 6.- Humedecer una membrana de nylon (Roche®), cargada positivamente, en SSC 10x durante 5 minutos. El tamaño de la membrana debe ser igual al del gel. Recortar también cuatro piezas de papel Whatmann 3MM del mismo tamaño y saturarlas en tampón SSC 10x.
 - 7.- Sobre una superficie regular, habitualmente un cristal, formar una unidad de transferencia compuesta, de abajo hacia arriba, por una pieza de papel Whatmann 3MM, cuyos extremos se sumergen, a modo de mecha, en un reservorio de tampón de transferencia SSC 10x, el gel, el filtro de nylon y las tres piezas restantes de papel Whatmann 3MM. Colocar un marco de plástico que bordeé todo el sistema y, a continuación, cubrir con servilletas de papel. Sobre las servilletas se colocó una placa de vidrio y, sobre ésta, un peso uniforme de 1 kg. Comprobar que el sistema está perfectamente horizontal y dejar transferir toda la noche. Finalizado el proceso, lavar la membrana con SSC 2x durante 5 minutos. Finalmente, fijar el ADN a la membrana mediante calentamiento, en vacío, a 120 °C, durante 30 minutos.
-

- SSC 20x: 175,3 g de NaCl; 88,2 g de citrato sódico y 800 ml de H₂O destilada. Ajustar el pH a 7,0 y completar hasta 1 litro.

2.3.11.2. Transferencia de ADN a filtros de nylon (método del vacío)

Este método tiene la ventaja de ser más rápido que el anterior, ya que la transferencia se realiza en aproximadamente unas dos horas. Para ello:

- 1.- Electroforesis del ADN a transferir.
- 2.- Lavar el gel con 0,25 N HCl durante 15 minutos para llevar a cabo la depurinización ácida del ADN.
- 3.- Lavar la membrana de nylon y una lámina de papel de filtro del mismo tamaño al de la membrana, primero, con agua bidestilada durante 5 minutos y, después, con una solución de NaOH 0,5 N/NaCl 0,6 M. Los tamaños de la membrana y del papel debe ser iguales y aproximadamente unos 5 mm mayores en anchura y largo que el tamaño del gel.
- 4.- Preparar el sistema de vacío siguiendo las instrucciones del proveedor:
 - Lavar el filtro del sistema en una cubeta con agua bidestilada y colocarlo sobre la unidad de transferencia.
 - Colocar, primero, el papel humedecido sobre el filtro del sistema y, sobre éste, la membrana. Por encima de la membrana se colocó una lámina de plástico provista de una abertura de tamaño similar, o ligeramente inferior, al del gel.
 - Colocar el gel de agarosa sobre la abertura de la lámina de plástico.
 - Conectar la bomba de vacío a una presión constante de 55 milibares. Hacer el vacío lentamente, comprobando que no hay escapes, al mismo tiempo que se adiciona sobre el gel una solución de NaOH 0,5 N/NaCl 0,6 M hasta cubrirlo por completo. Mantener el vacío durante 60-90 minutos.
- 5.- Desconectar el sistema y retirar la membrana de nylon. Lavarla con SSC 2x durante 5 minutos.
6. - Secar la membrana sobre papel Whatman. Una vez seca, fijar el ADN a 120 °C, en vacío, durante 20-30 minutos.

- En lugar de depurinación, se puede romper el ADN mediante tratamiento con luz UV durante 10 minutos.

- Asimismo es posible llevar a cabo la fijación del ADN a las membranas de nylon mediante tratamiento con luz UV durante 3 minutos por la cara de la membrana en donde se encuentra el ADN.

2.3.11.3. Marcaje de sondas no radiactivas

El marcaje de sondas se ha realizado empleando el sistema no radiactivo comercializado por Roche®, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Esta técnica consiste, en esencia, en la síntesis parcial de ADN a partir del ADN molde que se quiere usar como sonda. Para ello, se utiliza el ADN molde desnaturizado por calor (100 °C, 10 minutos) y enfriado en agua/hielo durante 10 minutos, una mezcla de hexanucleótidos, el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* y una mezcla de dNTPs que incluye dUTP marcado con digoxigenina, nucleótido que se puede detectar mediante una reacción inmunológica específica de la manera que se describe en el apartado 2.3.11.4.

La cantidad de ADN molde que se empleó fue como mínimo de 100 ng, en un volumen final de 20 µl. El tiempo de incubación fue de unas 20 h, y la temperatura de 37 °C. En todos los casos, se comprobó la efectividad del marcaje, que se llevó a cabo de la manera recomendada por el proveedor.

2.3.11.4. Hibridación ADN-ADN con sondas no radiactivas

El proceso de hibridación se efectuó de la manera que se describe a continuación, cuando se utilizó ADN homólogo como sonda:

1.- Prehibridación: Mantener la membrana de nylon inmersa en 20 ml de solución de prehibridación durante 1 h, a 42 °C.

2.- Hibridación: Tras eliminar la solución de prehibridación, adicionar nueva solución de prehibridación con el ADN sonda desnaturizado por calor (100 °C, 10 minutos) y enfriado en agua/hielo durante otros 10 minutos, e incubar, al menos, durante 6 h.

3.- Lavar:

2 x 5 minutos (100 ml) de SSC 2x; SDS 0,1% a temperatura ambiente.

2 x 15 minutos (100 ml) de SSC 0,1x; SDS 0,1% a 68 °C.

1 x 5 minutos en Tampón I a temperatura ambiente.

4.- Incubar 30 minutos en Tampón II a temperatura ambiente. Eliminar el tampón.

- 5.- Detección inmunológica: Incubar a temperatura ambiente, durante 30 minutos, con anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina diluidos 1:10.000 en tampón II. Guardar hasta finalizar el experimento por si fuera necesario su uso de nuevo.
- 6.- Lavar (2 x 15 minutos) con tampón de lavado (tampón I + Tween 20 al 0,1%).
- 7.- Incubar la membrana 5 minutos en tampón III. Eliminar el tampón.
- 8.- Incubar con 10 ml de CSPD[®] (1:100 en tampón III) durante 5 minutos, en oscuridad, a temperatura ambiente.
- 9.- Dejar escurrir la membrana sobre papel Whatmann 3MM, sin que se seque. Colocarla en una bolsa de plástico, sellarla y ponerla en contacto con una película autorradiográfica (Kodak X-Omat). El tiempo de exposición (30 minutos a 6 h) varía en función de la concentración de ADN, la homología de la sonda y la eficiencia del marcaje.
- 10.- Para el revelado de la películas se emplearon revelador y fijador TETENAL[®] a las diluciones y tiempos recomendados por el fabricante.

-
- Solución de prehibridación: SSC 5x, formamida 50%, reactivo de bloqueo 2% (p/v); N-lauryl-sarcosina 0,1% y SDS 0,02%.
 - Tampón I: Acido maleico 0,1 M; NaCl 0,15 M. Ajustar a pH 7,5 con NaOH sólido.
 - Tampón II: Tampón I; reactivo de bloqueo 1%.
 - Tampón III: Tris-HCl 100 mM (pH 9,5); NaCl 100 mM
 - CSPD[®]: 3-(4-metoxipiro(1,2-dioxetano-3,2'-(5'-cloro)tricyclo(3.3.1.1)decan)-4-il) fenil fosfato disódico.

2.3.12. Secuenciación de ADN

2.3.12.1. Aislamiento de ADN para secuenciación

La obtención de ADN plasmídico para secuenciación se realizó a partir de ADN clonado en *E. coli* utilizando el producto comercial Qiaprep[®] Spin Plasmid (Qiagen), de la manera recomendada por el fabricante:

- 1.- Inocular la cepa correspondiente de *E. coli* en 3 ml de medio LB suplementado con los antibióticos adecuados.

- 2.- Centrifugar (12.000 r.p.m., 3 minutos) las células en tubos de microfuga. Eliminar el sobrenadante.
- 3.- Resuspender el sedimento en 250 µl del reactivo P1.
- 4.- Adicionar inmediatamente 250 µl del reactivo P2. Mezclar suavemente por inversión. Dejar 5 minutos, como máximo, a temperatura ambiente.
- 5.- Adicionar 350 µl del reactivo N3. Mezclar por inversión varias veces. Inmediatamente centrifugar a 12.000 r.p.m. durante 15 minutos.
- 6.- Aplicar el sobrenadante sobre una columna Qiaprep. Centrifugar durante 1 minuto para retener el ADN plasmídico. Eliminar el eluido.
- 7.- Lavar con 750 µl de tampón PB. Centrifugar durante 1 minuto. Eliminar el eluido.
- 8.- Adicionar 750 µl de tampón PE y centrifugar 1 minuto a 12.000 r.p.m. Eliminar el eluido. Repetir esta centrifugación una vez más para eliminar el exceso de tampón.
- 9.- Finalmente, colocar la columna en un tubo de 1,5 ml, adicionar 50 µl de agua bidestilada, mantener 1 minuto, y centrifugar (12.000 r.p.m., 1 minuto) para recuperar el ADN (aproximadamente unos 25 µg).

- P1: Tris-HCl, 50 mM; EDTA, 10 mM; 100 µg/ml RNAsa A; pH 8,0.

- P2: NaOH 0,2 M; SDS 1%.

- N3: Acetato potásico 3 M; pH 5,5.

2.3.12.2. Mezcla de reacción y reacción de secuenciación

La mezcla de reacción, preparada en un tubo eppendorf, contenía ADN (0,4-1 µg), el cebador específico (6,4 picomoles) y agua bidestilada hasta un volumen final de 12 µl. Las reacciones de secuenciación, carga de las muestras en el gel de secuenciación y la lectura de los geles se realizó en el Servicio de Secuenciación del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC, Granada. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en un termociclador Perkin Elmer 9.600, utilizando el producto comercial Abi Prism (Perkin-Elmer) y la polimerasa Amplitaq FS. La determinación de la secuencia se realizó mediante el sistema de terminadores marcados con fluorocromos.

En todos los casos se han secuenciado las dos cadenas de ADN. Los cebadores empleados han sido, entre otros, los denominados universal y reverso, correspondientes a las secuencias del fago M13 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3' y 5'-

AACAGCTATGACCATG-3', respectivamente, presentes en los vectores de tipo pBS KS(+) y pCR4-TOPO, etc. Para la secuenciación de los productos clonados en el vector de expresión pET3a(+) se han usado los cebadores T7-forward 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' y T7-reverse, 5'GCTAGTTATTGCTCAGCG-3'. La síntesis de oligonucleótidos se llevó a cabo en el Servicio de Síntesis de Oligonucleótidos del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC, Granada, utilizando un aparato Oligo 1000 DNA Synthesizer.

2.3.12.3. Análisis informático de secuencias de ADN y proteínas

Los análisis de las secuencias de ADN y de proteínas, búsqueda de sitios de restricción, localización de posibles marcos abiertos de lectura (ORFs), etc., se han realizado a través de Internet utilizando los programas del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/>), Webcutter (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>), y Online Analysis Tools (<http://molbiol-tools.ca/>). Las secuencias de ADN se manejaron con los programas DS Gene (Accelrys) y Chromas (C. McCarthy, School of Health Sciences, Griffith University, Queensland). Para el diseño de cebadores se utilizaron los programas Primer3 (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge) y Oligotech (Oligos Etc Inc.). Para la predicción de topología de proteínas se utilizaron las herramientas proporcionadas en el servidor ExPaSy (<http://www.expasy.org/>) y los programas 3D-Jigsaw (Bates et al. 2001), y RASMOL (<http://www.umass.edu/microbio/rasmol/>). También se consultó el banco de datos PROSITE a través del servidor ExPaSy (<http://www.expasy.org/prosite/>).

2.3.13. Transcripción *in vitro*

2.3.13.1. Preparación del ADN molde

Como ADN molde se han utilizado fragmentos de 465 y 367 pares de bases (pb) que contienen las cajas de anaerobiosis de los genes *nirK* y *norCBQD*, que se consideran los posibles sitios de unión de la proteína NnrR, clonados en los plásmidos pRJ8822 y pRJ8839, respectivamente.

Como control se utilizó un fragmento de 240 pb del plásmido pRJ9601, que contiene la región promotora del gen *rrn*, que codifica genes del ARNr y ARNt, y su terminador.

Para la construcción del plásmido pRJ8839, se amplificó una región de 367 pb mediante reacción en cadena de la polimerasa, usando los cebadores nor4F y nor4R, en la siguiente mezcla de reacción:

ADN molde: pRJ2499 (50 ng)
 10 µl de tampón PCR (5x)
 25 pmoles de cada cebador¹
 5 µl de MgCl₂ (25 mM)
 5 µl de dimetil sulfóxido
 5 µl dNTPs (2 mM)
 0,2 µl Taq polimerasa (5 U/µl)
 H₂O bidestilada hasta 50 µl

¹Cebadores:

Nombre	Secuencia
nor4F	5'-cgggatcccg ³⁵⁵¹⁴³⁰ GGATCGTCTCGACCTCACAT-3'
nor4R	5'-cgggaattccg ²⁸⁴ AGCCATTGCCAATCCTTTC-3'

Los superíndices indican la posición del nucleótido G de la secuencia del ORF bsr3213 (ver Rhizobase, <http://www.kazusa.or.jp/rhizobase2>) y la del nucleótido A de la secuencia de los genes *norCBQD* (número de acceso AJ132911) (Mesa et al. 2002) de los cebadores nor4F y nor4R, respectivamente. En minúscula se indica la secuencia de las enzimas de restricción, *EcoRI* y *BamHI*, añadidas para favorecer la clonación.

Programa de PCR

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95	5 minutos
35	95	30 s
	58	1 minuto
	72	1 minuto
1	72	10 minutos

Una vez acabada la reacción de PCR, la totalidad de la muestra se cargó en un gel de agarosa y, una vez finalizada la electroforesis, el ADN amplificado se aisló del gel, conforme al apartado 2.3.7.

El producto de PCR, una vez purificado, se digirió con las enzimas *EcoRI* y *BamHI*, y se clonó en el plásmido pRJ9519, cortado a su vez con las mismas enzimas, obteniendo así el plásmido pRJ8839.

El ADN correspondiente a los plásmidos pRJ8822 y pRJ8839 se preparó de la manera siguiente:

- 1.- Tomar 1 µg de ADN y completar el volumen hasta 300 µl con agua DEPC.
- 2.- Adicionar 1 volumen de fenol libre de ARNasas (Biophenol, NE Biolabs). Centrifugar 5 minutos a 5000 r.p.m. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
- 3.- Adicionar 1 volumen de mezcla fenol:cloroformo (1:1). Centrifugar 5 minutos a 5.000 r.p.m. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
- 4.- Adicionar 3 volúmenes de etanol 100 % en agua DEPC
- 5.- Adicionar 1/10 del volumen de sobrenadante de acetato potásico 3M pH 5,2. Mezclar por inversión manual.
- 6.- Enfriar a -20 °C durante 30 minutos.
- 7.- Centrifugar 30 minutos a 12.000 r.p.m. Eliminar el sobrenadante.
- 8.- Adicionar 200 µl de etanol 70 % en agua DEPC. Centrifugar 3 minutos a 12.000 r.p.m. Eliminar el sobrenadante.
- 9.- Secar el ADN al vacío. Resuspender en 20 µl de agua-DEPC.

DEPC: Dietil pirocarbonato.

Para evitar la digestión por ARNasas durante el experimento, el material de vidrio se hornea previamente a 180 °C durante 8 h.

Todas las soluciones han de estar disueltas en agua-DEPC (1:1000).

2.3.13.2. Reacción de transcripción

1.- Mezcla de reacción: En un tubo eppendorf, adicionar:

ADN circular (500 ng/µl)	x,0 µl
Tampón de transcripción <i>in vitro</i> 5x (Fermentas)	4,0 µl
UTP α- ³³ P (10 µCi/µl)	1,5 µl
Inhibidor de ARNasa (40 U/µl) (Fermentas)	0,5 µl
NTP (10 mM)	2,0 µl
ARN polimerasa de <i>B. japonicum</i> ¹ (100 nM)	3,0 µl

NnrR purificada ²		x,0 µl
H ₂ O DEPC	completar hasta	20 µl

Incubar la mezcla de reacción a 37 °C durante 30 minutos.

¹La ARN polimerasa de *B. japonicum* fue un regalo del Prof. H. Hennecke (Departamento de Microbiología, ETH Zentrum, Zurich, Suiza).

²Se utilizaron concentraciones de proteína purificada de 0,5 y 2 µM.

En algunos casos se añadieron KNO₂ a una concentración final de 0,5 mM, y NO a una concentración de 10 µM, preparada a partir de una solución saturada de NO gas concentrada a 1,9 mM.

- 2.- Parar la reacción colocando las muestras en hielo.
- 3.- Adicionar 180 µl de agua-DEPC, 200 µl de biofenol y 20 µl de acetato potásico 3 M pH 5,2 para precipitar el ARN. Mezclar por inversión manual de los tubos.
- 4.- Centrifugar 5 minutos a 12.000 r.p.m.
- 5.- Tomar el sobrenadante y adicionar 500 µl de etanol 100 %. Enfriar a -20 °C un mínimo de 30 minutos.
- 6.- Centrifugar 30 minutos a 12.000 r.p.m. Eliminar el sobrenadante.
- 6.- Adicionar 200 µl de etanol 70 %. Centrifugar 5 minutos a 12.000 r.p.m. Eliminar el sobrenadante.
- 7.- Secar el ARN al vacío. Resuspender en 6 µl de solución de Sanger.
- 8.- Calentar durante 2 minutos a 90 °C.
- 9.- Cargar los 6 µl de muestra en un gel de secuenciación.

Solución de Sanger: formamida 38 %; EDTA 8 mM, pH 8; azul de bromofenol 0,02 %; xilen cianol 0,02 %.

Para los experimentos de actividad *in vitro* en condiciones de microaerobiosis, todas las soluciones se gasearon con N₂. Las reacciones de transcripción se efectuaron en tubos de vidrio, de 1 ml de capacidad, sellados con un tapón de goma perforable. Toda la manipulación se realizó en una cámara de anaerobiosis (Coy[®] modelo B) gaseadas con una atmósfera inerte compuesta por 95 % N₂:5 % H₂.

2.3.13.3. Marcadores de ADN

1.- Mezcla de reacción: En un tubo eppendorf, adicionar:

ADN lineal (500 ng/ μ l) ¹	X,0 μ l
Tampón de transcripción <i>in vitro</i> 5x (Fermentas)	4.0 μ l
UTP α - ³³ P (10 μ Ci/ μ l)	1.0 μ l
Inhibidor de ARNasa (40 U/ μ l) (Fermentas)	0.5 μ l
Mezcla GTP, ATP, CTP (10 mM)	1.0 μ l
UTP (100 μ M)	4.0 μ l
ARN polimerasa del fago T3 ² (100 nM)	3.0 μ l
H ₂ O-DEPC	completar hasta 20 μ l

Incubar la mezcla de reacción a 37 °C durante 2 h.

¹El ADN corresponde a los plásmidos pRJ9601 y pRJ8817, linearizados tras su digestión con las enzimas *Bst*XI y *Bgl*III, respectivamente.

²La ARN polimerasa de *E. coli* fue un regalo del Prof. H. Hennecke (Departamento de Microbiología, ETH Zentrum, Zurich, Suiza).

2.- Parar la reacción y precipitar el ADN.

3.- Resuspender el ADN en 200 μ l de solución de Sanger

4.- Cargar 3 μ l en el gel de secuenciación.

2.3.14.4. Electroforesis en gel de secuenciación urea/acrilamida

1.- Preparar la mezcla:

Urea	75,0 g
TBE 10x	15,0 ml
Acrilamida:bisacrilamida 40 % (19:1)	22,5 ml
Agua-DEPC	completar hasta 150 ml

2.- Disolver la urea y la acrilamida, en agitación, en un baño a 37 °C. Filtrar la solución y hacer vacío empleado los filtros Stericup (Millipore).

3.- Adicionar 600 μ l de persulfato amónico 10 % y 60 μ l de TEMED. Verter la mezcla inmediatamente en el soporte del gel de secuenciación, previamente preparado.

4.- Una vez polimerizado, antes de cargarlo, calentar el gel haciéndole pasar corriente eléctrica (30 mA durante 1 h) en tampón de electroforesis (TBE 0,5 x).

5.- Cargar las muestras y los marcadores. Aplicar la corriente eléctrica y mantener la electroforesis a 30 mA hasta que el azul bromofenol llega al final del gel.

6.- Una vez acabada la electroforesis, separar los cristales y transferir el gel a una lámina de papel Watman 3MM. Cubrir con un plástico y secar a 80 °C durante 30 minutos.

7.- Poner el gel en contactos con placas amplificadoras Phosphor-screen GP de 35 x 43 cm de Amersham, previamente neutralizadas, durante al menos 16 h. A continuación, se detectó la señal radiográfica de dichas placas mediante un Fosfo-Imager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, Calif.).

2.4. SOBREEXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA NnrR

2.4.1. Mutación puntual dirigida del gen *nnrR*

El plásmido pRJ8819, un regalo de S. Mesa, Departamento de Microbiología, ETH Zentrum, Zurich, Suiza, está formado por el vector de expresión pET28a(+) y el fragmento *NdeI/EcoRI* de 818 pares de bases que corresponde al gen *nnrR* de *B. japonicum*. Para clonar *nnrR* en el vector de expresión pET3a(+) (Novagen), fue necesaria la conversión del sitio *EcoRI* del sitio múltiple de clonación (SMC) de pRJ8819 en otro *BamHI* mediante la mutagénesis puntual dirigida de pRJ8819. Para ello, se ha utilizado el sistema comercial QuickChange[®] (Stratagene), de la manera que se indica a continuación:

1.- En un tubo eppendorf, adicionar:

- 5 µl de tampón 10x de PCR
- 10 µl de una mezcla 2 mM de dNTPs
- x µl de ADN de doble cadena de pRJ8819 (50 ng)
- y µl de *nnrRmut1B* (aprox. 125 ng)
- z µl de *nnrRmut2B* (aprox. 125 ng)
- 1 µl de polimerasa *PfuI* (2,5 U/µl)
- Completar con agua bidestilada estéril hasta 50 µl

Cebadores

Nombre	Secuencia
SMC de pRJ8819	5'-GCGCGAATTC <u>GAGCT</u> CCGTCGACAAG-3'
<i>nnrRmut1B</i>	5'-GCGCGAATTCAGGATCCGTCGACAAG-3'
SMC de pRJ8819	5'-CTTGTCGACGGAG <u>CTCGA</u> ATTCGCGC-3'
<i>nnrRmut2B</i>	5'-CTTGTCGACGGATCCTGAATTCGCGC-3'

Las bases subrayadas en la secuencia original se modificaron para sustituir el sitio *EcoRI* por otro *BamHI*.

Programa de PCR

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95	30 S
15	95	30 s
	55	30 s
	68	6,2 minuto
		(2 minutos/kb)

2. Comprobar la amplificación del ADN mediante la electroforesis de 5 µl en un gel de agarosa.

3.- Digerir el producto de PCR con *DpnI* (1 µl, 10 U/µl, Stratagene®). La enzima se adiciona directamente al tubo de PCR y no es necesario tampón. Esta enzima sólo digiere el ADN sintetizado por *E. coli* y no el mutagenizado de nueva síntesis procedente de la PCR.

4.- Transformar 50 µl de células competentes de *E. coli* XL1-Blue con 1 µl de ADN digerido y sembrar en medio LB suplementado con 200 µg/µl de ampicilina.

5.- Seleccionar colonias y aislar ADN plasmídico.

6.- Secuenciar el ADN utilizando como cebadores los oligonucleótidos T7-forward y T7-reverse.

La secuenciación de 5 de los clones obtenidos permitió seleccionar uno de ellos, al que se ha denominado *E. coli* 0703, que se ha utilizado en este estudio.

2.4.2. Sobreexpresión de NnrR en *E. coli*

2.4.2.1. Construcción del vector de expresión de *nnrR*

La clonación del fragmento *NdeI/BamHI* de 818 pares de bases de *E. coli* 0703 en el vector pET3a(+), previamente digerido con *NdeI* y *BamHI*, resultó en el plásmido pBG0704 que, finalmente, se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* DH5α. Una vez comprobada la presencia del plásmido en las células transformadas, se ha seleccionado una cepa, *E. coli* 0704, que se ha utilizado en este estudio.

2.4.2.2. Sobreexpresión del gen *nnrR* a partir de *E. coli* BL21 (DE3) transformada con pBG0604

- 1.- Inocular 3 ml de LB, suplementado con ampicilina, con *E. coli* BL21 (DE3) transformada con pBG0704, e incubar durante 12-15 h a 37 °C.
- 2.- Precalentar matraces con 20 ml de LB a 37 °C durante 12-15 h, adicionar ampicilina, e inocularlos con 200 µl del precultivo en LB.
- 3.- Incubar las células a 37 °C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,3.
4. Dividir los cultivos para incubar a 30 °C y a 37 °C.

2.4.2.2.1. Efecto del IPTG

- 1.- Cuando los cultivos alcanzaron una DO₆₀₀ de 0,6, adicionar 0,1, 0,2 y 0,4 mM de IPTG.
- 4.- Incubar a la temperatura correspondiente, 30 °C ó 37 °C, durante 2 h. Tomar alícuotas de 1 ml al comienzo y al final del tiempo de incubación.
5. Lisar las células (ver abajo, apartado 2.4.3.2.3) y analizar el sobrenadante mediante electroforesis en geles PAGE-SDS.

2.4.2.2.2. Efecto del tiempo de incubación

- 1.- A cultivos celulares de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) transformada con pBG0704 incubados a 30 °C y 37 °C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,6, adicionar 0,1 mM de IPTG.
- 2.- Incubar a la temperatura correspondiente, durante 2, 3, 4 y 6 h. Tomar alícuotas de 1 ml cada hora durante el tiempo de incubación.
- 3.- Lisar las células (ver abajo, apartado 2.4.3.2.3) y analizar el sobrenadante mediante electroforesis en geles PAGE-SDS.

2.4.2.2.3. Solubilidad de la proteína recombinante

Durante los estudios sobre el efecto de la temperatura, concentración de IPTG y del tiempo de incubación sobre la expresión de *nnrR*, y sobretodo, antes de iniciar la purificación de la proteína NnrR, se determinó su solubilidad de la manera que se describe a continuación:

- 1.- Centrifugar las alícuotas de 1 ml a 12.000 r.p.m. durante 3 minutos.
- 2.- Resuspender el sedimento en solución de resuspensión (100 µl/unidad de DO₆₀₀ del cultivo).
- 3.- Congelar y descongelar en nitrógeno líquido. Comprobar *de visu* la lisis celular en función de la viscosidad y del cambio de color.
- 4.- Centrifugar a 12.000 r.p.m. durante 10 minutos. Recoger el sobrenadante y resuspender el sedimento en solución de resuspensión (100 µl/unidad de DO₆₀₀ del cultivo original)
- 6.- Analizar el contenido proteico del sedimento y del sobrenadante en geles PAGE-SDS.

- Solución de resuspensión (SR): piperazina 20 mM pH 5,6; NaCl 20 mM.

2.4.3. Purificación de la proteína NnrR

2.4.3.1. Inducción de la expresión del gen *nnrR* en *E. coli*

Se han utilizado lotes de 400 ml de medio LB inoculados con *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con pBG0704 y cultivados a 37 °C, en presencia de ampicilina, hasta una DO₆₀₀ de 0,3. Posteriormente, el cultivo se incubó a 30 °C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,6, se suplementó con 0,1 mM de IPTG y se incubó de nuevo a 30 °C durante 2 h.

2.4.3.2. Fraccionamiento celular

A partir de 400 ml del cultivo inducido:

- 1.- Centrifugar a 5.000 r.p.m. durante 10 minutos a 4 °C.
- 2.- Lavar (10 ml/100 ml de cultivo) con solución de resuspensión.
- 3.- Centrifugar de nuevo a 5.000 r.p.m. durante 10 minutos a 4 °C.
- 4.- Resuspender en 5 ml de solución de resuspensión suplementada con PMSF 0,5 mM (2 ml/100 ml de cultivo).
- 5.- Romper las células mediante diferencias de presión (120 MPa) en una prensa de French (SLM, Aminco). Repetir la rotura 2 veces.

- 6.- Centrifugar el extracto celular resultante (10.000 r.p.m., 10 min, 4 °C) para sedimentar las células que no se hayan roto.
- 7.- Recoger el sobrenadante y centrifugar nuevamente a 45.000 r.p.m. (1 h, 4 °C). Se utilizó una ultracentrífuga Beckman[®] provista de un rotor modelo 70Ti.
- 8.- Recoger el sobrenadante.

Una vez sedimentadas las células, si no es posible proseguir con la purificación, las muestras se pueden congelar, primero, en nitrógeno líquido y guardarlas después a -80 °C hasta su uso.

Solución de PMSF: 50 mM en etanol.

2.4.3.3. Cromatografía de intercambio iónico

Se ha llevado a cabo mediante cromatografía líquida de presión rápida (FPLC) utilizando un cromatógrafo modelo LCC-500 (Pharmacia). El procedimiento a seguir es el siguiente:

- 1.- Preparar solución de resuspensión (SR, piperazina 20 mM, pH 5,6; NaCl 20 mM). Filtrarla y eliminar el gas usando filtros de 0,45 µm Durapore de Millipore, acoplado a una bomba de vacío.
- 2.- Lavar 2 veces la bomba peristáltica A del cromatógrafo con SR.
- 3.- Equilibrar la columna con cuatro veces su volumen de SR a un flujo de 3 ml/minuto. Se ha empleado una columna de intercambio aniónico HiTrapQ FF[®] (Amersham) de 5 ml.
- 4.- Inyectar el sobrenadante procedente del fraccionamiento celular en la columna utilizando SR como fase móvil a un flujo de 3 ml/minuto. Recoger el eluido.
- 5.- Lavar, primero la columna, y luego la bomba A, con cuatro volúmenes de SR.
- 6.- Lavar, primero la bomba A, y luego la columna con cuatro volúmenes de agua desionizada.
7. Lavar, primero la bomba A, y luego la columna con dos volúmenes de etanol al 20 %.
- 8.- Comprobar la presencia de la proteína en el eluido mediante electroforesis PAGE-SDS.

2.4.3.4. Filtración en gel

Se efectuó mediante cromatografía a través de columnas PD-10[®] (Amersham), que contienen una matriz de Sephadex G-25 M. El procedimiento a seguir es el siguiente:

- 1.- Disponer la columna en un soporte. Cortar la parte inferior de la columna con una tijera y esperar a que caiga el líquido que hay en su interior.
- 2.- Equilibrar la columna con 25 ml de solución estándar (SE).
- 3.- Aplicar 2,5 ml del eluido que contiene la proteína procedente de la cromatografía de intercambio iónico. Recoger el nuevo eluido.
- 4.- Adicionar 3,5 ml de SE. Recoger el eluido.
- 5.- Repetir los pasos 2, 3 y 4 cuantas veces sea necesario para eluir la totalidad de la proteína a través de la columna.
- 6.- Cuantificar la concentración de proteína (apartado 2.2.5)
- 7.- Comprobar la purificación de la proteína mediante electroforesis PAGE-SDS.

Solución estándar (SE): Tris-HCl 25 mM pH 7; NaCl 20 mM.

2.4.3.5. Cromatografía de afinidad

Se ha llevado a cabo mediante cromatografía líquida de presión rápida (FPLC) utilizando un cromatógrafo modelo LCC-500 (Pharmacia). El procedimiento a seguir es el siguiente

- 1.- Preparar solución estándar (SE, Tris-HCl 25 mM pH 7; NaCl 20 mM) suplementada con 20 mM (SE.A) y 1 M (SE.B) de NaCl, respectivamente. Filtrarla y eliminar el gas usando filtros de 0,45 μ m Durapore de Millipore acoplado a una bomba de vacío.
- 2.- Lavar las dos bombas peristálticas (A y B) del cromatógrafo con las soluciones SE.A y SE.B, respectivamente.
- 3.- Equilibrar la columna con cuatro volúmenes de solución SE.A. Se ha utilizado una columna HiTrap Heparin[®] de 5 ml (Amersham), funcionando a un flujo de 3 ml/min.
- 4.- Inyectar en la columna todo el eluido procedente de la filtración en gel utilizando 5 ml de SE.A como fase móvil.

- 5.- Lavar la columna con cuatro volúmenes de SE.
- 6.- Eluir la proteína de la columna utilizando un gradiente desde 20 mM hasta 1 M de NaCl. El gradiente se preparó mezclando una concentración cada vez mayor de solución SE.B, respecto a una concentración constante de SE.A. La longitud del gradiente fue de 20 ml y el eluido se recogió en fracciones de 1,5 ml.
- 7.- Lavar la columna con dos volúmenes de SE.A.
- 8.- Lavar las bombas peristálticas con cuatro volúmenes de agua desionizada.
- 9.- Lavar la columna con cuatro volúmenes de agua desionizada.
- 10.- Lavar las bombas con dos volúmenes de etanol al 20 %.
- 11.- Lavar la columna con dos volúmenes de etanol al 20 %.
- 12.- Comprobar la presencia de la proteína en las diferentes fracciones mediante electroforesis PAGE-SDS. A aquella fracción, o fracciones, que contenían la proteína pura, se suplementaron con glicerol al 10%, se sumergieron en nitrógeno líquido, y se guardaron a -80 °C hasta su utilización.

2.4.3.6. Electroforesis de proteína en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS)

2.4.3.6.1. Preparación de las muestras

Las alícuotas procedentes de los estudios sobre el efecto de la temperatura, concentración de IPTG y del tiempo de incubación sobre la expresión de NnrR originaron dos tipos de muestras, el sedimento y el sobrenadante de las células (ver apartados 2.4.2.2.1, 2.4.2.2.2 y 2.4.2.2.3). A la fracción soluble se le adicionó un volumen de tampón de carga 2x, y el sedimento se resuspendió en 50 µl de tampón de carga 1x.

Las muestras procedentes del proceso de purificación (50 µl) se complementaron con 1 volumen de tampón de carga 2x.

Todas las muestras se calentaron a 90° C durante 5 minutos y se centrifugaron 5 minutos a 12.000 r.p.m. antes de cargarlas en el gel.

Tampón de carga 2x: SDS 4%; DTT 0.1 M; glicerina 20%; Tris-HCl 125 mM pH 6,8; azul de bromofenol 0,02%.

2.4.3.6.2. Electroforesis

Se ha utilizado el método descrito por Laemmli (1970). Los geles de separación y de empaquetado se prepararon a una concentración final del 4% de acrilamida:bisacrilamida, respectivamente, como se indica a continuación:

Gel de separacion (4%)		Gel de empaquetado (4%)	
Agua destilada	2,1 ml	Agua destilada	1,82 ml
Tris 1,5 M pH 8,8	2 ml	Tris 0.25 M, pH 6,8	0,75 ml
SDS 10%	80 µl	SDS 10%	30 µl
Acrilamida:Bisacrilamida (29,2:0,8), 30%	3,75 ml	Acrilamida:Bisacrilamida (29,2:0,8), 30%	0,4 ml
Persulfato amónico 10%	50 µl	Persulfato amónico 10%	60 µl
TEMED	4 µl	TEMED	2,5 µl

Como molde se emplearon placas de vidrio de 7 x 10 cm y espaciadores de 0,75 mm. La electroforesis se llevó en una cubeta Miniprotean II (Biorad) rellena de tampón de electroforesis a un voltaje constante de 180 V, a temperatura ambiente. En cada carril se cargó 10 µl de cada muestra diluída (1/5 v/v) en tampón de carga. Se utilizó el sistema comercial LMW-SDS Marker Kit[®] de Amersham como marcador de tamaño molecular, cargando 5 µl por pocillo.

Tampón de electroforesis: Tris/Glicina pH 8,3 (por l): Glicina 14,41 g; Tris-Base 3,03 g; SDS 1 g.

Tampón de carga 2x: SDS 4%; DTT 0.1 M; glicerina 20%; Tris-HCl 125 mM pH 6,8; azul de bromofenol 0,02%.

2.4.3.6.3. Detección

Después de la electroforesis (aproximadamente 45 minutos en las condiciones descritas), las proteínas se detectaron mediante tinción con Azul Coomassie durante 15 minutos y posterior lavado con solución de desteñido durante 2 h. Finalmente, el gel se secó entre papel de celofán al aire libre.

Azul Coomassie: Coomassie Brilliant Blue R250, 1g; metanol 400 ml; ácido acético 100 ml, H₂O destilada hasta 500 ml.

Solución de desteñido: metanol 250 ml; ácido acético 100 ml, H₂O destilada hasta 650 ml.

Para los experimentos de transcripción *in vitro*, la sobreexpresión del gen *nnrR* y purificación de la proteína NnrR se llevaron a cabo en microaerobiosis. La sobreexpresión se realizó cultivando las células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con pBG0704 en aerobiosis hasta alcanzar una DO_{600} de 0,6 a 37 °C. Posteriormente, el cultivo celular se transfirió a tubos cerrados con tapón de goma perforable y se suplementó con 0,1 mM de IPTG y 0,5 % de glucosa. Las células se incubaron a 30 °C durante 14 h a 100 r.p.m.

La purificación en microaerobiosis se realizó suplementando la solución de resuspensión con 1 mM de DTT. Las soluciones estándar y de resuspensión se gasearon previamente a su uso en tubos sellados con tapón de goma perforable. Toda la manipulación se realizó en una cámara de anaerobiosis (Coy[®] modelo B) por la que se circuló una atmósfera inerte compuesta por 95 % N₂:5 % H₂.

La concentración relativa de proteína purificada, calculada según su correspondiente área parcial, se determinó mediante el análisis densitométrico de los geles de proteína. Para ello se empleó un densitómetro Shimadzu modelo CS-9000.

2.5. CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA NnrR

2.5.1. Integridad proteica

La integridad de la proteína NnrR purificada se determinó analizando su espectro de dicroísmo circular. Para ello, se utilizó un espectropolarímetro Jasco[®], modelo J-600, equipado con un controlador de temperatura tipo Peltier. Se prepararon alícuotas de la proteína en tampón Tris-HCl 25 mM, pH 7, y NaCl 20 mM, a una concentración final de 14 μ M. El espectro se determinó entre 200 y 250 nm, en una cubeta de cuarzo de 0,5 cm de longitud de paso. a una velocidad de 20 nm/min, una resolución de 0,2 nm, y 1 nm de ancho de banda. La temperatura fue de 25 °C. En algunos experimentos la temperatura se incrementó hasta 90 °C durante 5 minutos, y se enfrió de nuevo a 25 °C, procediéndose entonces a realizar una nueva medida.

2.5.2. Coeficiente de extinción molar

El coeficiente de extinción molar se calculó a partir de la ecuación de Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \times C \times L,$$

donde A es la absorbancia a 280 nm,

ε es el coeficiente de extinción molar,

C es la concentración de la proteína, y

L es la longitud de paso de la cubeta de cuarzo que se emplea para la medición espectrofotométrica. La medición se realizó en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1603.

2.5.3. Espectrometría de masas

Para determinar la masa molecular de la proteína recombinante se prepararon muestras a una concentración de 20 μ M en una solución acetonitrilo:agua (1:1, v/v) suplementada con 0,2 % de ácido fórmico. Posteriormente, alícuotas de 20 μ l se sometieron a cromatografía líquida de alta presión en un cromatógrafo BioCad (PerSeptive Biosystems) equipado con una columna C-18 (μ Bondapak, Waters) a un flujo de 0,5 ml/minuto. Una vez recogida la fracción que contenía la proteína, se cargó en el

ionizador de un espectrómetro de masas (ThermoElectron, modelo LCQ) equipado con un ionizador electrospray (ESI), acoplado a un detector de trampa iónica.

2.5.4. Estado de agregación

Se ha determinado mediante cromatografía de exclusión molecular empleando una columna Superdex 75 H/R 30/10 (Amersham), acoplada a un cromatógrafo BioCad (PerSeptive Biosystems).

- 1.- Lavar la bomba A con tampón Tris-HCl 25 mM, pH 7; NaCl 300 mM.
- 2.- Equilibrar la columna haciéndole pasar la misma solución durante 2 h a temperatura ambiente, a un flujo constante de 0,5 ml/minuto.
- 3.- Inyectar las muestras de proteína patrón. Se ha utilizado el producto comercial LMW Gel filtration calibration kit[®] que contiene RNasa A (13,7 kDa), ovoalbúmina (43 kDa) y albúmina sérica bovina (67 kDa), a las concentraciones recomendadas por el fabricante (Amersham).
- 4.- Inyectar 100 µl de la proteína NnrR, a una concentración de 40 µM.
- 5.- Cálculo de los tiempos de retención y construcción de la recta de regresión.

2.5.5. Determinación de posibles sitios de unión a ligandos

Se ha llevado a cabo mediante titulación de NnrR con concentraciones crecientes de ácido 8-anilino-1-sulfónico (ANS) utilizando un fluorímetro Fluorimax[®]. Se ha utilizado 350 nm como valor de la longitud de onda de excitación del ANS. La longitud de onda de emisión del ANS aumenta llegando a valores comprendidos entre 480 y 530 nm, cuando se forman complejos ANS:proteína (Heyduk y Lee, 1989). Puesto que el máximo de emisión, a 25 °C, es de 460 nm para la NnrR, los espectros se registraron entre 420 y 570 nm. Se han empleado cubetas de cuarzo de 1 cm de longitud de paso.

El protocolo empleado para la titulación se detalla a continuación:

- 1.- Preparar soluciones concentradas de ANS (Sigma) de 1, 3 y 5 µM, disueltas en tampón SE (Tris-HCl 25 mM pH 7; NaCl 20 mM). Las soluciones se filtraron usando filtros Millex (Millipore) de 0,2 µm de tamaño de poro y se guardaron a temperatura ambiente protegidas de la luz.
- 2.- Estabilizar el fluorímetro y obtener un blanco utilizando sólo tampón SE.

- 3.- Obtener el espectro de la proteína en ausencia de ANS. En todos los casos, la concentración de proteína fue 42 μM .
- 4.- Obtener espectros adicionando concentraciones crecientes de ANS, desde 1 a 300 μM .
- 6.- Calcular la curva correspondiente a la relación entre la longitud de onda de emisión de fluorescencia a 490 nm y la concentración de ANS en la cubeta.
- 7.- Ajustar dos rectas de regresión, una correspondiente a la fase inicial cuando la proteína une ANS en proporción lineal y, otra, que corresponde al final del ensayo, cuando el ANS se encuentra en exceso respecto a la proteína.
- 8.- La intersección de ambas rectas da un valor de concentración de proteína, a partir del cual se puede estimar la razón entre las moléculas de ANS presentes y las de proteína.

2.6. UNIÓN NnrR-ADN

2.6.1. Ensayos de retardo en gel

2.6.1.1. Amplificación del ADN

En un tubo eppendorf, adicionar:

- ADN molde (50 ng)¹
- 10 µl de tampón PCR (5x)
- 25 pmoles de cada cebador²
- 5 µl de MgCl₂ (25 mM)
- 5 µl de dimetil sulfóxido
- 5 µl dNTPs (2 mM)
- 0,2 µl Taq polimerasa (5 U/µl)
- H₂O bidestilada hasta 50 µl

¹ADN molde: Se han utilizado cada uno de los plásmidos pPM200P9134, pRJ2498 y pRJ2499 que contienen las regiones promotoras de los genes *napEDABC*, *nirK* y *norCBQD*, respectivamente.

²Cebadores:

Nombre	Secuencia
nap1F	5'-gggaattc ⁴⁵⁸⁶ CCCGAGATCGATGGCCGTGAG-3'
nap1R	5'-gggatcc ⁴⁸³³ ATATTCGGTCTCTCTGAAATTTTGG-3'
nir1F	5'-cggaattc ⁷⁴³ TCAACGTGGTGTCG-3'
nir1R	5'-gcggatc ⁹²⁵ CTGATCAATGCGGCTCT-3'
nor1F	5'-gcgaattc ⁶² CTCGTGCTCGATTTCTC-3'
nor1R	5'-gcggatc ³⁰⁰ CACTTGGTCAGGCGTTCA-3'

Las parejas de oligonucleótidos nap1F y nap1R, nir1F y nir1R, y nor1F y nor1R se han utilizados para amplificar fragmentos de 221, 195 y 238 pares de bases de las regiones promotoras de los genes *nap*, *nir* y *nor*, respectivamente. Los superíndices indican la posición de la base siguiente en la secuencia de los genes *napEDABC* (Delgado et al. 2003), *nirK* (Velasco et al. 2001) y *norCBQD* (Mesa et al. 2002), depositados en las Bases de Datos (números de acceso AF314590, AJ002516 y AJ132911, respectivamente). En minúscula se indica la secuencia de las enzimas de restricción, *EcoRI* y *BamHI*, añadidas para favorecer la clonación.

Programa de PCR

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95	2 minutos
35	95	30 s
	55	30 s
	72	30 s
1	72	2 minutos

Una vez terminada la PCR y comprobada la amplificación de los fragmentos, las muestras se cargaron en su totalidad en geles de agarosa y se purificó el ADN de los mismos conforme al método explicado en el apartado 2.3.7.

2.6.1.2. Marcaje del ADN amplificado

1.- En un tubo eppendorf, mezclar:

- | | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 1.- ADN amplificado | x µl (10 µM) |
| 2.- Tampón de la polinucleótido kinasa del fago T4 (10x) | 5,0 µl |
| 3.- Calentar a 70 °C durante 5 minutos. | |
| 4.- Enfriar en hielo durante 10 minutos. | |
| 5.- Adicionar polinucleótido kinasa del fago T4 | 1,0 µl |
| 6.- Adicionar ATP γ - ³³ P (10 µCi/µl) | 5,0 µl |
| 7.- Completar con agua bidestilada hasta | 50 µl |
| 8.- Incubar a 37 °C durante 30 minutos | |
| 9.-.- Detener la reacción colocando la muestra en hielo. | |
| 10.- Disponer una columna NAP-5 (Amersham) en un soporte y cortar su extremo terminal con una tijera para eliminar el líquido que contiene. Centrifugar la columna a 2.000 r.p.m. durante 5 minutos. | |
| 11.- Aplicar la mezcla de reacción al centro de la columna, y centrifugar a 2.000 r.p.m. durante 5 minutos. Recoger el eluido que contiene el ADN marcado. | |

2.6.1.3. Mezcla de reacción

1.- En tubos eppendorf, adicionar:

CFB (10x)		1,5 μ l
NnrR ¹		x μ l
ADN marcado ²		2 μ l
Poli-dI-dC (0,5 mg/ml)		2,0 μ l
Albúmina sérica bovina (0,1 mg/ml)		3,5 μ l
Glicerol (50%)		3,0 μ l
agua MQ	completar hasta	15 μ l

CFB 10x: Tris-HCl 10 mM pH 7,5; KCl 50 mM; EDTA 1 mM; MgCl₂ 7 mM; DTT 1 mM.

¹Se utilizaron concentraciones de proteína purificada a una razón ADN:proteína de 1:100 y 1:1000.

²Las muestras de ADN empleadas fueron los productos de PCR amplificados y marcados en los apartados 2.6.1 y 2.6.2. La concentración usada fue de 0,06 μ M.

2.- Preparar un blanco sin proteína.

3.- Incubar 15 minutos a temperatura ambiente.

4.- Parar la reacción colocando las muestras en hielo.

2.6.1.4. Electroforesis en geles nativos de poliacrilamida y revelado

1.- Se prepara la siguiente mezcla (por gel):

Acrilamida:bisacrilamida (29:1)	2,5 ml
TBE (10x)	1 ml
Persulfato amónico (10 %)	100 μ l
Agua bidestilada	6,4 ml
TEMED	5 μ l

2.- Se cargan las muestras, pero sólo se le adiciona tampón de carga a la muestra que no lleva proteína.

3.- Aplicar una corriente constante de 15 mA/gel, durante 1 h a 4 °C. Como tampón de desarrollo se empleó TBE 1x.

Tampón TBE 1x: Tris 50 mM; EDTA-Na₂ 2,5 mM; BO₃H₂ 50 mM; pH 8,2.

Tampón de carga 5x: glicerina 10 %; azul de bromofenol 0,02 %.

4.- Después de la electroforesis, transferir el gel a un papel Watman 3 MM, cubrir con un plástico transparente, y secar en vacío a 80 °C en un secador Bio-Rad, durante 1 h.

5.- Exponer el gel en oscuridad a una película autorradiográfica Kodak BioMax XAR (Sigma) durante toda la noche. Para la amplificación de la señal, se incubó a – 80 °C. El revelado de las películas se llevó a cabo utilizando revelador y fijador de TETENAL® a las diluciones y tiempos recomendados.

2.6.2. Calorimetría isotérmica de titulación

La calorimetría isotérmica de titulación (CIT) se empleó para analizar la unión de la proteína NnrR a los promotores *napEDABC*, *nirK* y *norCBQD*. Para ello, se utilizó un microcalorímetro VP-ITC (MicroCal, Northampton, MA).

2.6.2.1. Preparación de ADN

2.6.2.1.1. Oligonucleótidos

Para los experimentos de microcalorimetría se diseñaron oligonucleótidos de 25 bases, cada uno de los cuales incluía la caja de anaerobiosis, considerada como el posible sitio de unión de la proteína NnrR, de cada uno de los genes *napEDABC*, *nirK* y *norCBQD*.

Nombre	Secuencia
nap3F	5'- ⁴⁷²⁶ ACGGATTGATCCAGATCAACGCGT-3'
nap3R	5'- ⁴⁷⁴⁹ ACGCGTTGATCTGGATCAATCCGT-3'
nir2F	5'- ⁸¹⁰ AAAGCTTGTTGCAGCGCAAACACT-3'
nir2R	5'- ⁸³³ AGTGTGTTGCGCTGCAACAAGCTTT-3'
nor2F	5'- ¹⁸⁷ GCTCATTGCGCCCTGACAAAGAAC-3'
nor2R	5'- ²¹⁰ GTTCTTTGTCAGGGCGCAATGAGC-3'

Los superíndices indican la posición de la base siguiente en la secuencia de los genes *napEDABC* (Delgado et al. 2003), *nirK* (Velasco et al. 2001) y *norCBQD* (Mesa et al. 2002), depositados en las Bases

de Datos (números de acceso AF314590, AJ002516 y AJ132911, respectivamente). En negrita se muestran las secuencias homólogas a la caja de anaerobiosis que se encuentran en la región promotora de los genes *napEDABC*, *nirK* y *norCBQD*.

2.6.2.1.2. Formación de oligonucleótido de doble cadena

- 1.- Mezclar cantidades equimolares (50 μ M) de cada pareja de oligonucleótidos, en tampón Na₂/NaHPO₄ 10 mM; EDTA 1 mM; NaCl 150 mM.
- 2.- Incubar a 95 °C durante 10 minutos.
- 3.- Parar la reacción colocando las muestras en hielo
- 4.- Comprobar la formación del ADN de doble cadena mediante electroforesis en geles nativos de poliacrilamida (aparado 2.6.4).
- 5.- Dializar las muestras de ADN y de proteína usando membranas de diálisis Slide-A-Lyzer (Pierce), de 3,5 y 10 kDa de tamaño de poro, respectivamente, en una solución de NaCl 100 mM y Tris-HCl 25 mM, pH 7,0.
- 6.- Determinar las concentraciones de ADN y de proteína.
- 7.- Filtrar el ADN y la proteína a través de filtros Millex (Millipore) de 0,2 μ m de tamaño de poro.
- 8.- Eliminar el aire mediante el empleo de una bomba de vacío.

2.6.2.2. Determinación del desprendimiento de calor

- 1.- A la solución de ADN 2 μ M, adicionar 12,8 μ l de una solución de proteína (60 μ M, considerada como dímero).
- 2.- Como blanco se utilizó sólo la solución de proteína adicionada de tampón NaCl 100 mM y Tris-HCl 25 mM, pH 7,0 que no contenía ADN. La temperatura de la cámara de reacción fue, en todos los casos, de 25 °C.

Los valores de titulación obtenidos se trataron utilizando el programa ORIGIN (MicroCal, Massachussets, MA, USA), utilizando el método de un sitio de unión (Wiseman et al. 1989) modelo que considera la unión de una molécula a n sitios idénticos e independientes.

A partir de la gráfica obtenida, se calculó la entalpía de la reacción, ΔH , la constante de afinidad K_A ($K_A = 1/K_D$), y la constante de estequiometría, n . Los valores de variación de la energía libre (ΔG) y entropía (ΔS) se calcularon a partir de los valores obtenidos

de K_A y de ΔH , de acuerdo a la ecuación $\Delta H = -RT \ln K_A$, donde R es la constante universal de los gases y T es la temperatura.

Los experimentos de calorimetría también se realizaron en condiciones de microaerobiosis, que se llevó a cabo gaseando con nitrógeno tanto las soluciones de proteína y de ADN, como los compartimentos del microcalorímetro donde se contienen dichas soluciones. En estos casos, el volumen de inyección de proteína fue de 8 μl .

2.7. Cristalización de NnrR

Se ha utilizado la técnica de la gota suspendida (hanging drop) empleando el sistema comercial Cristal Screen[®] I y II (Hampton Research). Se emplearon placas de cristalización de 24 pocillos cada una, lo que posibilitó probar 96 soluciones de cristalización diferentes. Se procedió de la siguiente manera:

- 1.- Filtrar la solución de proteína a través de filtros Millex (Millipore) de 0.2 μM de tamaño de poro, y determinar su concentración.
- 2.- Adicionar 500 μl de cada una de las soluciones de cristalización a cada uno de los pocillos.
- 3.- En un cristal de cristalización Glass Cover Slides (Hampton Research), cuyo tamaño es algo superior al diámetro del pocillo, depositar 1 μl (60 μM) de la solución proteica y 1 μl de una de las soluciones de cristalización. Repetir para cada una de las 96 soluciones de cristalización.
- 4.- Cubrir cada pocillo con su respectivo cristal de manera que la muestra mire hacia abajo.
- 5.- Sellar el cristal al pocillo con algo de grasa.
- 6.- Incubar la placa a 24 °C durante varios meses.
- 7.- Comprobar la aparición de cristales al microscopio óptico cada semana.

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. Regulación de la desnitrificación por microaerobiosis

Los trabajos previos realizados en el Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín han demostrado que la microaerobiosis es necesaria para la expresión de los genes *nirK*, *norCBQD* y *nosRZDEFLXY* de *B. japonicum* (Velasco et al. 2001, 2004; Mesa et al. 2002). Sin embargo, no se había demostrado que los genes *napEDABC*, que codifican la síntesis de la enzima nitrato reductasa periplásmica (Nap), pudieran estar sometidos a un mecanismo similar de regulación. Por tanto, antes de abordar el estudio de la regulación de la desnitrificación por óxidos de nitrógeno (NOx), se comprobó el efecto de la limitación de oxígeno sobre la expresión de los genes *napEDABC*. Parte de los resultados relativos a la regulación por microaerobiosis obtenidos durante la realización de esta Memoria de Doctorado se han publicado en Bedmar et al. (2005) y Robles et al. (2006).

3.1.1. Efecto de la microaerobiosis en la expresión de los genes *napEDABC*

3.1.1.1. Construcción de fusiones transcripcionales P_{napE} -*lacZ*

Para estudiar el efecto de la microaerobiosis en la expresión de los genes *napEDABC* se construyó una fusión transcripcional entre la región promotora de los genes *nap* y el gen *lacZ*, P_{napE} -*lacZ*, que, posteriormente, se integró en el cromosoma de diferentes cepas de *B. japonicum*. Para ello, el fragmento *Bam*HI de 5 kb de pPM200P9134 se clonó en pBS KS(+) para dar lugar al plásmido pBG1801. Posteriormente, la clonación del fragmento *Eco*RI/*Sac*I de 1,36 kb de pBG1801 en pUC18, digerido con las mismas enzimas, originó el plásmido pNE2. Finalmente, la digestión de pNE2 con *Eco*RI y *Pst*I, y la clonación del fragmento de 1,36 kb en pSUP3535 resultó en el plásmido pBG0614 (Figura 3.1). Dicho plásmido se transfirió, mediante transformación, a células competentes de *E. coli* S17.1 que, a su vez, se utilizó como cepa donadora en cruces biparentales con las cepas de *B. japonicum* USDA110, 7403, 7360, 9043 y 8678, utilizando la tetraciclina para la selección de transconjugantes. Se obtuvieron así las cepas 0602, 1204, 1305, 1108 y 0715,

respectivamente, en las que la presencia del cointegrado se comprobó mediante hibridación de su ADN genómico, previamente digerido con *SacI*, con una sonda de ADN de 3 kb, que contenía el gen *lacZ*, preparada a partir de la digestión de pSUP3535 con *EcoRI/NotI*. Mientras que no se detectó señal de hibridación alguna en el ADN de USDA110 (Figura 3.2, carril 7), el de las cepas 0602, 1204, 1305, 1108 y 0715 presentó dos señales de 2 kb y 11,6 kb, respectivamente (Figura 3.2, carriles 2-6, respectivamente).

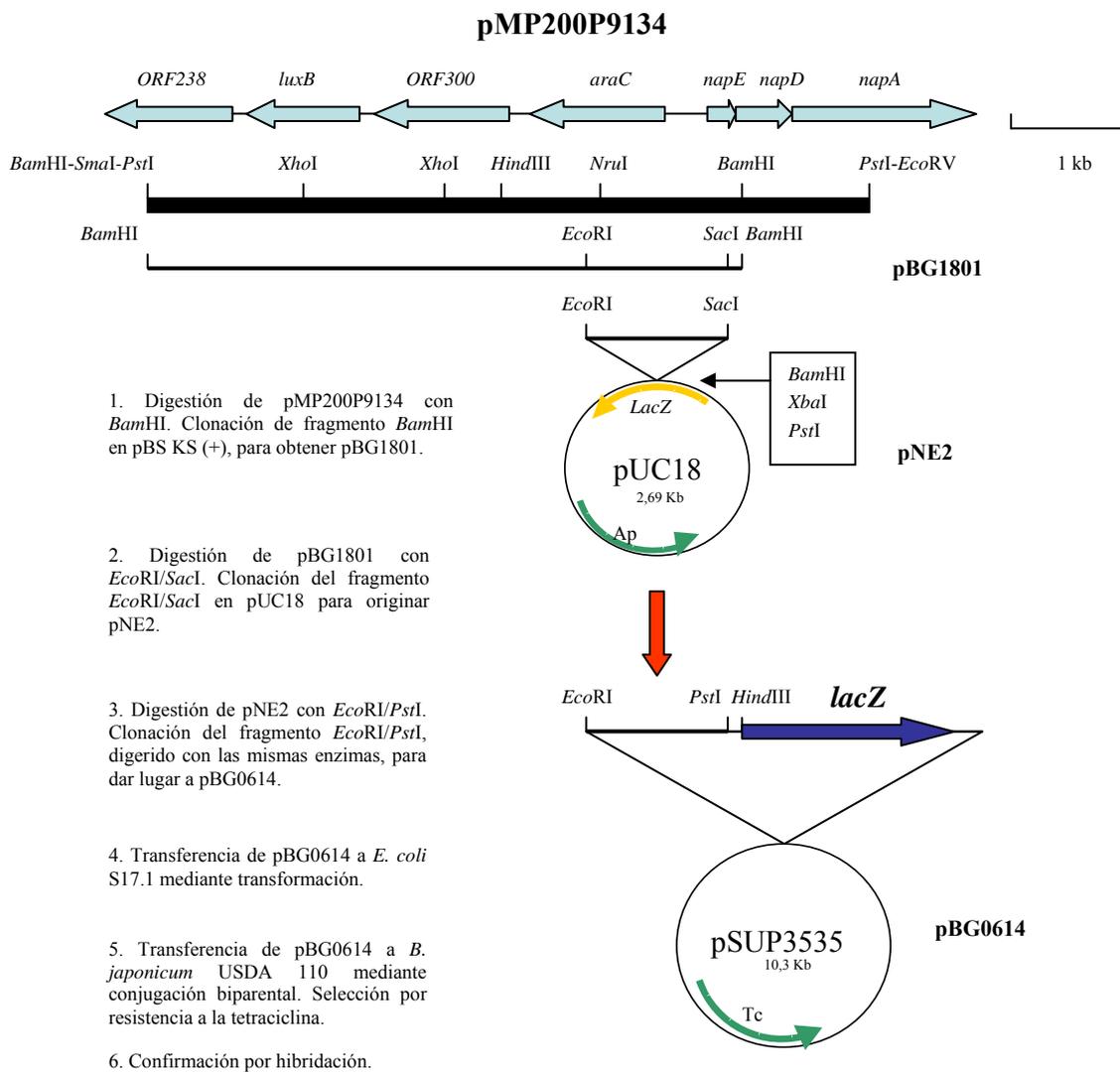


Figura 3.1. Estrategia para la construcción del plásmido pBG0614. Se muestra la construcción de los plásmidos pBG1801 y pNE2, a partir de los cuales se obtuvo el plásmido suicida pBG0614, que se transfirió, por cruce biparental, a *B. japonicum* USDA110.

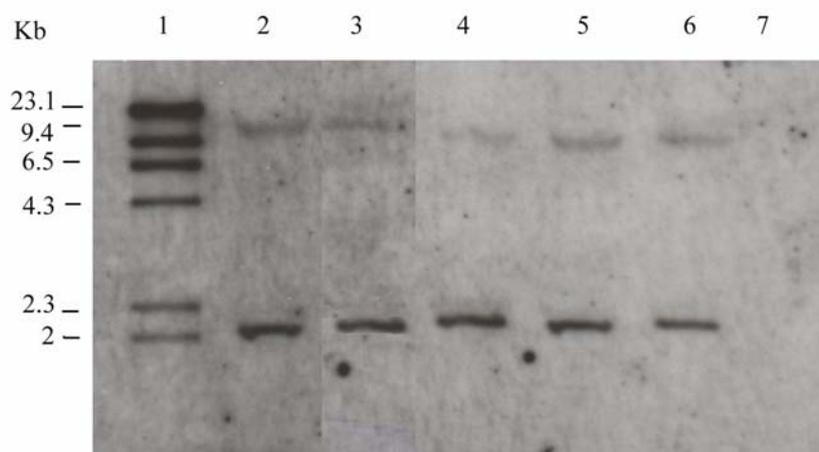


Figura 3.2. Detección de señales de hibridación en el ADN genómico de *B. japonicum*.

Como sonda de hibridación se utilizó un fragmento de 3 kb que contenía el gen *lacZ* de pSUP3535. El ADN genómico se digirió con *SacI*. Carriles: 1, marcador de tamaño molecular II marcado con digoxigenina; 2, cepa 0602; 3, cepa 1204; 4, cepa 1305; 5, cepa 1108; 6, cepa 0715; y 7, cepa USDA110. Como marcador se empleó el genoma del fago λ digerido con *HindIII* y tratado con digoxigenina. Se indica, en kb, el tamaño de los fragmentos.

3.1.1.2. Expresión de la fusión P_{napE} -*lacZ* en diferentes fondos genéticos

Para estudiar la actividad β -galactosidasa correspondiente a la expresión de la fusión P_{napE} -*lacZ*, las cepas de *B. japonicum* 0602, 1204, 1305, 1108 y 0715 se cultivaron aeróbicamente en medio PSY y se incubaron en medio YEM y YEMN, tanto en aerobiosis como en microaerobiosis (Tabla 3.1). Cuando las células se incubaron aeróbicamente todas las cepas mostraron niveles basales de actividad β -galactosidasa. La actividad incrementó casi 3 veces cuando la cepa parental 0602 se incubó en microaerobiosis, y unas 12 veces cuando el nitrato estuvo presente durante la incubación microaeróbica. Independientemente de la presencia de nitrato en el medio, no se detectó incremento de actividad β -galactosidasa cuando las cepas 1204, 1305 y 1108 se incubaron en microaerobiosis. Aunque la actividad de la cepa 0715 incrementó 2,4 veces cuando las células se incubaron en microaerobiosis, la presencia de nitrato no produjo aumentos posteriores de actividad.

Tabla 3.1. Actividad β -galactosidasa de la fusión P_{napE} -*lacZ* en diferentes fondos genéticos de *B. japonicum*. Las células se cultivaron aeróbicamente en PSY y, posteriormente, se incubaron en medio YEM y YEMN, tanto en aerobiosis como en microaerobiosis. Los valores de actividad se expresan en unidades Miller y representan la media de, al menos, tres repeticiones, seguida de la desviación estándar. Los experimentos se repitieron, al menos, dos veces.

Cepa	Genotipo	Actividad β -galactosidasa (P_{napE} - <i>lacZ</i>)		
		Aerobiosis	Microaerobiosis	
		\pm KNO ₃	- KNO ₃	+ KNO ₃
0602	P_{napE} - <i>lacZ</i>	245 \pm 32	690 \pm 75	2.939 \pm 131
1204	P_{napE} - <i>lacZ fixL</i>	145 \pm 20	124 \pm 11	146 \pm 20
1305	P_{napE} - <i>lacZ fixJ</i>	134 \pm 14	127 \pm 18	148 \pm 16
1108	P_{napE} - <i>lacZ fixK₂</i>	202 \pm 17	163 \pm 15	169 \pm 13
0715	P_{napE} - <i>lacZ nnrR</i>	306 \pm 32	732 \pm 85	730 \pm 28

3.1.1.3. Detección de NapA y actividad nitrato reductasa

Para la detección de la proteína NapA en *B. japonicum*, las células se cultivaron aeróbicamente en PSY para obtener masa y luego se incubaron microaeróbicamente, durante 4 días, en medio YEMN y YEMN2. Después del aislamiento de la fracción soluble, su transferencia a membranas de Immobilon-P y posterior tratamiento con anticuerpos anti-NapA de *P. pantotrophus*, la banda correspondiente a la proteína NapA de 90 kDa fue claramente visible en la cepa parental, así como en las cepas mutantes 0609 y GRK308 incubadas en ambos medios (Figura 3.3, carriles 1, 3 y 4, respectivamente). La presencia de NapA se redujo considerablemente en las cepas GRC131 y 8678 (Figura 3.3, carriles 5 y 6, respectivamente) y no se detectó en la cepa GRPA1 (Figura 3.3, carril 2).

Independientemente del medio de incubación, la actividad nitrato reductasa de las cepas USDA110 y 0609 fue similar, próxima a los 50 nmol de NO₂⁻/mg proteína x h (Tabla 3.2). La actividad disminuyó considerablemente en la cepa GRK308 y apenas se detectó en las cepas GRPA1 y GRC131 (Tabla 3.2).

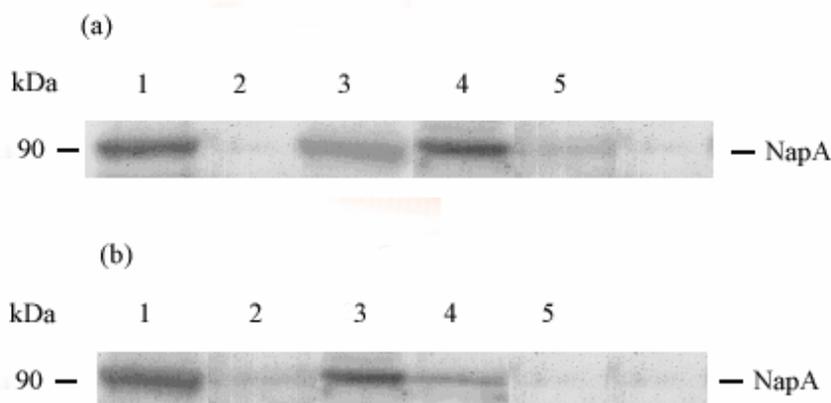


Figura 3.3. Inmunodetección de la proteína NapA en *B. japonicum*. Las células se cultivaron aeróbicamente en medio PSY y, posteriormente, se incubaron, en microaerobiosis, en medio YEMN (a) y YEMN2 (b), respectivamente. Carriles: 1, cepa USDA110; 2, cepa GRPA1; 3, cepa 0609; 4, cepa GRK308; 5, cepa GRC131; y 6, cepa 8678. Se utilizaron anticuerpos anti-NapA de *P. pantotrophus*. Cada carril contenía 25 microgramos de proteína. Se indica, en kDa, el tamaño molecular de NapA.

Tabla 3.2. Actividad nitrato reductasa en diferentes cepas de *B. japonicum*. Las células se cultivaron aeróbicamente en PSY y, posteriormente, se incubaron microaeróbicamente en medio YEMN y YEMN2. Los valores de actividad se expresan en nanomoles de nitrito producido/mg proteína x h y representan la media de, al menos, tres repeticiones, seguida de la desviación estándar. Los experimentos se repitieron, al menos, dos veces.

Cepa	Genotipo	YEMN	YEMN2
USDA110	Cepa parental	50 ± 4	48 ± 4
GRPA1	<i>napA</i>	4 ± 0,8	2 ± 0,2
0609	<i>napC</i>	48 ± 3	49 ± 4
GRK308	<i>nirK</i>	34 ± 2	24 ± 3
GRC131	<i>norC</i>	No detectada	No detectada
8678	<i>nnrR</i>	No detectada	No detectada

3.2. Regulación por óxidos de nitrógeno

3.2.1. Construcción de fusiones transcripcionales P_{napE} -*lacZ*, P_{nirK} -*lacZ* y P_{norc} -*lacZ*

Para estudiar el efecto de cada óxido de nitrógeno (NO_x), nitrato, nitrito, óxido nítrico y óxido nitroso, en la expresión de los genes de la desnitrificación, cada una de las cepas mutantes GRPA1, GRK308 y GRC131, se transformó, mediante cruces biparentales, con cada uno de los plásmidos pBG0614, pRJ2498 y pRJ2499, que contienen las fusiones transcripcionales P_{napE} -*lacZ*, P_{nirK} -*lacZ* y P_{norc} -*lacZ*, respectivamente, empleándose tetraciclina para la selección de transconjugantes. La transformación de la cepa GRPA1 con cada una de las fusiones dio lugar a las cepas 0603, 0604 y 0605, respectivamente, la de GRK308 a las cepas 0107, 0108 y 0109, respectivamente, y la de GRC131 a las cepas 0407, 0408 y 0409, respectivamente. La cointegración de la fusión en el cromosoma se comprobó mediante hibridación, usando como sonda el fragmento *EcoRI/NotI* de 3 kb de pSUP3535, que contiene el gen *lacZ*, y ADN genómico de las transconjugantes que contenían la fusión P_{napE} -*lacZ* o P_{norc} -*lacZ* digerido con *SacI*, y la fusión P_{nirK} -*lacZ* digerido con *EcoRV*. Mientras que en las cepas con la fusión P_{napE} -*lacZ* se detectaron dos señales de hibridación de 2 kb y 11,6 kb (Figura 3.4, carriles 2, 5 y 8, respectivamente), en las cepas con la fusión P_{nirK} -*lacZ* se observaron dos bandas de 5,7 y 9,5 kb (Figura 3.4, carriles 3, 6, y 9, respectivamente), y en las cepas con la fusión P_{norc} -*lacZ* se identificaron dos señales de 2,5 y 9,9 kb (Figura 3.4, carriles 4, 7 y 10, respectivamente). No se detectó señal de hibridación en el genoma de USDA110 (Figura 3.4, carril 11).

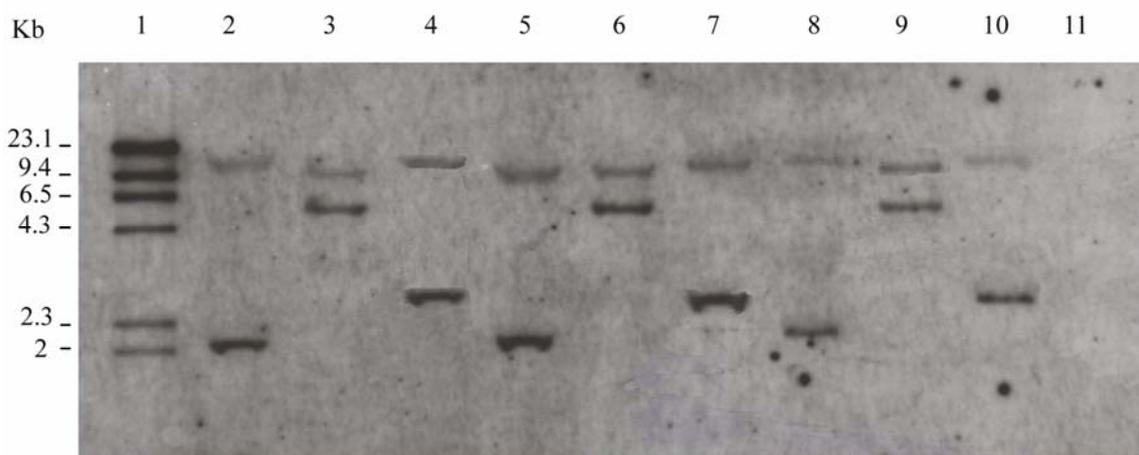


Figura 3.4. Detección de señales de hibridación en el ADN genómico de *B. japonicum*.

Como sonda de hibridación se utilizó un fragmento *EcoRI/NotI* de 3 kb que contenía el gen *lacZ* de pSUP3535. El ADN genómico de las cepas que contenían las fusiones P_{napE} -*lacZ* y P_{norC} -*lacZ* se digirió con *SacI* y el que contenía la fusión P_{nirK} -*lacZ* con *EcoRV*. Carriles: 1, marcador de tamaño molecular II marcado con digoxigenina; 2, cepa 0603; 3, cepa 0107; 4, cepa 0407; 5, cepa 0604; 6, cepa 0108; 7, cepa 0408; 8, cepa 0605; 9, cepa 0109, 10, cepa 0409 y 11, cepa USDA110. El marcador de tamaño molecular fue el genoma del fago λ digerido con *HindIII* y marcado con digoxigenina. Se indica, en kb, el tamaño de los fragmentos.

3.2.2. Actividad β -galactosidasa de las fusiones P_{napE} -*lacZ*, P_{nirK} -*lacZ* y P_{norC} -*lacZ* en diferentes fondos genéticos

Las cepas con las fusiones P_{napE} -*lacZ*, P_{nirK} -*lacZ* y P_{norC} -*lacZ* se cultivaron aeróbicamente en PSY y, posteriormente, se incubaron en medio YEM y YEMN, tanto en aerobiosis como en anoxia. Tras el periodo de incubación, el ensayo de actividad β -galactosidasa reveló que las cepas que contenían la fusión P_{napE} -*lacZ* apenas expresaban actividad cuando se cultivaron en condiciones aeróbicas (Tabla 3.3). Excepto en la mutante 0407, la limitación de oxígeno incrementó ligeramente los valores de actividad y la presencia de nitrato en el medio multiplicó por 7 el valor medio de β -galactosidasa (Tabla 3.3). Igualmente, el cultivo en microaerobiosis de las cepas que contenían la fusión P_{nirK} -*lacZ*, incrementó la actividad unas 2,5 veces, aproximadamente, respecto a los valores obtenidos en aerobiosis (Tabla 3.4). En presencia de nitrato se produjo un aumento de actividad de unas 18 veces en las cepas 2498 y 0604, y de 7,6 veces en la cepa 0108. De nuevo, no se detectaron variaciones de actividad en la cepa mutante *norC* 0408. Cuando las cepas que contenían la fusión P_{norC} -*lacZ* se incubaron en microaerobiosis, se detectó un incremento de actividad que varió entre 1,4 y 3,4 veces respecto al valor calculado en condiciones de cultivo aeróbicas (Tabla 3.5). Cuando se incubaron en presencia de nitrato, la actividad β -galactosidasa incrementó unas 42 veces en el caso de la cepa parental 2499, pero no se detectó incremento significativo en ninguna de las otras cepas.

El número de células viables de la cepa 0407 disminuyó de 142×10^{10} a 60×10^9 tras el periodo de incubación. Resultados similares se obtuvieron en las cepas 0408 y 0409, incubadas en las mismas condiciones.

Tabla 3.3. Actividad β -galactosidasa de la fusión P_{napE} - $lacZ$ en diferentes fondos genéticos de *B. japonicum*. Las células se cultivaron aeróbicamente en PSY y, posteriormente, se incubaron en medio YEM y YEMN tanto en aerobiosis como en microaerobiosis. Los valores de actividad se expresan en unidades Miller y representan la media de, al menos, tres repeticiones, seguida de la desviación estándar. Los experimentos se repitieron, al menos, dos veces.

Cepa	Genotipo	Actividad β -galactosidasa (P_{napE} - $lacZ$)		
		Aerobiosis	Microaerobiosis	
		\pm KNO ₃	- KNO ₃	+ KNO ₃
0602	P_{napE} - $lacZ$ parental	584 \pm 62	551 \pm 32	3.722 \pm 217
0603	P_{napE} - $lacZ$ <i>napA</i>	450 \pm 45	605 \pm 5	2.116 \pm 133
0107	P_{napE} - $lacZ$ <i>nirK</i>	485 \pm 32	732 \pm 88	2.276 \pm 289
0407	P_{napE} - $lacZ$ <i>norC</i>	505 \pm 38	416 \pm 18	497 \pm 3

Tabla 3.4. Actividad β -galactosidasa de la fusión P_{nirK} - $lacZ$ en diferentes fondos genéticos de *B. japonicum*. Las células se cultivaron aeróbicamente en PSY y, posteriormente, se incubaron en medio YEM y YEMN tanto en aerobiosis como en microaerobiosis. Los valores de actividad se expresan en unidades Miller y representan la media de, al menos, tres repeticiones, seguida de la desviación estándar. Los experimentos se repitieron, al menos, dos veces.

Cepa	Genotipo	Actividad β -galactosidasa (P_{nirK} - $lacZ$)		
		Aerobiosis	Microaerobiosis	
		\pm KNO ₃	- KNO ₃	+ KNO ₃
2498	P_{nirK} - $lacZ$ parental	148 \pm 12	334 \pm 81	2740 \pm 131
0604	P_{nirK} - $lacZ$ <i>napA</i>	130 \pm 11	351 \pm 50	2403 \pm 341
0108	P_{nirK} - $lacZ$ <i>nirK</i>	197 \pm 18	366 \pm 23	1495 \pm 161
0408	P_{nirK} - $lacZ$ <i>norC</i>	145 \pm 16	388 \pm 36	427 \pm 46

Tabla 3.5. Actividad β -galactosidasa de la fusión P_{norC} - $lacZ$ en diferentes fondos genéticos de *B. japonicum*. Las células se cultivaron aeróbicamente en PSY y, posteriormente, se incubaron en medio YEM y YEMN tanto en aerobiosis como en microaerobiosis. Los valores de actividad se expresan en unidades Miller y representan la media de, al menos, tres repeticiones, seguida de la desviación estándar. Los experimentos se repitieron, al menos, dos veces.

Cepa	Genotipo	Actividad β -galactosidasa (P_{norC} - $lacZ$)		
		Aerobiosis		Microaerobiosis
		\pm KNO ₃	- KNO ₃	+ KNO ₃
2499	P_{norC} - $lacZ$ parental	137 \pm 12	264 \pm 25	5.809 \pm 65
0605	P_{norC} - $lacZ$ <i>napA</i>	139 \pm 15	475 \pm 26	459 \pm 14
0109	P_{norC} - $lacZ$ <i>nirK</i>	169 \pm 15	478 \pm 15	423 \pm 32
0409	P_{norC} - $lacZ$ <i>norC</i>	157 \pm 13	223 \pm 10	333 \pm 27

3.2.3. Efecto del nitrito en la actividad β -galactosidasa de las fusiones P_{napE} - $lacZ$, P_{nirK} - $lacZ$, y P_{norC} - $lacZ$

Para estudiar el efecto del nitrito en la actividad β -galactosidasa de las fusiones P_{napE} - $lacZ$, P_{nirK} - $lacZ$, y P_{norC} - $lacZ$, las cepas 0602, 2498 y 2499, junto con sus mutantes derivadas 0107, 0108 y 0109 se cultivaron en PSY y, posteriormente, se incubaron en medio YEM y YEMN2, tanto en aerobiosis como en microaerobiosis (Tabla 3.6). Respecto a los niveles basales de actividad obtenidos en los cultivos aeróbicos, la limitación de oxígeno no incrementó la actividad de manera significativa. Sin embargo, la presencia de nitrito en el medio microaerobio aumentó la actividad de forma considerable, excepto en la cepa 0109, en la que no se registró ningún aumento de los valores de actividad β -galactosidasa.

Tabla 3.6. Actividad β -galactosidasa de las fusiones $P_{napE-lacZ}$, $P_{nirK-lacZ}$, y $P_{norC-lacZ}$ en diferentes fondos genéticos de *B. japonicum*. Las células se cultivaron aeróbicamente en PSY y, posteriormente, se incubaron en medio YEM y YEMN2 tanto en aerobiosis como en microaerobiosis. Los valores de actividad se expresan en unidades Miller y representan la media de, al menos, tres repeticiones, seguida de la desviación estándar. Los experimentos se repitieron, al menos, dos veces.

Cepa	Genotipo	Actividad β -galactosidasa		
		Aerobiosis	Microaerobiosis	
		YEM \pm NO ₂ -	YEM	YEMN2
0602	$P_{napE-lacZ}$ parental	131 \pm 12	314 \pm 44	2.188 \pm 106
0107	$P_{napE-lacZ}$ <i>nirK</i>	143 \pm 15	239 \pm 39	1.152 \pm 110
2498	$P_{nirK-lacZ}$ parental	244 \pm 19	212 \pm 11	1.205 \pm 130
0108	$P_{nirK-lacZ}$ <i>nirK</i>	232 \pm 24	No detectada	565 \pm 34
2499	$P_{norC-lacZ}$ parental	162 \pm 12	216 \pm 13	1.185 \pm 110
0109	$P_{norC-lacZ}$ <i>nirK</i>	142 \pm 14	179 \pm 12	216 \pm 11

3.2.4. Efecto del nitroprusiato sódico en la expresión de las fusiones $P_{napE-lacZ}$, $P_{nirK-lacZ}$ y $P_{norC-lacZ}$

Para estudiar el efecto del óxido nítrico (NO) en la actividad β -galactosidasa, las células de la cepa 0602 de *B. japonicum* se incubaron microaeróbicamente en medio YEMN suplementado con distintas concentraciones de nitroprusiato sódico (SNP), compuesto que se utilizó como agente productor de NO (Butler y Megson, 2002). La actividad β -galactosidasa disminuyó al aumentar la concentración de SNP en el medio, y no se detectó actividad a concentraciones de SNP superiores a 40 μ M (Tabla 3.7). El efecto del SNP sobre la actividad β -galactosidasa de las fusiones $P_{nirK-lacZ}$ y $P_{norC-lacZ}$ fue similar al descrito para la fusión $P_{napE-lacZ}$ (no se presentan los resultados).

Tabla 3.7. Efecto del nitroprusiato sódico (SNP) en la actividad β -galactosidasa de la fusión P_{napE} -*lacZ*. Las células se cultivaron aeróbicamente en PSY y, posteriormente, se incubaron microaeróbicamente en medio YEMN. Los valores de actividad β -galactosidasa se expresan en unidades Miller y representan la media de, al menos, tres repeticiones, seguida de la desviación estándar. Los experimentos se repitieron, al menos, dos veces.

Concentración de SNP (μ M)	Actividad β -galactosidasa	
	- KNO ₃	+ KNO ₃
0	327 \pm 43,71	2796 \pm 265
SNP 2 μ M	405 \pm 54,71	1667 \pm 103
SNP 4 μ M	286 \pm 29,36	1769 \pm 137
SNP 10 μ M	248 \pm 11,34	555 \pm 80,57
SNP 20 μ M	234 \pm 27,64	220 \pm 10,77
SNP 40 μ M	214 \pm 14,56	210 \pm 34,65
SNP 100 μ M	No detectada	No detectada

3.2.5. Efecto del nitroprusiato sódico en el número de células viables

Para estudiar el efecto del SNP sobre la viabilidad celular, se tomaron alícuotas de las células de *B. japonicum* 0602 incubadas microaeróbicamente en medio YEMN, se prepararon diluciones seriadas al décimo y se sembraron en placas Petri que contenían medio PSY suplementado con los antibióticos correspondientes. La presencia de SNP en el medio impidió el crecimiento celular, ya que sólo en su ausencia se produjo un incremento en el número de unidades formadoras de colonias (UFC) al final de la incubación (Tabla 3.8).

Tabla 3.8. Efecto del nitroprusiato sódico (SNP) en el número de células viables de *B. japonicum* 0602. Las células se cultivaron aeróbicamente en PSY y, posteriormente, se incubaron microaeróbicamente en medio YEMN. Se tomaron alícuotas al inicio y al final de la incubación. Los valores se expresan en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml), se obtuvieron tras el conteo de colonias aparecidas al comienzo ($t = 0$) y al final ($t = 4$ días) de la incubación en condiciones microaeróbicas, tanto en YEM como en YEMN. Los experimentos se repitieron, al menos, dos veces.

Concentración de SNP (μM)	Unidades formadoras de colonias ($\text{UFC} \times 10^{10}$)/ml Tiempo de incubación (horas)	
	0	96
0	234	2.840
2	214	83
4	239	65
10	216	56
20	208	23
40	254	16
100	224	5

3.2.6. Producción de óxido nítrico

Para analizar la producción de óxido nítrico, la cepa parental USDA110 y las cepas mutantes *nnrR* 8678 y *norC* GRC131 se cultivaron aeróbicamente en PSY y, posteriormente, se incubaron microaeróbicamente en YEMN durante 4 días. La detección amperométrica de óxido nítrico reveló la producción del mismo por las cepas 8678 y GRC131, mientras que no se detectó su producción por la cepa USDA110 (Tabla 3.9). La tasa de liberación al medio de óxido nítrico de la cepa GRC131 fue 13 veces mayor que la de la cepa 8678.

Tabla 3.9. Producción de óxido nítrico por diferentes cepas de *B. japonicum*. Las células se cultivaron aeróbicamente en PSY y, posteriormente, se incubaron microaeróbicamente en YEMN durante 4 días. La reacción se inició adicionando 100 μ l de suspensión celular (3 mg/ml de proteína) a la mezcla de reacción. Los valores se expresan en nmoles de NO/ mg proteína x h, y representan la media de, al menos, tres repeticiones, seguida de la desviación estándar. Los experimentos se repitieron, al menos, dos veces.

Cepa	Genotipo	Producción de NO
USDA 110	Cepa parental	No detectada
8678	<i>nnrR</i>	24 \pm 4
GRC131	<i>norC</i>	314 \pm 13

3.2.7. Experimentos de cocultivo

Para estudiar el efecto del óxido nítrico producido por el propio *B. japonicum*, se llevaron a cabo experimentos de cocultivo, en los que se mezclaron, en diversas proporciones, suspensiones celulares de la cepas mutantes *nirK* 0109, que contiene la fusión P_{norC} -*lacZ*, y *norC* GRC131, que se utilizó como fuente de óxido nítrico. Mientras que no se detectó actividad β -galactosidasa cuando la cepa 0109 se incubó en ausencia de la cepa GRC131, la actividad incrementó al aumentar el número de células de la cepa GRC131 presentes en el medio. Posiblemente, cuando la proporción fue muy elevada (GRC131:0109, 1:4), el óxido nítrico acumulado en el medio de incubación fue tóxico para *B. japonicum* 0109 (Tabla 3.10).

Tabla 3.10. Efecto del óxido nítrico en la expresión de actividad β -galactosidasa de *B. japonicum* 0109 cuando se cocultiva con la cepa GRC131. Las células se cultivaron en medio PSY, se mezclaron en diferentes proporciones hasta alcanzar una DO_{600} de 0,2 y se incubaron microaeróbicamente en medio YEMN. Las proporciones finales de las células de las cepas GRC131 y 0109 se calcularon utilizando como dato el número de células viables aparecidas después de tomar alícuotas y sembrar las diluciones adecuadas en medio PSY que contenía bien kanamicina, al que es resistente la cepa GRC131, o bien espectinomicina y estreptomycinina, antibióticos a los que resiste la cepa 0109. Los valores de actividad β -galactosidasa se expresan en unidades Miller y representan la media de tres repeticiones, seguida de la desviación estándar. Los experimentos se repitieron, al menos, dos veces.

Proporción inicial (GRC131:0109)	Proporción final (GRC131:0109)	OD_{600} final	Actividad β -galactosidasa
1:0	1:0	0,236	0,0
2:1	1:1.2	0,359	1.172 \pm 80
4:1	1:0.4	0,349	1.796 \pm 77
1:2	1:0.8	0,395	1.947 \pm 81
1:4	1:3.2	0,350	1.158 \pm 85
0:1	0:1	0,209	323 \pm 32

3.2.8. Efecto del óxido nítrico en la expresión de la fusión P_{norC} -*lacZ*

Para estudiar el efecto del óxido nítrico en la expresión de los genes *norCBQD*, la cepa parental 2499 y la mutante *nosZ* 0304, que contienen la fusión P_{norC} -*lacZ*, se incubaron microaeróbicamente en presencia de nitrato durante 96 h. Los niveles de actividad β -galactosidasa fueron similares en ambas cepas (Tabla 3.11). Sin embargo, no se detectó actividad promotora en las células de la cepa parental cuando se incubaron con concentraciones de óxido nítrico que oscilaron de 0,1 mM a 5 mM, y el óxido nítrico no afectó el crecimiento de la cepa 2499 (no se muestran los resultados).

Tabla 3.11. Actividad β -galactosidasa de la fusión P_{norC} -*lacZ* en diferentes fondos genéticos de *B. japonicum*. Las células se cultivaron aeróbicamente en PSY y, posteriormente, se incubaron en medio YEM y YEMN, tanto en aerobiosis como en microaerobiosis. Los valores de actividad se expresan en unidades Miller y representan la media de, al menos, tres repeticiones, seguida de la desviación estándar. Los experimentos se repitieron, al menos, dos veces.

Cepa	Genotipo	Actividad β -galactosidasa	
		Microaerobiosis	
		- KNO ₃	+ KNO ₃
2499	P_{norC} - <i>lacZ</i> parental	163 \pm 15	2.550 \pm 183
0304	P_{norC} - <i>lacZ nosZ</i>	252 \pm 19	2.292 \pm 157

3.2.9. Efecto de los óxidos de nitrógeno en la detección de NorC

Para detectar citocromos del tipo *c* en membranas de *B. japonicum*, las células se cultivaron, primero, en aerobiosis y, posteriormente, se incubaron en microaerobiosis en medio YEMN y YEMN2. En contraste con la cepa USDA110 (Figura 3.5a, carril 1), no se detectó la banda correspondiente al citocromo NorC de 16 kDa en la cepa GRPA1 incubada con nitrato (Figura 3.5a, carril 2) mientras que fue claramente visible cuando las células se incubaron en presencia de nitrito (Figura 3.5a, carril 3). La banda correspondiente a NorC tampoco se detectó en la cepa GRK308 incubada con nitrito (Figura 3.5b, carril 2), pero sí estuvo presente en las células de la cepa parental (Figura 3.5b, carril 1). Como era de esperar no se observó NorC en las membranas de la cepa GRC131 incubadas con nitrato (Figura 3.5.c, carril 3), pero sí fue visible en las de la cepa GRB993 (Figura 3.5.c, carril 2). Mientras que no se observaron diferencias significativas en la intensidad de la señal de la mayoría de las bandas de proteína detectadas entre la parental y la mutante, la señal correspondiente a NorC fue menor en la mutante que en la parental (Figura 3.5c, carriles 2 y 1, respectivamente).

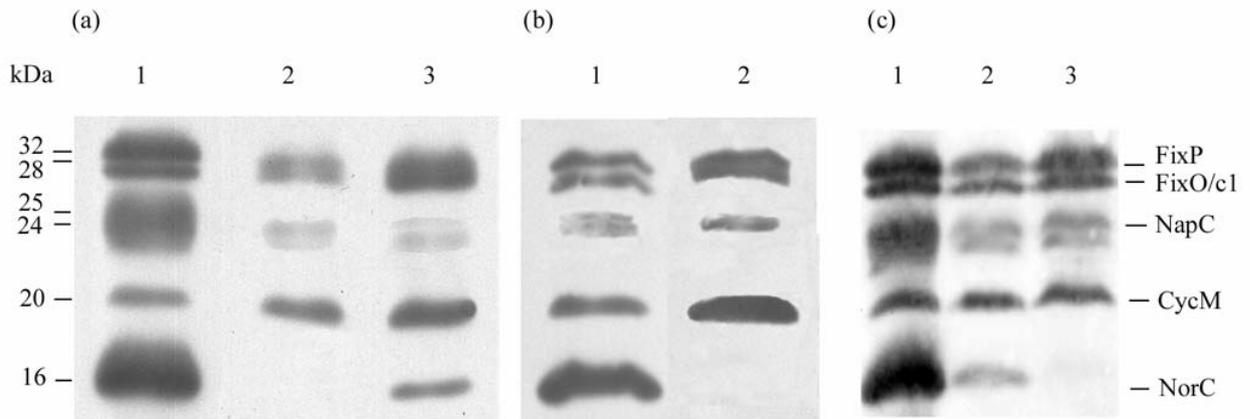


Figura 3.5. Detección de citocromo NorC en *B. japonicum*. A, membranas de las cepas USDA110 y *norC* GRPA1; B, membranas de la cepa *nirK* GRK308; y C, membranas de las cepas *norB* GRB993 y *norC* GRC131. Las células se cultivaron aeróbicamente en medio YEM, se recogieron por centrifugación y, posteriormente, se incubaron microaeróbicamente en YEMN (Figuras 3.5a, carriles 1 y 2; Figura 3.5c, carriles 1, 2 y 3) y YEMN2 (Figura 3.5a, carril 3; Figura 3.5b, carriles 1 y 2). Las proteínas se detectaron mediante la tinción de grupos hemo. Cada carril contenía 25 microgramos de proteína. Se indican los tamaños moleculares, en kDa, de los citocromos detectados, y a la derecha, los nombres de los identificados en estudios anteriores.

3.3. Efecto del gen *araC* en la expresión de los genes *napEDABC*

En el genoma de *B. japonicum* USDA110 (Kaneko et al. 2002), el marco abierto de lectura *bll7035* corresponde al gen *araC*, que se localiza 200 pares de bases en dirección 3'-5' de los genes *napEDABC*. Para estudiar la implicación de la proteína AraC en la expresión de los genes *nap*, se construyó una cepa mutante en *araC* de la manera que se describe en la Figura 3.6. En primer lugar, se obtuvo el plásmido pBG1801 mediante la clonación del fragmento *Bam*HI de 5 kb de pPM200P9134 en pBS KS(+). En segundo lugar, el fragmento *Hind*III/*Bam*HI de 1,6 kb de pBG1801 se clonó en pK18*mobsacB*, digerido con las mismas enzimas, para originar el plásmido pBG1802. El posterior aislamiento y clonación del fragmento *Sma*I de 2 kb de pHP45 Ω , el denominado fragmento ω que contiene el gen de resistencia a estreptomicina/espectinomicina, en pBG1802 digerido con *Nru*I, resultó en el plásmido pBG1803. Finalmente, pBG1803 se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* S17.1 que, a su vez, se utilizó como cepa donadora en cruces biparentales con *B. japonicum* USDA110 (Figura 3.6). Se seleccionaron primero transconjugantes resistentes a estreptomicina/espectinomicina y, posteriormente, aquellos sensibles a la kanamicina. La correcta estructura genómica de las transconjugantes se comprobó mediante hibridación de su ADN genómico digerido con *Sac*I con una sonda de ADN que contenía el fragmento Ω . Mientras que no se detectó ninguna señal de hibridación en el ADN de la cepa parental, se observó una señal de hibridación de 4 kb en el genoma de la cepa mutante (Figura 3.6, carriles 1 y 2, respectivamente). Se obtuvo así la cepa 1801 *B. japonicum*, que creció de manera similar a la parental cuando se cultivó microaeróbicamente en medio YEMN (Figura 3.7).

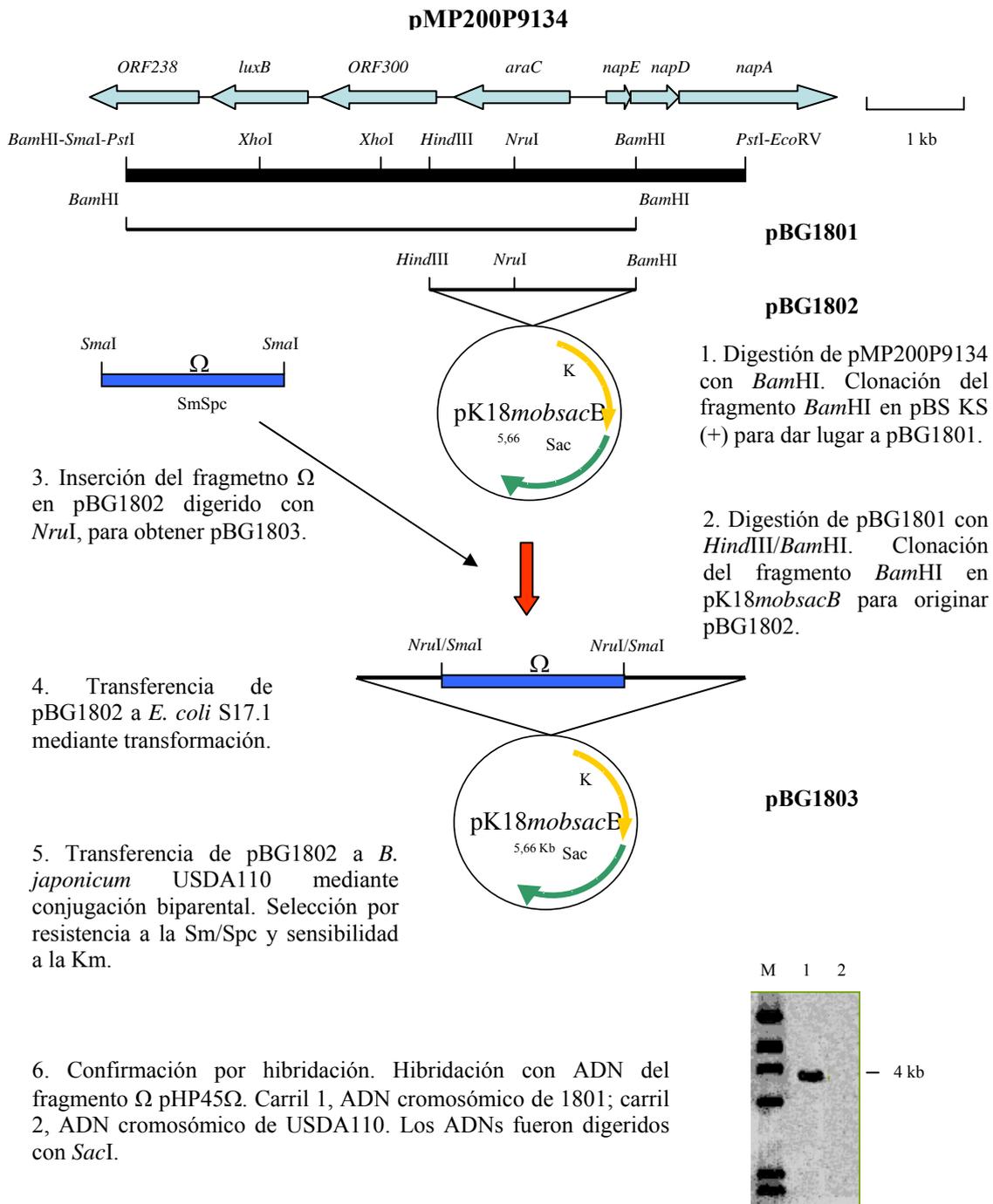


Figura 3.6. Estrategia para la construcción de la cepa mutante 1801 de *B. japonicum*. Se muestra la construcción de los plásmidos pBG1801, pBG1802 y pBG1803. Este último se transfirió, por cruce biparental, a *B. japonicum* USDA110 para obtener la cepa 1801. El ADN genómico se digirió con *Sac*I y se hibridó con el fragmento ω de pHP45Ω. Carriles: M, marcador de tamaño molecular II marcado con digoxigenina; 1, ADN genómico de *B. japonicum* 1801; 2, ADN genómico de *B. japonicum* USDA110. Como marcador se empleó el genoma del fago λ digerido con *Hind*III y tratado con digoxigenina. Se indica, en kb, el tamaño de los fragmentos.

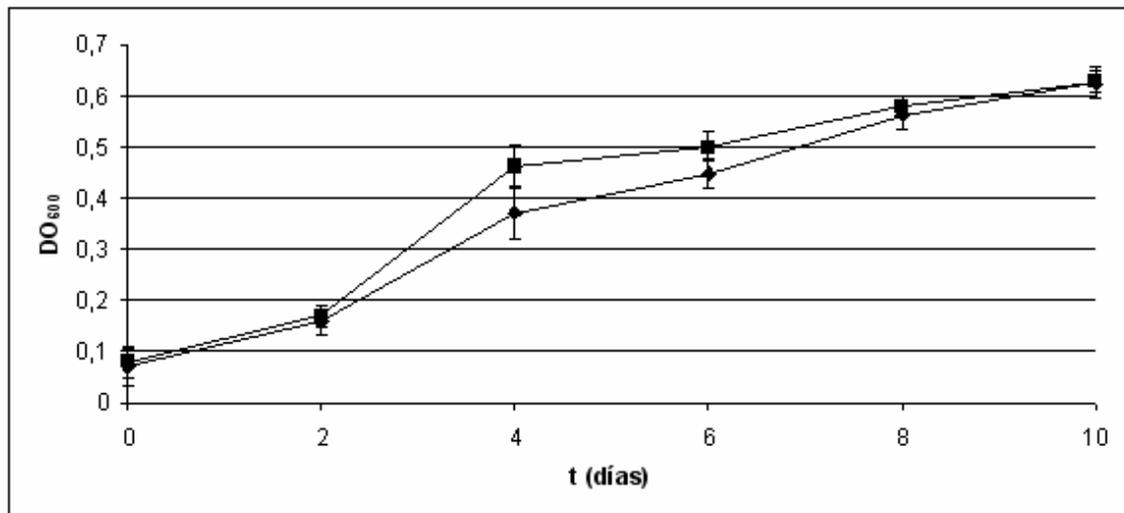


Figura 3.7. Curva de crecimiento de las cepas USDA110 y 1801 de *B. japonicum*. Las células se cultivaron anaeróbicamente en medio YEMN durante 10 días. Cepa USDA110 (◆); cepa 1801 (■). Se indica la desviación estándar para cada valor.

3.4. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NnrR

3.4.1. Construcción del vector de expresión

Para clonar el gen *nnrR* en el vector de expresión pET3a(+) se llevó a cabo la mutación puntual dirigida del plásmido pRJ8819 utilizando los oligonucleótidos *nnrRmut1B* y *nnrRmut2B*. De esta manera, la sustitución de una G, de una C y de una A en la secuencia original por una A, una G y una A dio lugar a la sustitución de un sitio de restricción *Bam*HI. Se obtuvo así el ADN de *nnrR* clonado en plásmido pBG0703 cuya secuencia se comprobó para garantizar tanto la presencia de la mutación como la ausencia de errores de lectura en la secuencia de *nnrR*. Posteriormente, el fragmento *Nde*I/*Bam*HI de 818 pb de pBG0703 se clonó en los sitios *Nde*I/*Bam*HI de pET3a(+), dando lugar al plásmido pBG0704 (Figura 3.8), que se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* BL21 (DE3).

3.4.2. Sobreexpresión de la proteína recombinante

3.4.2.1. Efecto del IPTG

Las células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con pBG0704 se incubaron a 37 °C hasta que el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ de 0,3 y, posteriormente, se cultivaron a 30 °C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,6, lo que coincidió con el inicio de la fase exponencial. Entonces, se tomaron alícuotas del cultivo, se suplementaron con 0,1, 0,2 y 0,4 mM de IPTG, respectivamente, y se incubaron a 30 °C durante 2 h. Después de la lisis celular mediante diferencias de presión, la electroforesis en PAGE-SDS reveló que la concentración aparente de NnrR fue similar, independientemente de la concentración de IPTG en el medio (Figura 3.9), por lo que se ha utilizado 0,1 mM de IPTG en experimentos posteriores. Se repitió el mismo protocolo manteniendo constante durante todo el proceso la temperatura de cultivo y de incubación a 37 °C, obteniéndose el mismo resultado respecto al obtenido a 30 °C (no se muestran los resultados).

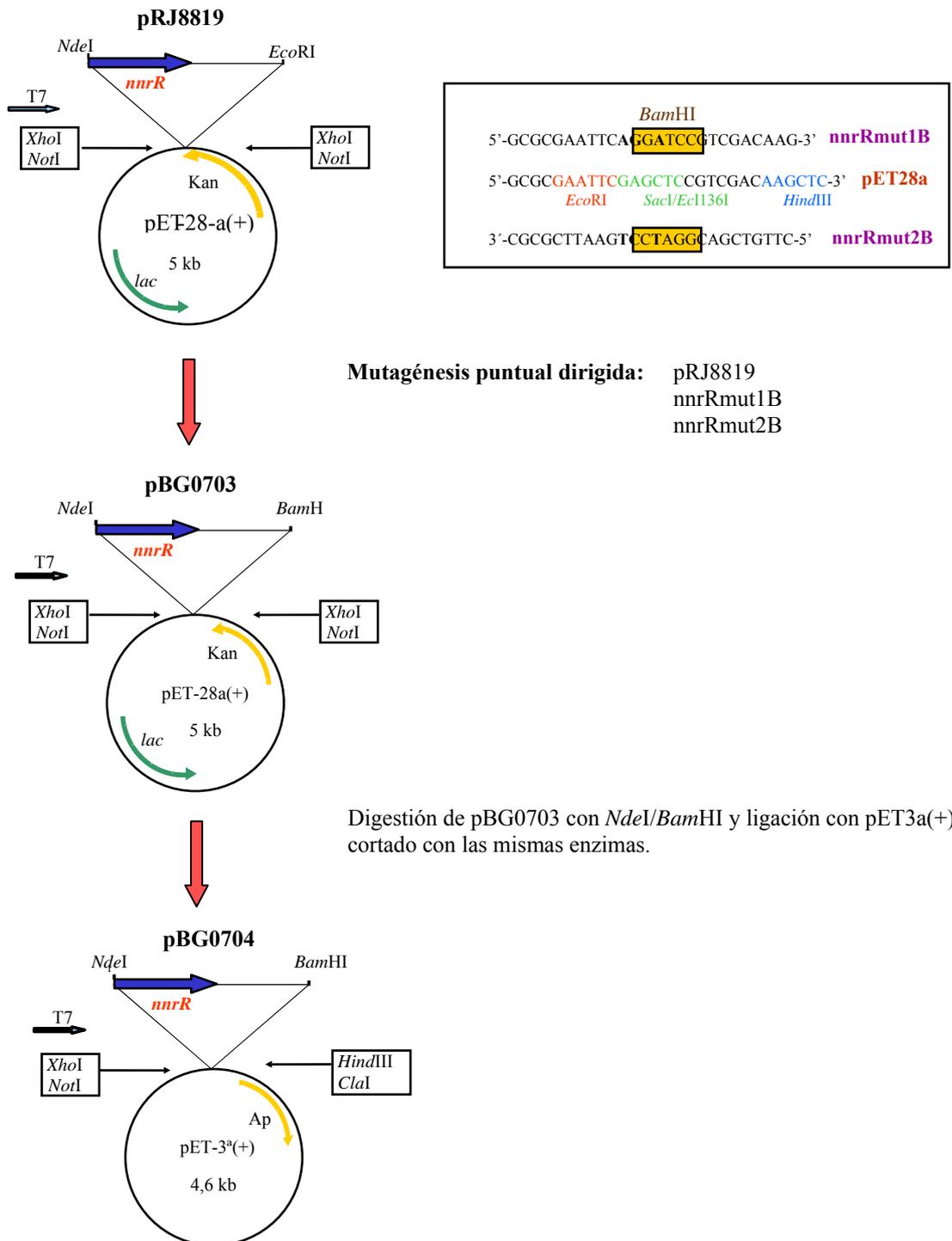


Figura 3.8. Estrategia para la construcción del plásmido pBG0704. En el recuadro superior se muestra la secuencia original donde se introdujo la mutación, con los nucleótidos sustituidos marcados en negrita. También se indican los oligonucleótidos nnrRmut1B y nnrRmut2B, que se utilizaron para introducir un sitio *BamHI* que aparece encerrado en un recuadro.

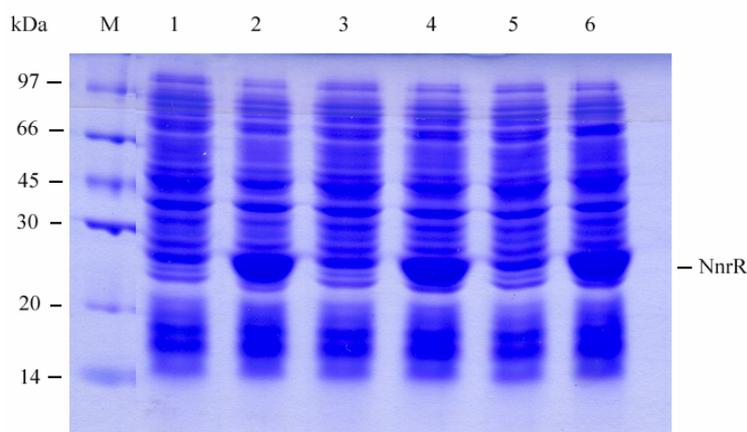


Figura 3.9. Efecto del IPTG en la expresión de NnrR. Las células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pBG0704 se cultivaron durante 2 h a 30 °C, se lisaron y el sobrenadante se sometió a electroforesis en PAGE-SDS. Carriles: M, proteínas marcadoras; 1, 3 y 5, extracto correspondiente a los cultivos celulares sin (carriles 1, 3 y 5); carril 2, sobrenadante de células incubadas con 0,1 mM de IPTG; carril 4, sobrenadante de células incubadas con 0,2 mM de IPTG; carril 6, sobrenadante de células incubadas con 0,4 mM de IPTG. Se indica, en kDa, el tamaño molecular de las proteínas marcadoras correspondientes al kit comercial LMW-SDS Marker[®] de Amersham. A la derecha se marca la banda correspondiente a la proteína NnrR. Cada carril se cargó con 10 µl de muestra. El gel se tiñó con azul Coomassie.

3.4.2.2. Efecto del tiempo de incubación

Para determinar el tiempo óptimo de incubación, las células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con pBG0704 se cultivaron de manera similar a la descrita en el apartado anterior. Una vez alcanzada una DO_{600} de 0,6, se adicionó 0,1 mM de IPTG a las distintas alícuotas y se incubaron a 30 °C durante 2, 3, 4 y 6 h, respectivamente. La detección, en cada caso, de la concentración aparente de NnrR en geles de SDS-PAGE demostró que la expresión de la proteína no aumentaba después de la incubación durante más de 2 h (Figura 3.10).

Resultados similares se obtuvieron cuando se expresó la proteína a 37 °C (datos no mostrados). De acuerdo con los resultados obtenidos, considerando que tiempos de incubación prolongados y las altas temperaturas pueden afectar la solubilidad de la proteína, la sobreexpresión de NnrR se llevó a cabo en células de *E. coli* BL21 (DE3) incubadas durante 2 h a 30 °C en presencia de 0,1 mM de IPTG.

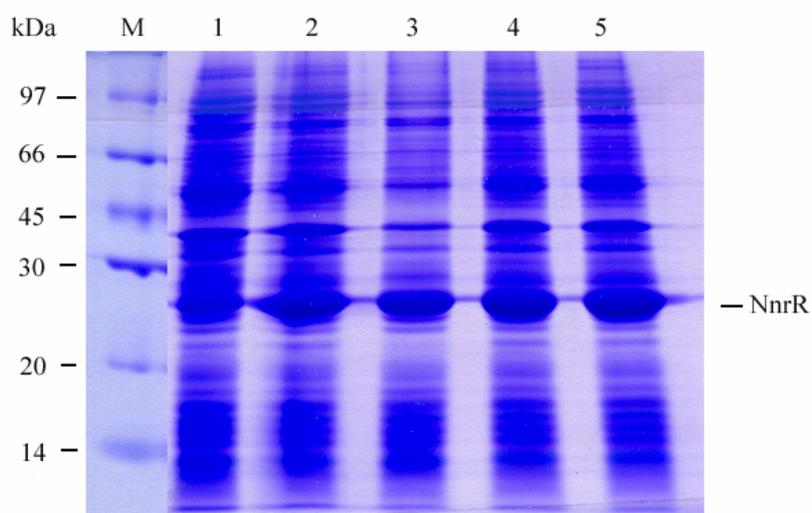


Figura 3.10. Efecto del tiempo de incubación en la expresión de NnrR. Las células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pBG0704 se cultivaron a 30 °C, en presencia de 0,1 mM de IPTG, durante 2, 3, 4 y 6 h, se lisaron y el sobrenadante se sometió a electroforesis en PAGE-SDS. Carriles: M, proteínas marcadoras; 1, sobrenadante de células incubadas durante 2 h sin adición de IPTG; 2, 3, 4 y 5, sobrenadantes de células incubadas durante 2, 3, 4 y 5 h, respectivamente. Se indica, en kDa, el tamaño molecular de las proteínas marcadoras correspondientes al kit comercial LMW-SDS Marker[®] de Amersham. A la derecha se marca la banda correspondiente a la proteína NnrR. Cada carril se cargó con 10 µl de muestra. El gel se tiñó con azul Coomassie.

3.4.3. Purificación de NnrR

Se han utilizado 400 ml de cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido pBG0704. Una vez lisadas las células, el sobrenadante obtenido tras la centrifugación a 45.000 r.p.m., se eluyó a través de una columna de intercambio iónico, se aplicó a una columna PD-10 y se recogió haciendo pasar solución estándar (SE, Tris-HCl 25 mM, NaCl 20 mM, pH 7,0) suplementada con 10 % de glicerol. El producto resultante se pasó a través de una columna de afinidad, se eluyó aplicando un gradiente de NaCl (20 mM-1M), y se recogió en fracciones de 1 ml.

La proteína no se detectó en el sedimento obtenido tras la centrifugación a 45.000 r.p.m. (no se muestra el resultado), pero apareció soluble en el sobrenadante libre de células resultante de la misma centrifugación (Figura 3.11, carril 3), y eluyó

casi en su totalidad tras la cromatografía de intercambio iónico, aunque aún aparecieron otras proteínas contaminantes (Figura 3.11, carril 4). Aunque la proteína quedó retenida en la columna de heparina, ya que no se detectó en la fracción correspondiente a 20 mM de NaCl (Figura 3.11, carril 6), eluyó a una concentración de 400 mM de NaCl (Figura 3.11, carril 7). El análisis densitométrico del gel reveló que NnrR estaba purificada a homogeneidad electroforética ya que el área correspondiente a la banda de proteína fue superior al 95%.

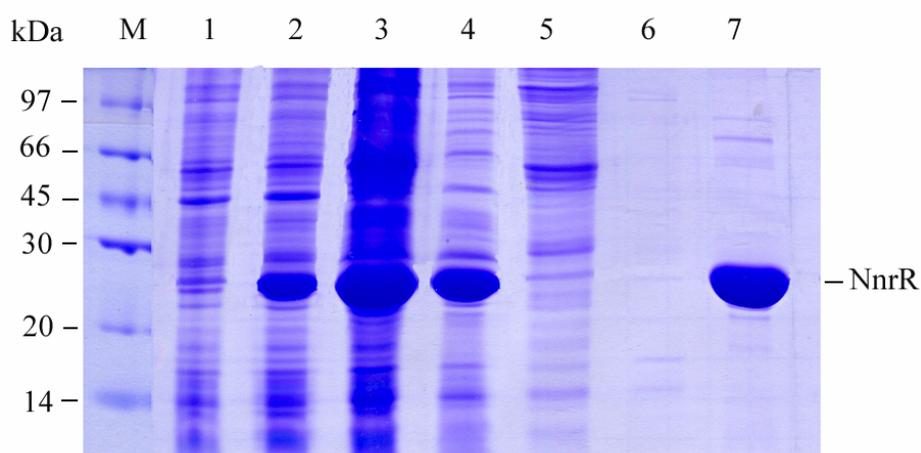


Figura 3.11 Purificación de NnrR. Las células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pBG0704 se cultivaron a 30 °C durante 2 h en presencia de 0.1 mM de IPTG. Posteriormente, las células se lisaron y el sobrenadante obtenido tras la centrifugación a 45.000 r.p.m. se sometió a electroforesis en PAGE-SDS. Carriles: M, proteínas marcadoras; 1, sobrenadante sin adición de IPTG; 2, sobrenadante del cultivo celular incubado 2 h con 0.1 mM de IPTG; 3, sobrenadante celular resultante de la rotura y centrifugación a 45.000 r.p.m. de *E. coli*; 4, eluido de la columna de intercambio iónico; 5, eluido de la columna tras la adición del tampón de resuspensión; 6, eluido de la columna de afinidad (20 mM NaCl); 7, fracción eluida de la columna de afinidad a 400 mM de NaCl. Se indica, en kDa, el tamaño molecular de las proteínas marcadoras correspondientes al kit comercial LMW-SDS Marker[®] de Amersham. A la derecha se marca la banda correspondiente a la proteína NnrR. Cada carril se cargó con 10 µl de muestra. El gel se tiñó con azul Coomassie.

3.4.4. Características de NnrR

3.4.4.1. Integridad de la estructura secundaria

Los experimentos de dicroísmo circular de muestras de la proteína NnrR purificada se llevaron a cabo en un espectropolarímetro J-600 de Jasco, a 25 °C. El espectro (Figura 3.12), indicó que la integridad de la proteína era suficiente para estudiar su estructura y funcionalidad. Para determinar la sensibilidad de NnrR a la temperatura, la proteína se calentó hasta 95 °C, se dejó enfriar a 25 °C, y se realizó entonces un nuevo espectro. Se puede observar (Figura 3.13) que después de calentar a 95 °C todavía hay proteína que no se ha desnaturalizado, si bien la mayoría ha perdido su integridad.

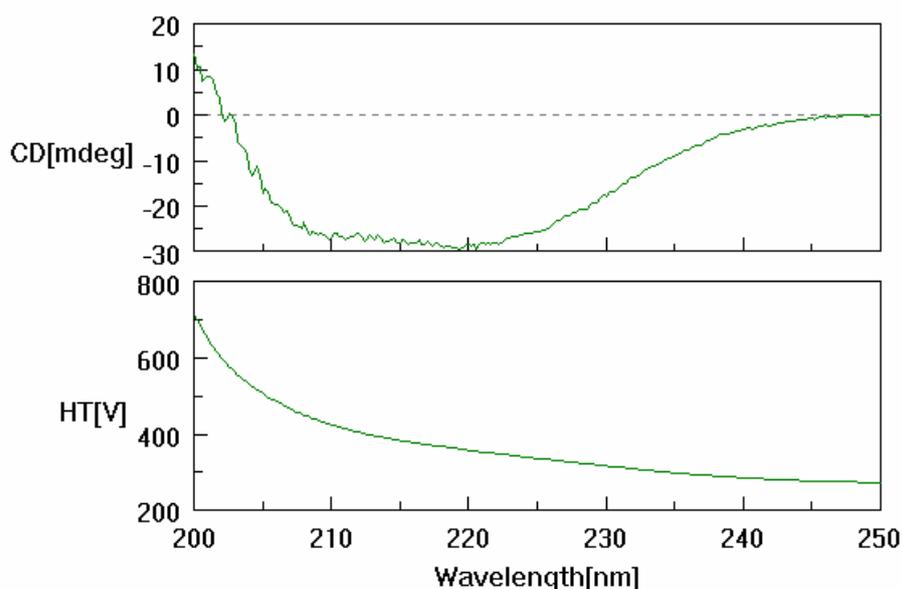


Figura 3.12. Espectro de dicroísmo circular de NnrR. En la parte superior se presenta el espectro expresado en elipticidad ($[\theta]$, mdeg x cm²/dmol), y en la parte inferior el correspondiente al voltaje de alta tensión (HT[V]). En ambos casos, el espectro corresponde a longitudes de onda comprendidas entre 200 y 250 nm. El experimento se repitió, al menos tres veces, con muestras de proteína (14 μ M) recién preparadas cada vez. La determinación se llevó a cabo a 25 °C en un espectropolarímetro Jasco, modelo J-600.

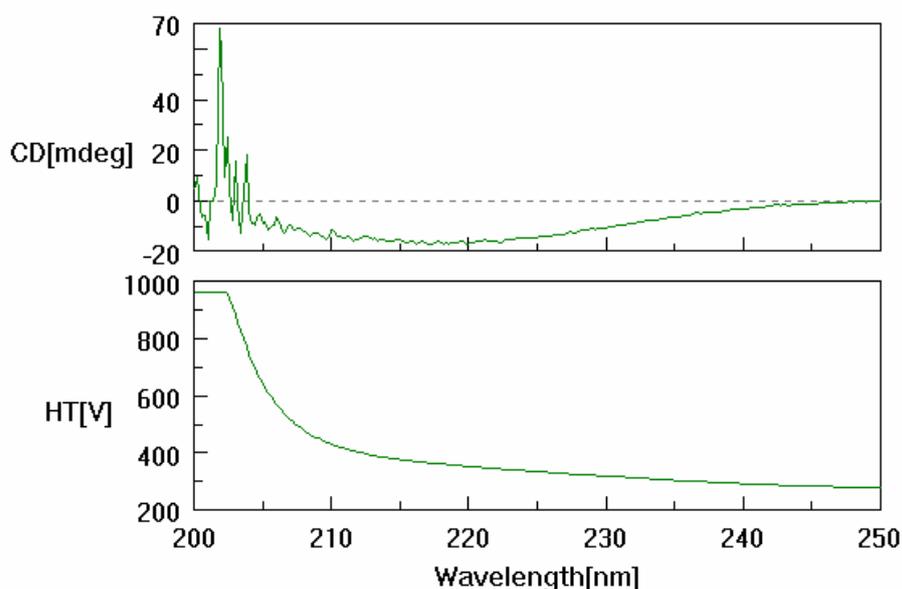


Figura 3.13. Espectro de dicroísmo circular de NnrR sobrecalentada. En la parte superior se presenta el espectro expresado en elipticidad ($[\theta]$, mdeg \times cm²/dmol), y en la parte inferior el correspondiente al voltaje de alta tensión (HT[V]). En ambos casos, el espectro corresponde a longitudes de onda comprendidas entre 200 y 250 nm. El experimento se repitió, al menos tres veces, con muestras de proteína (14 μ M) recién preparadas cada vez. El ensayo se realizó en tampón estandar a 25 °C, después de haber calentado la muestra a 95 °C. Se utilizó un espectropolarímetro Jasco, modelo J-600.

3.4.4.2. Coeficiente de extinción molar

El coeficiente de extinción molar de la proteína NnrR recombinante, a 280 nm (ϵ_{280}), fue de 0.81 [mg/ml]⁻¹cm⁻¹.

3.4.4.3. Masa molecular

La masa molecular de la especie predominante de la proteína NnrR, determinada mediante espectrometría de masas, fue de 25.731,0 Da (Figura 3.14). Este valor coincide con el de la masa molecular teórica que es de 25.869,6 Da.

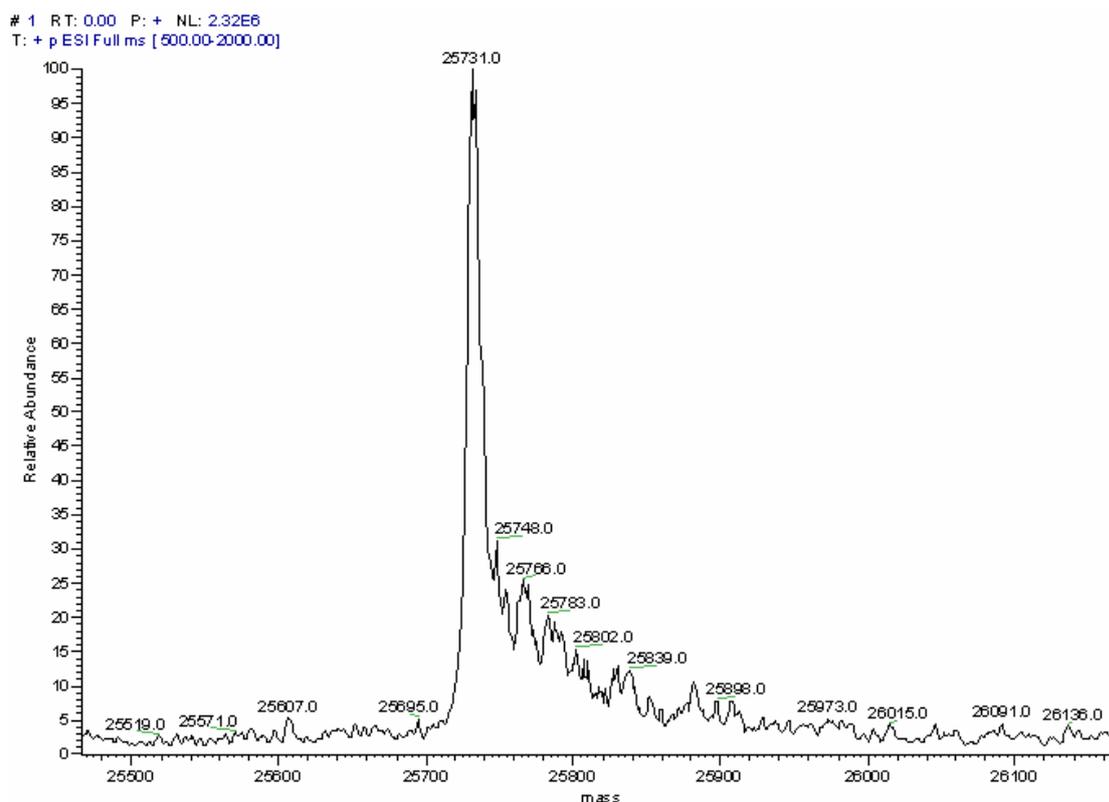


Figura 3.14. Espectrometría de masas de NnrR. La muestra se preparó a una concentración de 20 μM en una solución acetonitrilo:agua (1:1, v/v) suplementada con 0,2 % de ácido fórmico. Se expresan, en daltons, los valores de las especies detectadas en la muestra.

3.4.4.4. Estado de agregación

El estado de agregación de la proteína purificada se determinó mediante cromatografía de exclusión molecular, utilizando una columna Superdex 75[®] (Amersham) acoplada a un cromatógrafo HPLC BioCad (PerSeptive Biosystems). La proteína eluyó de la columna en dos formas predominantes, con pesos moleculares estimados de 50 kDa y 25 kDa, lo que corresponde al estado dimérico y monomérico, respectivamente (Figura 3.15). La especie mayoritaria fue la dimérica cuando el ensayo se realizó dentro de las 48 h siguientes a la obtención de proteína purificada, tiempo tras el cual la especie dimérica disminuyó hasta que, a los 14 días después de la purificación, la casi totalidad de la proteína apareció en forma monomérica (no se muestran los resultados).

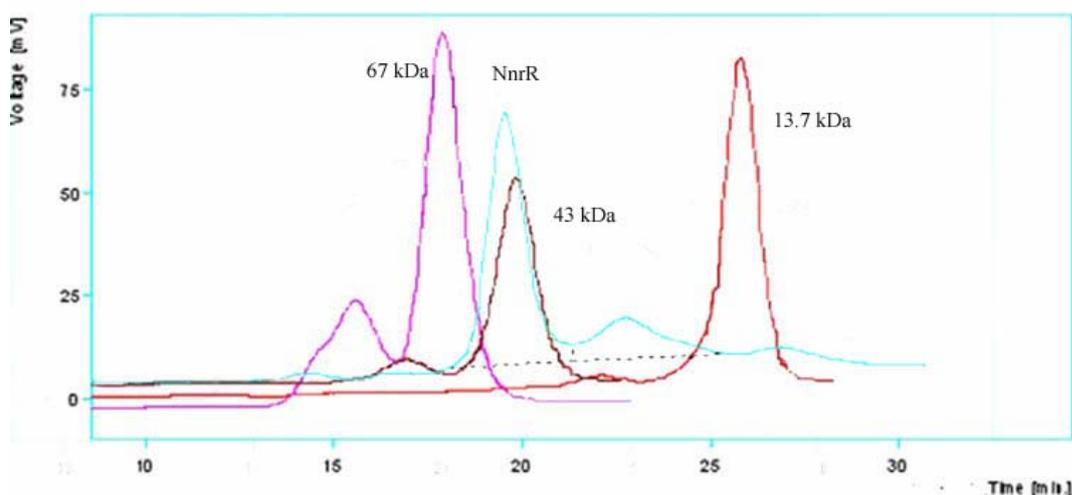


Figura 3.15. Determinación del estado de agregación de NnrR. Perfil de elución de la proteína NnrR y de los marcadores de tamaño molecular después de la cromatografía de exclusión molecular en una columna Superdex-75. Marcadores: albúmina sérica bovina (5 mg/ml; 67 kDa), ovoalbúmina (4 mg/ml; 43 kDa) y RNasaA pancreática bovina (4 mg/ml; 13,7 kDa). El experimento se repitió, al menos tres veces, con muestras de proteína (40 μ M) recién preparadas cada vez.

3.4.4.5. Determinación de posibles sitios de unión

Los posibles sitios de unión a ligandos en NnrR, se estudiaron titulando la proteína con ácido 8-anilino-1-sulfónico (ANS). El espectro de emisión a 460 nm reveló que la fluorescencia incrementó de manera exponencial con la concentración de ANS hasta que la emisión se mantuvo constante a pesar de los incrementos posteriores de la concentración del fluoróforo (Figura 3.16). La intersección de la recta de regresión obtenida entre la fase exponencial inicial y la fase estacionaria final permitió calcular una concentración de ANS de 38 μ M. La razón entre la concentración de proteína dimérica (42 μ M) y ANS (38 μ M) es aproximadamente 1, lo que sugiere que la proteína tiene, al menos, una cavidad hidrofóbica que permite la unión de una molécula de ligando por dímero de proteína.

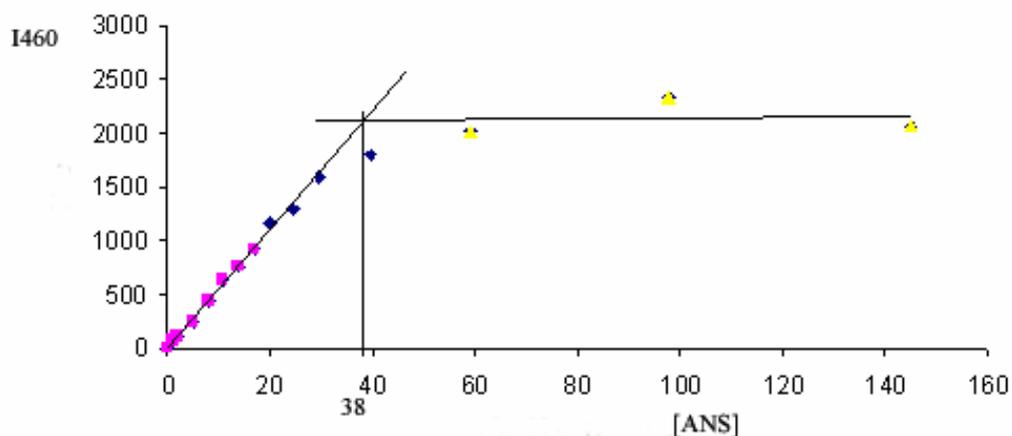


Figura 3.16. Determinación del sitio de unión a ligandos. En abscisas se representa la concentración de ANS y en ordenadas el valor de la emisión a 460 nm para cada una de las diferentes concentraciones de ANS.

3.4.5. Actividad de la proteína recombinante

3.4.5.1 Actividad *in vivo*

3.4.5.1.1. En un sistema homólogo

Para comprobar la funcionalidad de la proteína NnrR recombinante, el fragmento *NcoI* de 1,441 pares de base de pRJ8676, que incluye el gen *nnrR*, se clonó en pUCBM20 digerido con la misma enzima. Se obtuvo de este modo el plásmido pNE3, del que se aisló un fragmento *XbaI/HindIII* de 1,474 pb cuya clonación en pPPP375Ω.1, digerido con las mismas enzimas, resultó en el plásmido pRJ8845. Los plásmido pRJ8845 y pPPP375Ω.1 se transfirieron, de manera independiente, a *E. coli* S17.1 que, a su vez, se utilizó como cepa donadora en cruces biparentales con la cepa mutante *nnrR B. japonicum* 8678. Después de seleccionar los transconjugantes resistentes a la estreptomycinina y a la espectinomycinina, la presencia de cada plásmido se comprobó mediante su aislamiento a partir de células de *B. japonicum* 8678 y posterior transformación de *E. coli* DH5α (ver apartado 2.3.2). De esta manera, se obtuvieron dos nuevas cepas exconjugantes, 0722 que contenía el plásmido pRJ8845, y 0723

transformada con el vector pPP375Ω.1, que se han utilizado en este estudio. Como se indica en la Figura 3.17, la cepa 0722 recuperó su capacidad para crecer en microaerobiosis utilizando el nitrato como fuente de energía, mientras que, como era de esperar, la cepa 0723, fue incapaz de crecer en las condiciones descritas.

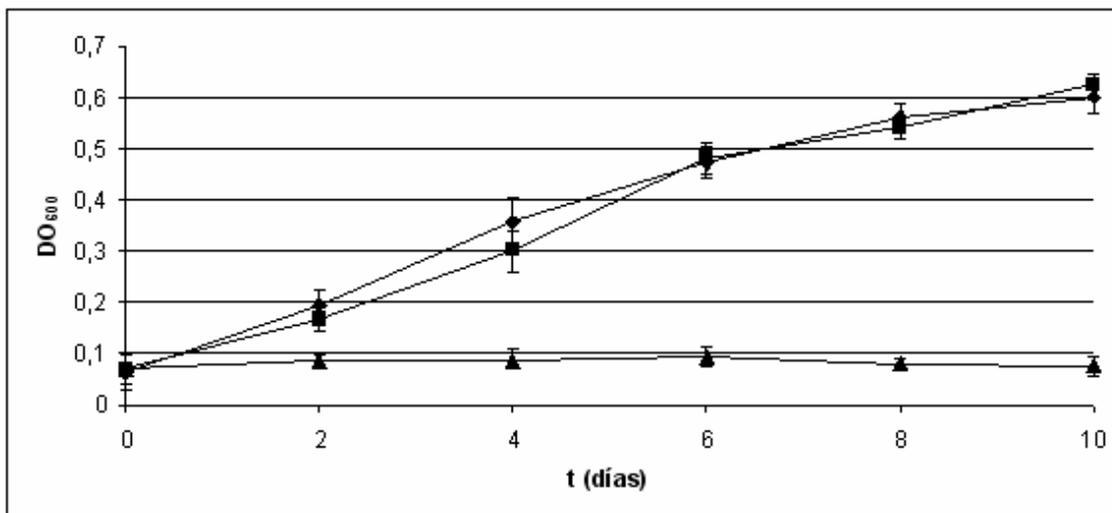


Figura 3.17. Curva de crecimiento de las cepas USDA110, 0722 y 0723 de *B. japonicum*. Las células se cultivaron microaeróbicamente en medio YEMN durante 10 días. USDA110 (◆), 0722 (■) y 0723 (▲). Se representa el error estándar de la media.

3.4.5.1.2. En un sistema heterólogo

La capacidad de NnrR para complementar un fondo heterólogo se estudió en *E. coli*. Para ello, en primer lugar, la cepa mutante *fnr* JRG1728 de *E. coli* se transformó con el plásmido pRJ2499 que contiene la fusión P_{norC} -*lacZ* para originar la cepa 1705 de *E. coli*. Posteriormente, el fragmento *EcoRI/HindIII* de 995 pares de bases de pNE3 se clonó en el vector pBBR-MCS2 digerido con las mismas enzimas, obteniéndose así el plásmido pRJ8843. La transferencia, de manera independiente, de ambos plásmidos, pRJ8843 y pBBR-MCS2, a *E. coli* 1705 dio lugar a las cepas 1706 y 1707, respectivamente.

Dichas cepas se inocularon en medio LB suplementado con 0,5 % de glucosa, y adicionado en unos casos de 50 mM de nitrato potásico y, en otros, de 100 μM de SNP. Las células se incubaron a 37 °C durante 16 h en microaerobiosis, a 120 r.p.m. Sólo la

cepa 1706 mostró incrementos estadísticamente significativos de actividad β -galactosidasa cuando se incubó en presencia de nitrato o de SNP (Tabla 3.12).

Las cepas mutantes en el gen *fnr* usadas en este estudio fueron incapaces de crecer cuando se incubaron microaeróbicamente en medio LN (datos no mostrados).

Tabla 3.12. Expresión β -galactosidasa de la fusión P_{norC} -*lacZ* en *E. coli* JRG1728. Las células se incubaron microaeróbicamente en medio LB suplementado con 0.5 % de glucosa y 50 mM de KNO_3 o 100 μM SNP. La actividad β -galactosidasa se expresa en unidades Miller y los valores representan la media de, al menos, tres repeticiones, seguida de la desviación standard. Los experimentos se repitieron, al menos, dos veces.

Cepa	Genotipo	Actividad β -galactosidasa (P_{norC} - <i>lacZ</i>)		
		Microaerobiosis		
		LB	LB + KNO_3	LB + SNP
1705	JRG1728 + pRJ2499	4,35 \pm 0,23	4,02 \pm 0,23	3,85 \pm 0,36
1707	JRG1728 + pRJ2499 + pBBR-MCS2	4,24 \pm 0,42	4,10 \pm 0,43	4,02 \pm 0,34
1706	JRG1728 + pRJ2499 + pRJ8843	4,26 \pm 0,53	14,03 \pm 0,67	21,17 \pm 1,15

3.4.5.2. Actividad *in vitro*

La capacidad de NnrR para activar la transcripción *in vitro* de los genes *nirK* y *norCBQD* se estudió utilizando como ADN molde los plásmidos pRJ8822 y pRJ8839, que contienen fragmentos de ADN de los genes *nirK* y *norCBQD*, respectivamente, NnrR sobreexpresada y purificada microaeróbicamente y ARN polimerasa de *B. japonicum*. Como control se utilizó el promotor del gen *rrn*, responsable de la síntesis de ARNm y ARNt. El experimento se realizó en condiciones de microaerobiosis, en presencia de 0,5 mM de nitrito y 10 μM de NO. En ningún caso se detectó señal correspondiente al tamaño molecular de los transcritos que deberían sintetizarse (Figura

3.18 b y d, carriles 1-5). Sí se observó una banda de 240 nucleótidos correspondiente al tamaño del transcrito del promotor de los genes *rrn* (Figura 3.18c).

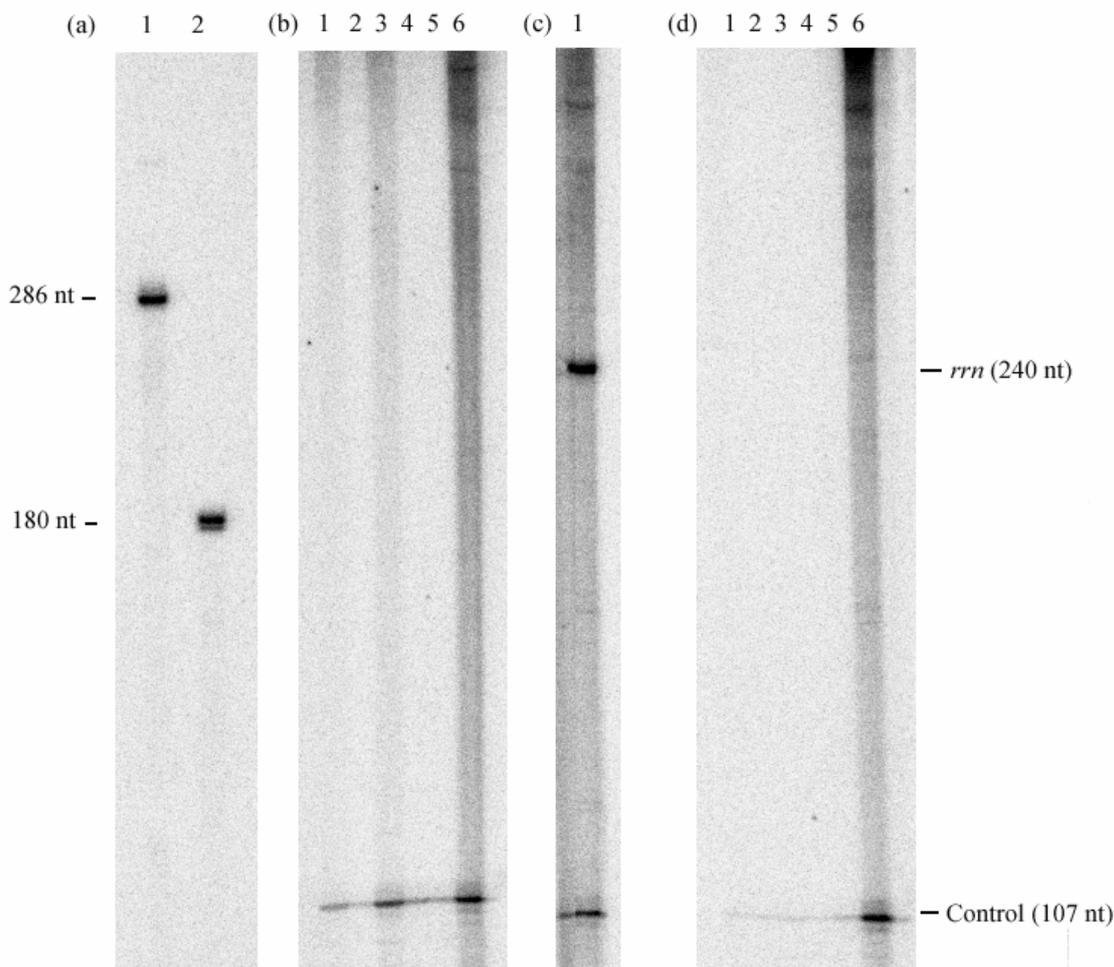


Figura 3.18. Activación *in vitro* de los genes *nirK* y *norCBQD*. Como ADN molde se utilizaron los plásmidos pRJ8822 (b) y pRJ8839 (d), que contiene fragmentos de ADN de los genes *nirK* y *norCBQD*, respectivamente. El ADN se transcribió en presencia de la ARN polimerasa de *B. japonicum* y distintas concentraciones de proteína NnrR, ambas purificadas, en presencia de 0,5 mM de nitrito (b y d, carriles 3 y 4) y 10 μ M de NO (b y d, carriles 1 y 2). Las concentraciones usadas fueron sin proteína (b y d, carril 6), 0,5 μ M (b y d, carriles 2, 4 y 5) y 2 μ M (b y d, carriles 1 y 3). Los transcritos fueron separados en un gel de poliacrilamida al 6 %. A la derecha se indican, en nucleótidos, los tamaños de los transcritos. Los marcadores (a) se generaron mediante transcripción *in vitro* con la ARN polimerasa T3 de los plásmidos pRJ9061 y pRJ8817, linearizados con *Bst*XI (a, carril 1) y *Bgl*III (a, carril 2). Como control se muestra el transcrito de 240 nucleótidos correspondiente al promotor del gen *rrn* (c). También se emplea como control de la reacción el transcrito de 107 nucleótidos, presente en todas las reacciones, procedente de un promotor interno. A la izquierda se presentan los tamaños, en nucleótidos, de los transcritos usados como marcadores.

3.4.6. Experimentos de unión ADN-NnrR

3.4.6.1. Geles de retardo

Para comprobar la capacidad de unión de NnrR a las regiones promotoras de los genes de la desnitrificación se llevaron a cabo experimentos de retardo en gel. En primer lugar, a partir de los plásmidos pPM200P9134, pRJ2498 y pRJ2499 se amplificaron 221, 195 y 238 pares de bases de cada una de las regiones promotoras de los genes *napEDABC*, *nirK* y *norCBQD*, mediante las parejas de oligonucleótidos nap1F y nap1R, nir1F y nir1R y nor1F y nor1R, respectivamente. En todos los casos, el ADN amplificado incluyó las cajas de anaerobiosis, consideradas como los lugares de unión de las proteínas activadoras de la transcripción. Posteriormente, el ADN amplificado se marcó con γ^{32} -P-ATP y se incubó con la proteína NnrR en presencia de poli-dI/dC y de albúmina sérica bovina. No se detectó señal en ausencia de proteína en la mezcla de incubación (Figura 3.19, carril 1). En presencia de proteína, tampoco se detectó la banda correspondiente a la posible unión entre la proteína y cualquiera de las regiones promotoras de los genes *napEDABC* y *nirK* (Figura 3.19a y b, carriles 2 y 3). No obstante, cuando la proteína se incubó con el ADN correspondiente a la región promotora de los genes *norCBQD* (ADN:proteína 1:1000) se detectó una débil, aunque visible, señal (Figura 3.19c, carril 3).

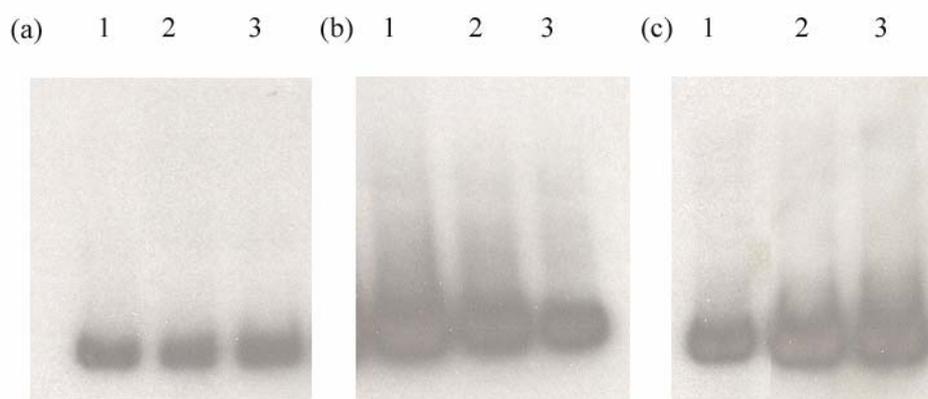


Figura 3.19. Retardo en gel de NnrR. Distintas concentraciones de NnrR se incubaron con fragmentos de ADN (2 μ M) de 221, 195 y 238 pb de los genes *napEDABC* (a), *nirK* (b) y *norCBQD* (c), respectivamente. Carriles: 1, ADN; 2, mezcla ADN:proteína 1:100; 3, mezcla ADN:proteína 1:1000.

3.4.6.2. Calorimetría isotérmica de titulación

Los parámetros termodinámicos para la unión de NnrR con la región promotora de los genes *napEDABC*, *nirK* y *norCBQD* se determinó mediante calorimetría isotérmica de titulación (CIT), manteniendo el interior de la célula tanto en condiciones aeróbicas como microaeróbicas. En aerobiosis, los cambios de calor obtenidos después de la inyección de la proteína en el tampón de titulación que contenía el ADN fueron negligibles, como lo ejemplifica la interacción entre el oligonucleótido que contenía la región promotora de los genes *napEDABC* y NnrR (Figura 3.20, A). Idénticos resultados se obtuvieron cuando se emplearon los oligonucleótidos correspondientes a las regiones promotoras de los genes *nirK* y *norCBQD* (no se muestran los resultados). Cuando los ensayos se repitieron después de gasear la célula con N₂, la titulación de la proteína con el ADN de la región promotora de los genes *norCBQD* se caracterizó por cambios de calor endotérmicos, lo que es indicativo de cambios desfavorables de entalpía (Figura 3.20, B). El perfil de la titulación fue el correspondiente a una curva hiperbólica, típica de unión entre proteína y ligando (Figura 3.20, panel inferior). El análisis de los datos de la CIT mediante el algoritmo “*one set of sites*” indicó que la unión de la proteína al ADN se facilitó por cambios de entalpía ($\Delta H = 16 \pm 7$ kcal/mol) y entropía ($T\Delta S = 24.5 \pm 0.7$ kcal/mol) favorables. La constante de disociación fue de 625 ± 80 mM y la estequiometría de unión entre los ligandos de aproximadamente 1, por lo que una molécula de ADN interaccionaría con un dímero de proteína.

Cuando, en microerobiosis, los experimentos de CIT se llevaron a cabo entre NnrR y los ADNs correspondientes a las regiones promotoras de los genes *nirK* y *napEDAC*, sólo se observó calor de dilución, indicando ausencia de unión (Figura 3.20, C). Estos datos fueron similares a los obtenidos cuando la CIT se realizó entre proteína y tampón de titulación (no se muestran los resultados).

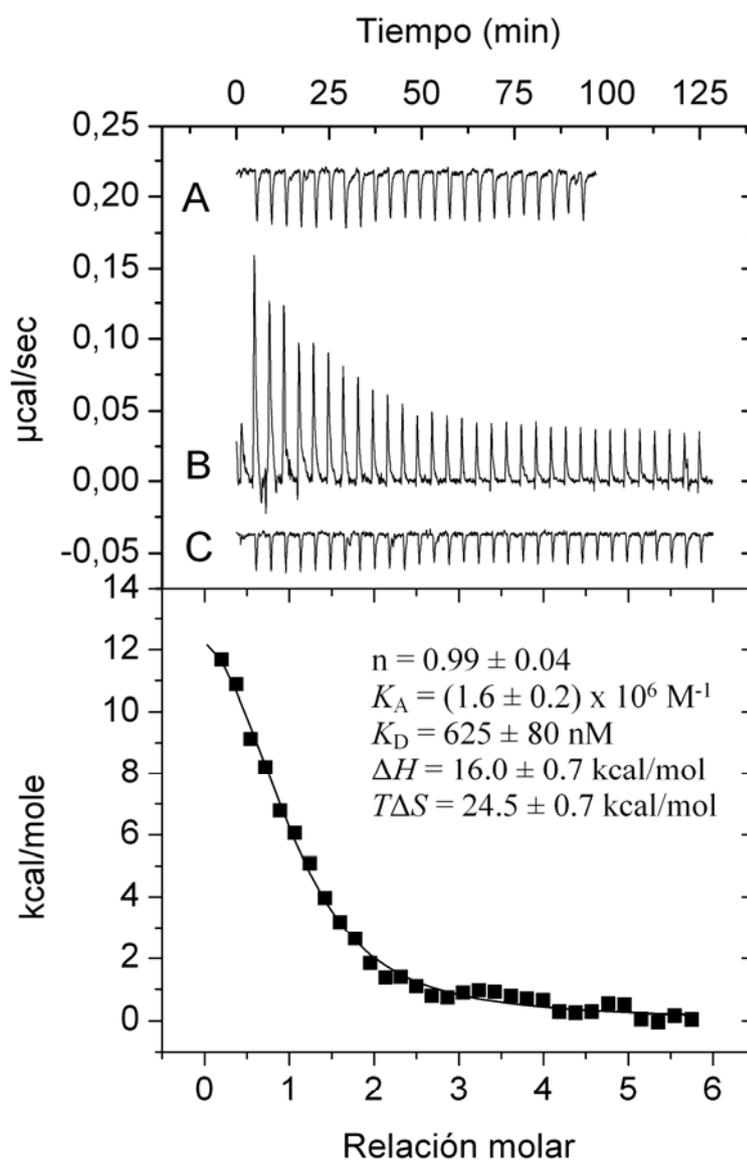


Figura 3.20. Titulación mediante calorimetría de fragmentos de ADN conteniendo secuencias de los promotores *napEDABC* y *norCBQD* con la proteína NnrR en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis. Panel superior: variaciones de calor de 2 μM de ADN correspondiente al promotor de los genes *norCBQD* con 60 μM de NnrR como dímero en condiciones aeróbicas (A) y anaeróbicas (B). El aparatado (C) se muestra la titulación de la solución conteniendo el ADN promotor de los genes *napEDABC* con la proteína a las mismas concentraciones en condiciones anaeróbicas. Los volúmenes de inyección fueron de 12,8 μl en (A), y de 8 μl en (B) y (C). Panel inferior: datos de (B) ajustados mediante el “método de un sitio de unión” del programa ORIGIN de MicroCal, y los parámetros obtenidos.

3.4.7. Cristalización de NnrR

La observación al microscopio óptico de las placas de cristalización tras 48 h de incubación permitió la visualización de cristales de dimensiones 50 x 20 x 5 micrones en el pocillo que contenía una solución 0,1 M cacodilato sódico, pH 7,5; 0,3 M sulfato amónico y 25 % polietilenglicol (8.000 kDa).

3.4.8. Modelo estructural de NnrR

Aunque un modelo de la estructura de NnrR se puede obtener mediante el envío de la secuencia aminoacídica a las bases de datos (www.expasy.com), una información más fiable sobre su estructura se obtuvo utilizando el programa 3D-Jigsaw (Bates et al. 2001). En este sistema, después del envío de la secuencia de NnrR, el programa indicó que la mejor candidata para obtener el modelo predictivo de NnrR fue la proteína Crp de *E. coli* (Passner et al. 2000; número de acceso 1G6N del PDB). El modelo de la estructura obtenido para la proteína NnrR contiene un total de 7 hélices α , 16 láminas β , y 20 giros (Figura 3.21).



Figura 3.21. Modelo estructural predictivo de NnrR de *B. japonicum*. El análisis de la estructura se realizó mediante el programa 3D-Jigsaw (Bates et al. 2001) utilizando Crp de *E. coli* como proteína de referencia (Passner et al. 2001). Color rosa, hélices α ; color amarillo, láminas β ; color azul, los giros.

En la Figura 3.22 se muestra la localización de los aminoácidos Phe-82, Tyr-93, Thr-96, Gln-70, Arg-115 y Glu-174, posiblemente implicados en la actividad de la proteína.

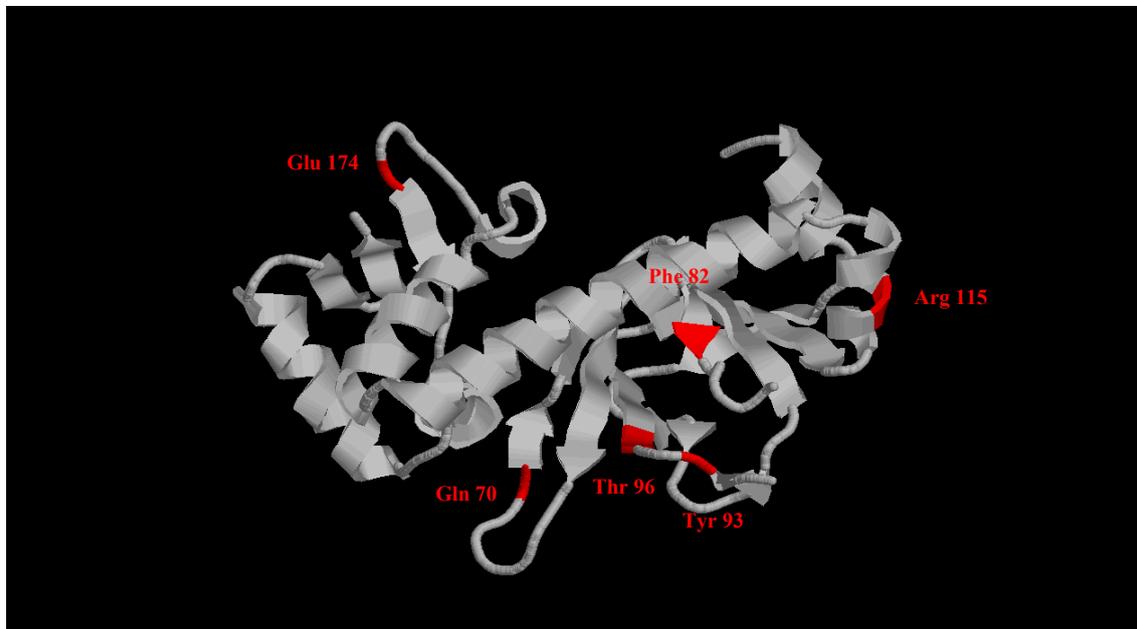


Figura 3.22. Modelo estructural predictivo de NnrR de *B. japonicum*. Se indica la localización de los aminoácidos Phe-82, Tyr-93, Thr-96, Gln-70, Arg-115 y Glu-174. Para ello, se ha utilizado el programa Rasmol (<http://www.umass.edu/microbio/rasmol/>).

4. DISCUSIÓN

4.1. Regulación de los genes *napEDABC* de *B. japonicum*

En *B. japonicum* se ha demostrado que la máxima expresión de los genes de la desnitrificación *nir*, *nor* y *nos*, que codifican las enzimas nitrito reductasa, óxido nítrico reductasa y óxido nitroso reductasa, respectivamente, requiere condiciones limitantes de oxígeno y la presencia de nitrato, o un óxido de nitrógeno derivado (Velasco et al. 2001, 2004; Mesa et al. 2002). En este trabajo se ha comprobado que los genes *napEDABC*, que codifican la nitrato reductasa periplásmica de *B. japonicum* (Delgado et al. 2003), también se activan en condiciones de microaerobiosis, aunque su máxima expresión requiere ambos factores, la ausencia de oxígeno y la presencia de nitrato. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Delgado et al. (2003) que demostraron que la mayor concentración de transcritos de los genes *napEDABC* se obtuvo cuando el ARN se aisló de células incubadas microaerobicamente con nitrato.

El control de la expresión por microaerobiosis de los genes *napEDABC* se lleva a cabo por las proteínas FixL, FixJ y FixK₂ ya que apenas se detectó actividad β-galactosidasa en las cepas mutantes *fixL*, *fixJ* y *fixK₂* cuando se incubaron en condiciones de limitación de oxígeno, tanto en presencia como en ausencia de nitrato (Tabla 3.1). Que la actividad β-galactosidasa de la cepa mutante *nnrR* se indujera en microaerobiosis y la adición de nitrato no tuviera ningún efecto posterior (Tabla 3.1) sugiere que NnrR también está implicada en la activación de los genes *nap*. Consecuente con los resultados de regulación, las cepas mutantes *napA* y *nnrR* no expresaron actividad nitrato reductasa (Tabla 3.2). Lógicamente, la proteína NapA no se detectó en el periplasma de la mutante *napA* e, igualmente, estuvo prácticamente ausente en las membranas de la mutante *nnrR* (Figura 3.3). Estos resultados sugieren que la expresión de *nnrR* está bajo el control de FixK₂ y coinciden con los obtenidos por Mesa et al. (2003) que demostraron que la activación de los genes *nirK* y *norCBQD* depende del sistema regulador FixLJ/FixK₂/NnrR. No obstante, aunque FixK₂ se superpone a NnrR en la cascada de regulación, no se puede descartar la posibilidad de un control directo de FixK₂ sobre el promotor de los genes *napEDABC*. Un esquema del sistema de regulación de la expresión de los genes *napEDABC* se indica en la Figura 4.1.

En la región promotora de los genes *napEDABC* se localiza una caja de anaerobiosis donde podría unirse la proteína FixK₂ (Delgado et al. 2003). Puesto que las cajas de anaerobiosis son homólogas a las de reconocimiento de las cajas FixK, es posible que

tanto FixK₂ como NnrR puedan unirse a la caja de anaerobiosis mencionada. La unión de FixK₂ a sus correspondientes cajas de anaerobiosis se ha demostrado en los genes *fixNOQP*, *fixGHIS* y *hemN₂* de *B. japonicum* (Mesa et al. 2005).

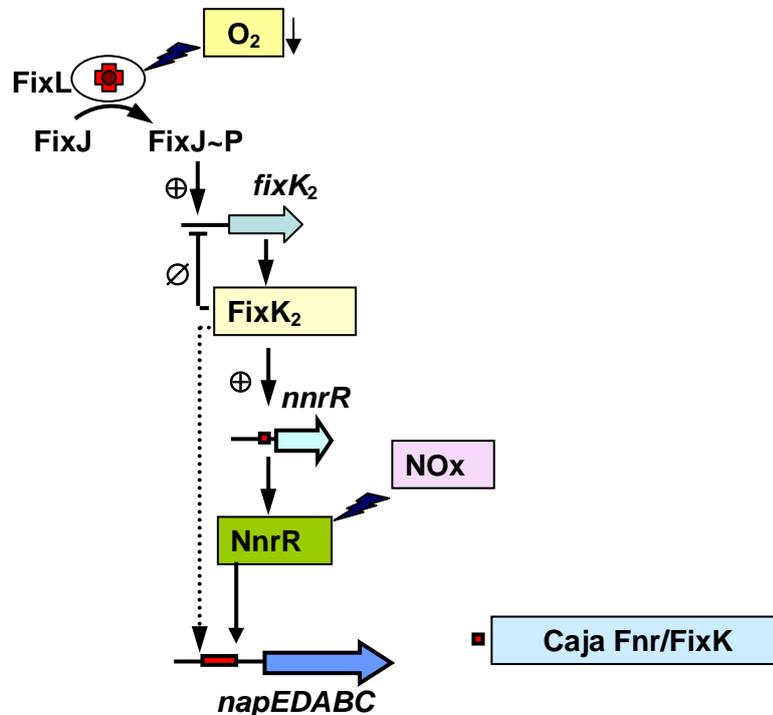


Figura 4.1. Regulación de los genes *napEDABC* de *B. japonicum*. En color naranja se indica la presencia de una caja de anaerobiosis en la región promotora de los genes *napEDABC*. NOx: óxido de nitrógeno.

Como en *B. japonicum*, cepas mutantes en los genes *anr* de *P. aeruginosa* (Galimand et al. 1991; Ye et al. 1995) y *fnrP* *P. denitrificans* (Van Spanning et al. 1997), cuyos productos, las proteínas Anr y FnrP, respectivamente, están implicadas en el control por microerobiosis de la desnitrificación, también carecen de actividad nitrato reductasa. Sin embargo, las cepas mutantes *nnr* y *nnrR* de *P. denitrificans* y *R. sphaeroides*, respectivamente, poseen actividad nitrato reductasa y son capaces de crecer con nitrato como único aceptor de electrones (Van Spanning et al. 1995; Tosques et al. 1996).

En dirección 5' de los genes *napEDABC* de *B. japonicum* se localiza el gen *araC* (Figura 3.1; <http://www.kazusa.or.jp/rhizobase>). La proteína AraC pertenece a la familia AraC/XylS de reguladores transcripcionales cuyos miembros se han implicado en la activación o represión de genes relacionados con el metabolismo carbonado, la síntesis

de factores de virulencia, la respuesta al estrés oxidativo, la tolerancia a solventes orgánicos y a metales pesados en diversas bacterias (Gallegos et al. 1997). Dada la proximidad de *araC* a los genes *napEDABC* se consideró oportuno estudiar la implicación de AraC en su expresión. Puesto que una cepa mutante en el gen *araC* creció microaeróbicamente con nitrato (Figura 3.7), se puede considerar que AraC no controla la expresión de los genes de la desnitrificación.

4.2. Regulación por óxidos de nitrógeno

Una vez comprobado que los genes *napEDABC*, al igual que los *nirK*, *norCBQD* y *nosRZDYFLX*, están sujetos a una regulación doble y jerárquica, primero por limitación de oxígeno y, segundo, por nitrato se trató de identificar qué óxido de nitrógeno, nitrato, nitrito, óxido nítrico u óxido nitroso, podría ser responsable de la inducción de los genes de la desnitrificación. Para ello, nos basamos en que cepas mutadas en los genes *napA*, *nirK*, *norC* y *nosZ*, acumulan, nitrato, nitrito, óxido nítrico y óxido nitroso, respectivamente, cuando se cultivan en condiciones desnitrificantes, por lo que se puede estudiar el efecto de cada óxido de nitrógeno sobre la inducción de cada uno de los genes de la desnitrificación.

La expresión de los genes *nap*, determinada como actividad β -galactosidasa de la fusión P_{napE} -*lacZ*, se activó tanto por el nitrato, que no se reduce en la cepa mutante *napA*, como por el nitrito que, procedente de la reducción del nitrato, se acumula en la mutante *nirK* (Tabla 3.3). Aparentemente, el óxido nítrico que, producto de la reducción del nitrito, se acumula en la mutante *nor* no indujo la expresión de la fusión P_{napE} -*lacZ* (Tabla 3.3). Igualmente, el nitrato y el nitrito indujeron la actividad β -galactosidasa de la fusión P_{nirK} -*lacZ* y, de nuevo, el óxido nítrico no tuvo ningún efecto sobre la expresión de los genes *nir* (Tabla 3.4). La actividad β -galactosidasa de la fusión P_{nirK} -*lacZ* en la mutante *nirK* fue menor que en la *napA* (Tabla 3.4), lo que podría deberse al efecto tóxico que la acumulación de nitrito en el medio de incubación podría ocasionar sobre el cultivo celular. A diferencia de la cepa parental, no se detectó actividad promotora de la fusión P_{norC} -*lacZ* en las cepas mutantes *napA*, *nirK* y *norC* (Tabla 3.5). Puesto que la actividad β -galactosidasa debida a las fusiones P_{napE} -*lacZ* y P_{nirK} -*lacZ* en la mutante *nirK* puede inducirse tanto por el nitrato como por su producto de reducción, el nitrito, el efecto de este último sobre la actividad promotora se analizó en la cepa silvestre y en la mutante *nirK*. Nuestros datos (Tabla 3.6) indican que el nitrito indujo la

actividad β -galactosidasa de las fusiones $P_{napE-lacZ}$ y $P_{nirK-lacZ}$, pero no la correspondiente a $P_{norC-lacZ}$. Todos estos resultados indican que tanto el nitrato como el nitrito inducen la activación transcripcional de los genes *nap* y *nir*, pero no la de los *nor*. Aún más, los genes *nap* y *nir* se activaron en la mutante *nirK*, en la que no se produce la formación de óxido nítrico, lo que sugiere que este óxido de nitrógeno no es necesario para la expresión de *nap* y *nir*.

No está claro, sin embargo, el papel del nitrito como molécula señal. El nitrito puede reducirse químicamente a óxido nítrico (Zweier et al. 1999; Poole et al. 1996), que podría activar entonces la fusión $P_{nirK-lacZ}$ en la mutante *nirK* (Tabla 3.4). Si el nitrito fuese él mismo un inductor sería de esperar que 0,5 mM, que es un cantidad elevada en comparación con la concentración de nitrito que se encuentra habitualmente en el suelo, indujera la expresión de la fusión $P_{nirK-lacZ}$ en la mutante *nirK* en mayor cuantía que la detectada (Figura 3.4). Esta limitación en la expresión de actividad β -galactosidasa podría deberse, sin embargo, al efecto citotóxico producido por la acumulación de nitrito.

La mayoría de los medios que se preparan en el laboratorio contienen trazas de nitrato que podría reducirse de manera no enzimática a óxido nítrico. Por ello, quizás, hubiera sido de esperar una mayor expresión de las fusiones $P_{nirK-lacZ}$ y $P_{norC-lacZ}$ en la mutante *norC* incubada en ausencia de nitrato o nitrito (Tablas 3.3 y 3.4). En *E. coli* se ha demostrado la producción de óxido nítrico como consecuencia de la respiración de nitrato, esto es, a partir del nitrito producido por la nitrato reductasa (Ji y Hollocher, 1989; Kalkowski y Conrad, 1991). Por lo tanto, no se puede excluir la posibilidad de que la actividad detectada en las mutantes *nirK* se trate de un efecto debido al óxido nítrico.

Que el óxido nítrico fuese incapaz de activar la expresión de los genes que codifican su propia reductasa (Tabla 3.5) es un hecho sorprendente. Ahora bien, puesto que este compuesto es citotóxico (Fang, 1997), su acumulación puede resultar letal para las células. La concentración de óxido nítrico producido por la cepa mutante *norB* durante la incubación en condiciones desnitrificantes fue superior a 300 nmol NO/(mg proteína x h) (Tabla 3.9), lo que podría explicar por qué el número de unidades formadoras de colonias de, por ejemplo, *B. japonicum* 0407 disminuyó de 14×10^{10} a 6×10^9 durante 96 h de incubación. No obstante, la posibilidad de que el óxido nítrico acumulado pudiera inhibir la expresión de los genes de la desnitrificación no se puede descartar.

El posible efecto tóxico del óxido nítrico sobre *B. japonicum* se estudió utilizando nitroprusiato sódico (SNP), compuesto que libera NO^+ (Bates et al. 1991), muy utilizado en estudios de regulación en microorganismos desnitrificantes tales como *P. denitrificans* (Van Spanning et al. 1999), *R. sphaeroides* (Kwiatkowski et al. 1996) y *P. stutzeri* (Vollack y Zumft, 2001). También se ha empleado en *E. coli* para estudios de expresión heteróloga de la proteína Nnr de *P. denitrificans* (Hutchings et al. 2000; Lee et al. 2006). El empleo de concentraciones de SNP de 1 a 40 μM disminuyó progresivamente la actividad promotora de la fusión $P_{napE-lacZ}$, hasta hacerse indetectable a concentraciones superiores (Tabla 3.7). El efecto negativo del SNP sobre la viabilidad celular quedó patente cuando el número de unidades formadoras de colonias de *B. japonicum* 0602 incubadas en condiciones desnitrificantes disminuyó progresivamente al aumentar la concentración de SNP en el medio de incubación (Tabla 3.8). No obstante, hay que indicar que el SNP a una concentración de 1 μM activó los genes *nir* y *nor* de *R. sphaeroides* 2.4.3 (Kwiatkowski et al. 1996) y que 100 μM de SNP indujo los genes *nir* y *nor* de *P. denitrificans* (Van Spanning et al. 1999; Hutchings et al. 2000). Aún más, 1 mM fue la concentración óptima de SNP utilizada en estudios de regulación de los genes *nir* y *nor* de *P. stutzeri* (Vollack y Zumft, 2001). La razón de la sensibilidad de *B. japonicum* al SNP es desconocida. No hay que olvidar que el SNP es también un agente productor de cianida (Hall y Guest, 1992), que podría ser el compuesto responsable del fuerte efecto citotóxico sobre *B. japonicum*. En *P. stutzeri*, el SNP inhibió la transcripción de los genes *nir* y *nor* a concentraciones superiores a 5 mM (Vollack y Zumft, 2001).

Puesto que el SNP no resultó eficaz en *B. japonicum*, la actividad promotora del óxido nítrico sobre la expresión de los genes *nor* se analizó cultivando juntas las mutantes *nirK* y *norC* (Tabla 3.10). La mutante *norC* carece de actividad óxido nítrico reductasa y, por lo tanto, es una fuente natural de óxido nítrico, y la mutante *nirK* no posee actividad nitrito reductasa, pero debe de ser capaz de reducir óxido nítrico. En ausencia de la mutante *norC* en el medio de cultivo no se observó inducción de actividad β -galactosidasa, pero la actividad promotora de *norC* en la mutante *nirK* incrementó hasta niveles comparables a los de la cepa parental cuando las células de *nirK* se mezclaron con cantidades crecientes de *norC* (Tabla 3.10). Estos resultados indican que el óxido nítrico es la molécula señal para la activación transcripcional de los genes *norCBQD*. Experimentos de co-cultivo similares en el que cepas mutantes en el

gen *nirK* se mezclaron con concentraciones crecientes de una mutante *norC* se han llevado a cabo en *R. sphaeroides* (Kwiatkowski et al. 1997) y *P. denitrificans* (Van Spanning et al. 1999) para demostrar que el óxido nítrico activa la transcripción de los genes *nir* y *nor*.

Los niveles de actividad β -galactosidasa en la mutante *nosZ* con la fusión transcripcional P_{norC} -*lacZ* fueron similares a los de la cepa parental (Tabla 3.11), lo que sugiere que el óxido nítrico podría estar implicado en la expresión de los genes *nor*. Sin embargo, no se detectó actividad promotora en la cepa parental cuando las células se incubaron con concentraciones de N_2O que oscilaron de 0,1 a 5 mM, y el óxido nítrico no afectó el crecimiento de *B. japonicum*. Por tanto, se puede descartar al óxido nítrico como la molécula activadora de la transcripción de los genes *nor*.

Hasta siete bandas de proteína se han identificado en las membranas de *B. japonicum* USDA110 después de su cultivo en microaerobiosis con nitrato. De esas siete bandas, la correspondiente al citocromo *c* de 16 kDa se ha demostrado que es la subunidad NorC de la enzima óxido nítrico reductasa (Mesa et al. 2002). El efecto de cada óxido de nitrógeno sobre la síntesis de NorC se analizó detectando la proteína en membranas de diversas cepas mutadas en genes de la desnitrificación que se cultivaron en diferentes condiciones de crecimiento. NorC no se detectó en la mutante *napA* incubada con KNO_3 , pero estuvo presente cuando se utilizó nitrito como agente inductor (Figura 3.5). Estos resultados muestran que el nitrato no induce la síntesis de la enzima óxido nítrico reductasa, por lo que el nitrito, u otro óxido de nitrógeno posterior en la ruta de la desnitrificación, es el responsable de la inducción de los genes *nor* y la consecuente síntesis de la enzima que codifica. Estos resultados concuerdan con los obtenidos durante los estudios de regulación que indican que el nitrato no induce la fusión P_{norC} -*lacZ* en la mutante *napA* (Tabla 3.5).

NorC tampoco se detectó en las membranas de las mutante *nirK* cuando las células se incubaron microaeróbicamente con nitrito (Figura 3.5) lo que, junto a los resultados obtenidos durante los estudios de regulación (Tabla 3.6), indica que el nitrito no es el óxido de nitrógeno implicado en la expresión de los genes *nor*. Como era de esperar, NorC no se encontró en las membranas de la mutante *norC* incubada con nitrato, pero sí se detectó en las membranas de las células de la mutante *norB* (Figura 3.5). Puesto que la cepa mutante *norB* contiene un gen *norC* funcional, la expresión de *norC*, que está localizado en dirección 5' de *norB*, resultaría en la síntesis de NorC. Mientras que no se

observaron diferencias en la intensidad de la señal de las bandas de proteína de la mayoría de las proteína hemo-*c* entre las cepas parental y la mutante *norB*, la señal correspondiente a NorC en la mutante *norB* fue menor que en la cepa parental (Figura 3.5). Que este hecho refleje un efecto inhibitorio debido a la acumulación de óxido nítrico sobre la expresión de NorC se desconoce por el momento.

La detección de NapA en la mutante *napC* de *B. japonicum*, donde está impedida la formación de óxido nítrico (Figura 3.3), sugiere que este óxido de nitrógeno no es responsable de la activación de los genes *nap*. Apoya esta afirmación que cepas incapaces de sintetizar la enzima nitrato reductasa de *P. denitrificans* no acumularon óxido nítrico en el medio cuando se incubaron en presencia de nitrato (Hutchings et al. 2000). Por otra parte, el óxido nítrico no indujo la expresión de la nitrato reductasa en *P. pantotrophus* (Wood et al. 2001).

Si se consideran en conjunto, los datos bioquímicos y de regulación sugieren la existencia de un doble circuito de control de la desnitrificación por óxidos de nitrógeno en *B. japonicum*. Por una parte, el nitrato estaría implicado en la expresión de los genes *nap* y *nir* y, por otra, el NO lo estaría en la expresión de los genes *nor*. El papel del nitrito como molécula señal requiere experimentos adicionales.

Esta afirmación difiere a la regulación en otros desnitrificantes. En *P. denitrificans*, el óxido nítrico está implicado en la expresión de los genes *nir* y *nor* a través de la proteína Nnr (Van Spanning et al. 1995), y el nitrato es responsable de la expresión de los *nap* a través de la proteína NarR (Wood et al. 2001). En *R. sphaeroides*, el óxido nítrico también regula la expresión simultánea de los genes *nir* y *nor* (Tosques et al. 1996), mientras que el nitrato es la molécula que se requiere para la expresión de los genes *nar*. Por último, el óxido nítrico activa la expresión de los genes *nir* y *nor* de *P. stutzeri* y *P. aeruginosa* a través de DnrD (Vollack y Zumft, 2001) y Dnr (Arai et al. 1999), respectivamente. En ambas bacterias, el nitrato activa la expresión de los genes *nar* mediante el sistema NarXL/QP.

4.3. Sobreexpresión, purificación y caracterización de la proteína NnrR

Uno de los métodos más utilizados para la purificación de una proteína recombinante es la introducción en la secuencia del gen que la codifica del ADN responsable de la síntesis de un motivo de unión a una matriz que permita su posterior purificación (para una revisión ver Terpe, 2003). Aunque existe cierta variedad en cuanto al motivo de

unión, y su longitud, el más utilizado es el motivo de histidinas (6xHis), que permite la purificación mediante la unión de la proteína a una matriz de ácido nitriloacético/niquel, y su posterior elución con imidazol (Hochuli et al. 1987). El empleo del motivo 6xHis afectó la actividad de la proteína (Wu y Filutowicz, 1999) y alteró los resultados de los experimentos de difracción (Hakansson et al. 2000). Además, la presencia de imidazol provoca, con cierta frecuencia, la formación de agregados e interfiere negativamente en los experimentos de resonancia magnética nuclear y de cristalografía (Hefti et al. 2001). Para la sobreexpresión de la proteína NnrR se decidió, por tanto, utilizar un vector de expresión distinto a los que se encuentran disponibles con el motivo de histidinas, concretamente el vector pET3a(+) (Novagen).

Cualquier temor a que la proteína sobreexpresada pudiera tener afectada su actividad se descartó, ya que una cepa mutante *nnrR* de *B. japonicum* se complementó satisfactoriamente con el plásmido pRJ8845 que contenía el gen *nnrR* utilizado en los experimentos de sobreexpresión.

Puesto que NnrR carece del motivo de cisteínas típico de la proteína Fnr de *E. coli* y, por tanto, se supone que no debe ser sensible al oxígeno, todo el procedimiento de purificación se llevó a cabo en condiciones aeróbicas. Para los experimentos de transcripción *in vitro*, no obstante, la purificación de NnrR se llevó a cabo en condiciones microaeróbicas como se describe en Material y Métodos (ver apartado 2.4.3). La proteína FixK₂ de *B. japonicum* también es activa después de su purificación en aerobiosis (Mesa et al. 2005). Hasta la fecha, la única proteína que se ha purificado del grupo Dnr/NnrR es la Dnr de *P. aeruginosa*, y su purificación se llevó a cabo en aerobiosis (Rinaldo et al. 2005).

Puesto que no se obtuvieron diferencias significativas en el rendimiento de la proteína sobreexpresada a diferentes temperaturas (Figuras 3.9 y 3.10), la incubación de *E. coli* BL21 (DE3) transformada con pBG0704 se llevó a cabo a 30 °C por ser la temperatura óptima de crecimiento de la bacteria. Además, las temperaturas elevadas, así como la concentración de sales en el medio, pueden afectar la solubilidad de la proteína recombinante y favorecer la formación de cuerpos de inclusión (Deutscher, 1990). Igualmente, ya que tiempos de incubación superiores a 2 h no resultaron en incrementos del rendimiento (Figura 3.10) y, ante la posibilidad de que se afectara la viabilidad de la misma, la incubación de las células tras la adición de IPTG se llevó a cabo durante 2 h. Todas las concentraciones de IPTG utilizadas en este estudio resultaron en rendimientos de proteína similares, por lo que se empleó la concentración

mínima comprobada, que fue de 0,1 mM (Figura 3.9). Estos valores de temperatura y tiempo de incubación, así como de concentración de IPTG, fueron idénticos a los empleados por Mesa et al. (2005) para sobreexpresar la proteína FixK₂ de *B. japonicum*. La sobreexpresión de Dnr de *P. aeruginosa*, sin embargo, se realizó en presencia de 1 mM de IPTG, durante 15 h de incubación a 37 °C (Rinaldo et al. 2005).

La solubilidad de la proteína NnrR recombinante no se afectó significativamente durante el proceso de fraccionamiento celular ni durante los sucesivos pasos de purificación (Figura 3.11). El proceso de purificación seguido fue similar al utilizado para la purificación del factor de transcripción ModE de *E. coli* (McNicholas et al. (1997). Aunque otros autores (Teran et al. 2006) utilizaron el intercambio iónico después de la columna de afinidad, en nuestras manos, se obtuvieron mejores resultados cuando se empleó el intercambio iónico en primer lugar. Siguiendo la metodología descrita en Material y Métodos, el rendimiento típico a partir de 400 ml de cultivo fue de 3 g/l de proteína NnrR con una pureza igual o superior al 95 %. El rendimiento de la purificación de FixK₂ fue de 20 mg/litro de cultivo (Mesa et al. 2005) y el de Dnr de *P. aeruginosa* fue de 15 mg/litro (Rinaldo et al. 2005).

El espectro de dicroísmo circular a 25 °C (Figura 3.12) indicó que la proteína recombinante está plegada en la solución, lo que sugiere que *E. coli* fue capaz de expresarla correctamente. Consecuentemente, después de su purificación, la proteína se pudo utilizar para los estudios correspondientes de caracterización bioquímica y funcional. Los valores mínimo y máximo de elipticidad visibles en el espectro de dicroísmo circular coinciden con los de la Dnr de *P. aeruginosa* (Rinaldo et al. 2005), lo que sugiere un parecido estructural con la misma. La estructura de NnrR (Figura 3.13) parece, sin embargo, más estable que la de la Dnr ya que ésta se desnaturalizó casi en su totalidad después de calentarla a 95 °C (Rinaldo, comunicación personal).

El valor del coeficiente de absorción molar de NnrR, calculado mediante espectrofotometría coincidió con el valor teórico obtenido en las bases de datos (www.expasy.com). Sin embargo, el valor teórico de la masa molecular (25.869,6 Da) difiere del obtenido por espectrometría de masas (25.731,0 Da) en 138,6 Da (Figura 3.14). Esta diferencia puede corresponder a la metionina inicial, de masa molecular 149,21 Da, que se perdiera durante la traducción.

La proteína NnrR se encuentra principalmente en estado dimérico (Figura 3.15). Esto parece una característica de las proteínas de la familia Fnr/Crp, a la que pertenece Nnr, ya que tanto Dnr de *P. aeruginosa* (Rinaldo et al. 2005) como FixK₂ de *B. japonicum*

(Mesa et al. 2005), a concentraciones de proteína similares, son también dímeros en solución.

Los experimentos de titulación con ANS se utilizan de manera rutinaria para estudiar posibles cambios en la conformación de la proteína y, sobretodo, para analizar la presencia de cavidades hidrofóbicas en la misma, huecos que pudieran actuar como posibles sitios de unión a ligandos. La titulación de NnrR de *B. japonicum* con ANS reveló que, en solución, la proteína presenta una cavidad hidrofóbica (Figura 3.16). El hecho de que esta cavidad pudiera ser la responsable de la unión a un posible ligando, así como su localización precisa en la estructura de la proteína no se ha demostrado. Experimentos similares de titulación con ANS mostraron la presencia en Crp de *E. coli* de dos posibles sitios de unión y la existencia de tres estados conformacionales de la proteína (Heyduk y Lee, 1989), que dependerían de la concentración de AMP cíclico, el ligando de Crp. En la proteína Dnr de *P. aeruginosa* también se ha demostrado la presencia de una cavidad hidrofóbica (Rinaldo et al. 2005).

La constante de disociación (K_d) de NnrR, estimada mediante calorimetría isotérmica de titulación en 625 nM, coincide con la K_d de FixL en presencia de óxido nítrico (Winkler et al. 1996). Este valor es unas 1000 veces mayor que el de Crp de *E. coli* (Heyduk y Lee, 1989) y 10 veces más que el de Dnr de *P. aeruginosa* (Rinaldo et al. 2005).

NnrR no fue capaz de activar la transcripción de ninguno de los genes *nirK* y *norCBQD* cuando se utilizó como molde ADN de los plásmidos pRJ8822 y pRJ8839, respectivamente, ni siquiera cuando su purificación y posteriores reacciones de transcripción se llevaron a cabo en condiciones de microaerobiosis (Figura 3.18). Es posible que la proteína requiera para su actividad algún cofactor que se pierda durante el proceso de purificación. También se desconoce si dicho cofactor podría ocupar la cavidad hidrofóbica detectada en la estructura de NnrR (Figura 3.16).

Los resultados de los experimentos de retardo en gel que se realizaron para tratar de demostrar la unión de NnrR a los fragmentos de ADN de 221, 195 y 238 pares de bases de los genes *napEDABC*, *nirK* y *norCBQD*, respectivamente, no fueron conclusivos. En ningún caso se detectó unión de la proteína a los genes *nap* y *nir* y sólo se observó una débil señal correspondiente a la unión entre NnrR y el ADN de *norCBQD* (Figura 3.19). A pesar de los repetidos intentos para mejorar los resultados obtenidos no se pudo demostrar con claridad la unión ADN-NnrR. En contraste con NnrR, la proteína FixK₂

de *B. japonicum* sobreexpresada y purificada en aerobiosis fue capaz de activar *in vitro* la transcripción de los genes *fixNOQP*, *fixGHIS* y *hemN₂* (Mesa et al. 2005).

Para comprobar mediante una técnica diferente la unión ADN-NnrR se llevaron a cabo experimentos de microcalorimetría isotérmica de titulación. Los cambios de calor registrados durante la microcalorimetría mostraron que la proteína NnrR sólo se unió a la región promotora de los genes *nor* en condiciones de microaerobiosis (Figura 3.20). Tales variaciones endotérmicas son características de la interacción entre proteína y ADN (Bergquist et al. 2004), y no se detectaron en condiciones aeróbicas ni cuando se empleó ADN de los genes *nap* y *nir*. Estos resultados también indican que no es necesaria la presencia de óxido nítrico para la unión ADN-NnrR. Es la primera vez que se demuestra la unión de una proteína del grupo Dnr/NnrR al ADN de la región promotora de los genes que regulan. Los esfuerzos realizados por otros autores para comprobar la unión de NnrR de *R. sphaeroides* a los promotores de los genes de la desnitrificación que regulan fueron infructuosos (Laratta et al. 2003).

Recientemente, se ha demostrado que la expresión de Nnr de *P. denitrificans* en *E. coli* sólo ocurre microaeróbicamente en presencia de óxido nítrico (Lee et al. 2006). Aunque la proteína no fue funcional en aerobiosis, su inactivación fue reversible, esto es, recuperó su actividad al pasar de un medio aeróbico a otro microaeróbico. El mecanismo por el que el oxígeno inactiva NnrR de *B. japonicum* es desconocido. La proteína Fnr de *E. coli* también se inactiva por el oxígeno, lo que se debe a un cambio en la conformación del grupo [Fe-S] que impide la dimerización de sus dos subunidades (Lazazzera et al. 1996). El oxígeno, igualmente, inactiva otra proteína de la familia Fnr/Crp como CooA de *Rhodospirillum rubrum* (Thorsteinsson et al. 2001), aunque la inactivación ocurre como consecuencia de la unión del oxígeno a un grupo hemo de CooA. Sin embargo, NnrR de *B. japonicum* carece de cisteínas en su secuencia (Figura 1.6), lo que descarta la intervención de los grupos [Fe-S] en su inactivación por el oxígeno. Lee et al. (2006) han demostrado que la actividad promotora de Nnr de *P. denitrificans* en cepas de *E. coli* alteradas en la biosíntesis de grupos hemo está ligeramente afectada cuando se cultiva con nitrato, y drásticamente reducida en presencia de nitrito u óxido nítrico. Puesto que la mutante es capaz de reducir nitrato a nitrito, lo que requiere la síntesis del grupo hemo, su función en la actividad de Nnr no se ha establecido con claridad. Por otra parte, no hay evidencias que indiquen que el grupo hemo pueda unirse a Nnr (Lee et al. 2006). En *P. stutzeri*, mutaciones en los

genes implicados en la síntesis de hemo d_I no afectan la capacidad de respuesta de la proteína DnrD al óxido nítrico (Vollack y Zumft, 2001). Aún más, tanto NnrR de *B. japonicum* (Tabla 3.12), como Nnr de *P. denitrificans* (Hutchings et al. 2000) y NnrR de *R. sphaeroides* (Laratta et al. 2003) son activas en *E. coli*, que carece de hemo d_I .

Que el oxígeno inactive a NnrR podría explicar la débil señal de unión entre NnrR y el fragmento de 238 pares de bases de los genes *norCBQD* durante los experimentos de retardo en gel (Figura 3.19).

En presencia de NnrR de *B. japonicum*, el SNP, como compuesto productor de NO^+ , indujo la expresión de actividad β -galactosidasa de la fusión P_{norC} -*lacZ* en la mutante *fnr* JRG1728 de *E. coli* complementada con los plásmidos pRJ8843 y pRJ2499 (Tabla 3.12). Aunque se trata de un sistema heterólogo de expresión, estos resultados indican, por una parte, que *E. coli* posee la maquinaria enzimática necesaria para la síntesis de una NnrR funcional y, por otro, que NnrR requiere óxido nítrico para su actividad. Sistemas heterólogos de expresión que utilizan *E. coli* se han empleado con éxito para estudiar la actividad *in vivo* de la proteína Nnr de *P. denitrificans* (Hutchings et al. 2000; Lee et al. 2006). También se han utilizado para estudiar la acción de la enzima amonio monooxigenasa de *P. denitrificans* en *Methylobacterium extorquens*, *Pseudomonas putida* y *E. coli* (Crossman et al. 1997). El SNP fue también eficaz en la inducción del gen *hmp* de *E. coli* responsable de la síntesis de la flavohemoglobina, una proteína capaz de unirse al óxido nítrico para su detoxificación (Membrillo-Hernandez et al. 1999). Entre los mecanismos de acción propuestos para explicar la activación de Dnr/NnrR por el NO^+ liberado por el SNP se ha sugerido que podría deberse a la nitrosilación de los grupos tioles de las proteínas, como ocurre con la flavohemoglobina de *E. coli* (Membrillo-Hernandez et al. 1999). No obstante, el NO , por sí mismo, no es un agente nitrosilante, sino que requiere la presencia de un agente oxidante para ejercer tal efecto, como ocurre en la nitrosilación de la proteína OxyR de *E. coli*, que controla la transcripción de genes cuyos productos están implicados en la protección contra el estrés oxidativo (Hausladen et al. 1996). Ya que NnrR carece de cisteínas en su secuencia, y es activa en ausencia de oxígeno, es poco probable que la nitrosilación de NnrR sea el mecanismo de activación. El óxido nítrico también puede actuar sobre los grupos metálicos de las proteínas (Stamler, 1994). De hecho, se ha demostrado que es un potente activador de la enzima guanilato ciclasa, que actúa como proteína sensor de NO en virtud de un grupo hemo (Martin et al. 2003). La inspección de la secuencia de NnrR no aporta evidencias de que requiera un ión metálico. No se puede excluir, sin

embargo, la posibilidad de que NnrR pueda activarse mediante otra proteína intermediaria que actuara como sensor de óxido nítrico.

El óxido nítrico también puede reaccionar con radicales superóxido, produciendo peroxinitrito que, a su vez, lleva a cabo la nitración de tirosinas (Beckman, 1996). Recientemente, se ha demostrado que este mecanismo interviene en la inducción de varios protooncogenes (para una revisión ver Kamat, 2006). El residuo Tyr-93 de *B. japonicum* está conservado en otros miembros del grupo Dnr/NnrR. Sin embargo, se ha demostrado que este residuo no es esencial para la activación de la proteína Nnr de *P. denitrificans* (Hutchings et al. 2000). Aún más, la proteína DnrD de *P. stutzeri* se activó en condiciones microaeróbicas en presencia de N_2O , lo que excluye la posibilidad de que el mecanismo de activación de la proteína sea la nitración de la misma, ya que en esas condiciones el peroxinitrito no se forma en la célula (Vollack y Zumft, 2001).

Los datos relativos a la estructura de NnrR no permiten profundizar más en su mecanismo de activación. El modelo topológico predictivo de NnrR (Figura 3.21) muestra una estructura similar a la de otras proteínas de los grupos Dnr/NnrR cuando se analizan con el programa 3D-Jigsaw (Bates et al. 2001).

Por homología con los residuos conservados en otras proteínas de los grupos Dnr/NnrR (Figura 1.6), se han identificado en la secuencia de NnrR de *B. japonicum* una serie de aminoácidos que podrían estar implicados en la actividad de la proteína (Figura 3.22). Los residuos Phe-82, Tyr-93 y Thr-96 se localizan en el extremo N-terminal de la proteína, por lo que podrían estar implicados en el reconocimiento de la señal activadora. De hecho, Tyr-93 y Thr-96 de NnrR de *R. sphaeroides* (Laratta y Shapleigh, 2003), así como Tyr-93 y Phe-82 de Nnr de *P. denitrificans* (Hutchings et al. 2000) son esenciales para la actividad de cada una de las proteínas.

El residuo Gln-70 del N-terminal de NnrR de *B. japonicum* corresponde en su localización con una Gln localizada en la misma posición en la NnrR de *R. sphaeroides*, y con un Glu localizado en la posición 70 de la proteína Nnr de *P. denitrificans*, y en la posición 72 de las proteínas Dnr de *P. aeruginosa* y DnrD de *P. stutzeri*, respectivamente. Estos residuos se corresponden con un residuo de Glu en la posición 58 de Crp de *E. coli*, descrito como integrante de la región activadora 3 (AR3) de esta proteína (Busby y Ebright, 1999). Es posible, por tanto, que Gln-70 de NnrR de *B. japonicum* intervenga en la actividad de la proteína.

Igualmente, por homología con la secuencia de Crp, el residuo Arg-115 de NnrR de *B. japonicum* podría formar parte de la región activadora 2 (AR2) y el Glu-174 de la región de reconocimiento del ADN.

Recientemente, se ha demostrado que Arg-80 e His-134 de Nnr de *P. denitrificans*, residuos no conservados en otras proteínas del mismo grupo, podrían formar parte de la región de la proteína que interacciona con la molécula señal, concretamente el óxido nítrico (Lee et al. 2006).

Los experimentos de unión de NnrR a los genes de la desnitrificación avalan la hipótesis sobre la existencia en *B. japonicum* de un doble circuito de regulación por óxidos de nitrógeno. Por un lado, el óxido nítrico estaría implicado en la activación de los genes *norCBQD* a través de NnrR y, por otro, el nitrato lo estaría en la activación de los genes *napEDABC* y *nirK*. Se desconoce si la acción del óxido nítrico sobre NnrR es directa o se efectúa a través de otra proteína intermediaria. Igualmente, la identidad de la proteína responsable de la activación de los genes *nap* y *nir*, es desconocida. En la secuencia del genoma de *B. japonicum* (<http://www.kazusa.or.jp/rhizobase>) no se han identificado proteína homólogas a NarXL/QP o NarR, responsables en otros desnitrificantes de la activación de los genes que codifican la enzima nitrato reductasa respiratoria.

De acuerdo con nuestros resultados, la actividad β -galactosidasa de la cepa mutante *nnrR* se indujo en microaerobiosis y la adición de nitrato no tuvo ningún efecto posterior (Tabla 3.1), lo que sugiere que NnrR también está implicada en la activación de los genes *nap*. Sin embargo, el hecho de que NnrR no se una a las cajas de anaerobiosis de los genes *nap*, como mostraron los experimentos de unión ADN:proteína mediante retardo en gel y calorimetría (Figuras 3.19 y 3.20), permite descartar un control directo de NnrR sobre los genes *nap*.

Es posible que el efecto de NnrR sobre los genes *nap* se deba a que NnrR pudiera funcionar como sensor de nitrato. No obstante, NnrR no tiene homología con las secuencias de otras proteínas sensoras de nitrato como NarXL/QP o NarR.

Finalmente, el control de la producción y reducción de óxido nítrico debe estar muy bien regulado para evitar su efecto citotóxico. Puesto que la cepa mutante *nnrR* acumula óxido nítrico (Tabla 3.9), tanto la ausencia de actividad nitrato reductasa (Tabla 3.2), como la disminución de la expresión de NapA (Figura 3.3), pudiera explicarse por un efecto tóxico causado por el óxido nítrico acumulado. Dado que los valores de actividad

β -galactosidasa en la mutante *nnrR* son similares tanto cuando las células se incubaron en presencia como en ausencia de nitrato, se puede afirmar que la presencia de nitrato no disminuyó la actividad β -galactosidasa a consecuencia del posible daño citotóxico originado por el óxido nítrico. Estos resultados sugieren que el óxido nítrico pueda ejercer un efecto inhibitorio sobre la expresión de los genes *napEDABC* en la mutante *nnrR*.

Un esquema del modelo propuesto se muestra en la Figura 4.2.

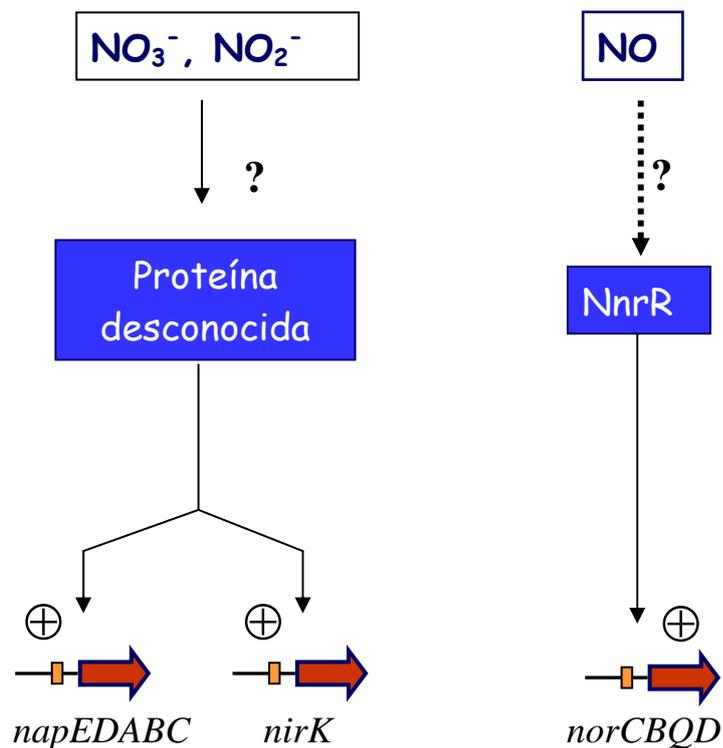


Figura 4.2. Regulación por óxidos de nitrógeno de los genes de la desnitrificación en *B. japonicum*. En línea discontinua se indica una acción indirecta del óxido de nitrógeno sobre el regulador correspondiente. El recuadro de color naranja indica la presencia de una caja de anaerobiosis en el promotor de los genes.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. La activación de la transcripción en microaerobiosis de los genes *napEDABC*, que codifican la enzima nitrato reductasa periplásmica de *Bradyrhizobium japonicum*, está controlada por el sistema regulador FixLJ/FixK₂/NnrR.
2. La expresión de los genes de la desnitrificación de *Bradyrhizobium japonicum* por óxidos de nitrógeno se lleva a cabo mediante dos circuitos de regulación. El nitrato activa la transcripción de los genes *napEDABC* y *nirK*, y el óxido nítrico es la molécula señal que induce los genes *norCBQD*.
3. La proteína recombinante NnrR de *Bradyrhizobium japonicum* se ha purificado a homogeneidad electroforética. Se trata de un dímero en solución, con masa molecular de 25.731 daltons, y su estructura secundaria se mantiene íntegra tras la purificación.
4. NnrR activa la transcripción de los genes *norCBQD* de *Bradyrhizobium japonicum*, posiblemente mediante su unión a la caja de anaerobiosis de la región promotora de los mismos.
5. La unión de NnrR al ADN que regula necesita condiciones limitantes de oxígeno, pero no la presencia de óxido nítrico.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Angerer A, Enz S, Ochs M y Braun V. 1995. Transcriptional regulation of ferric citrate transport in *Escherichia coli* K-12. Fecl belongs to a new subfamily of sigma 70-type factors that respond to extracytoplasmic stimuli. *Mol Microbiol*, 18 (1): 163-74.
- Anthamatten D y Hennecke H. 1991. The regulatory status of the *fixL*- and *fixJ*-like genes in *Bradyrhizobium japonicum* may be different from that in *Rhizobium meliloti*. *Mol Gen Genet*, 225: 38-48.
- Anthamatten D, Scherb B y Hennecke H. 1992. Characterization of a *fixLJ*-regulated *Bradyrhizobium japonicum* gene sharing similarity with the *Escherichia coli fnr* and *Rhizobium meliloti fixK* genes. *J Bacteriol*, 174: 2111-2120.
- Arai H, Igarashi y Kodama T. 1991. Nitrite activates the transcription of the *Pseudomonas aeruginosa* nitrite reductase and cytochrome *c*-551 operon under anaerobic conditions. *FEBS Lett*, 288: 227-228.
- Arai H, Igarashi y Kodama T. 1994. Structure and ANR-dependent transcription of the *nir* genes for denitrification from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 58: 1286-1291.
- 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.
- Arnosti DN y Chamberlin MJ. 1989. Secondary sigma factor controls transcription of flagellar and chemotaxis genes in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86 (3): 830-4.
- Bartnikas TB, Tosques IE, Laratta WP, Shi J y Shapleigh JP. 1997. Characterization of the nitric oxide reductase-encoding region in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3. *J Bacteriol*, 179: 3534-3540.
- Bates JN, Baker MT, Guerra R Jr y Harrison DG. 1991. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. *Biochem Pharmacol*, 42 Suppl:S157-65.
- Bates PA, Kelley LA, MacCallum RM y Sternberg MJ. 2001. Enhancement of protein modeling by human intervention in applying the automatic programs 3D-JIGSAW and 3D-PSSM. *Proteins*, 5: 39-46.

- Batut J, Daveran-Mingot ML, David M, Jacobs J, Garnerone AM, Kahn D. 1989. *fixK*, a gene homologous with *fnr* and *crp* from *Escherichia coli*, regulates nitrogen fixation genes both positively and negatively in *Rhizobium meliloti*. EMBO J, 8 (4): 1279-86.
- Beck C, Marty R, Klausli S, Hennecke H y Gottfert M. 1997. Dissection of the transcription machinery for housekeeping genes of *Bradyrhizobium japonicum*. J Bacteriol, 179 (2): 364-9.
- Beckman JS. 1996. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. Chem Res Toxicol, 9 (5): 836-44.
- Bedmar EJ, Robles EF y Delgado MJ. 2005. The complete denitrification pathway of the symbiotic, nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. Biochem Soc Trans, 33: 141-4.
- Bedzyk L, Wang T y Ye RW. 1999. The periplasmic nitrate reductase in *Pseudomonas* sp. strain G-179 catalyzes the first step of denitrification. J Bacteriol, 181: 2802-2806.
- Bell AI, Cole JA y Busby SJ. 1990. Molecular genetic analysis of an FNR-dependent anaerobically inducible *Escherichia coli* promoter. Mol Microbiol, 4 (10): 1753-63.
- Bell LC, Page MD, Berks BC, Richardson DJ, y 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.
- Belyaeva TA, Rhodius VA, Webster CL y Busby SJ. 1998. Transcription activation at promoters carrying tandem DNA sites for the *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein: organisation of the RNA polymerase alpha subunits. J Mol Biol, 277 (4): 789-804.
- Bergersen FJ. 1977. A Treatise on Dinitrogen Fixation, section III: Biology, pp. 519-556. En Hardy RW y Silver W (eds.), Wiley. Nueva York, N.Y.
- Bergquist S, Williams MA, O'Brien R y Ladbury JE. (2004) Heat capacity effects of water molecules and ions at a protein - DNA interface. J Mol Biol, 336: 829-842.
- Berks BC, Baratta D, Richardson DJ y Ferguson SJ. 1993. Purification and characterization of a nitrous oxide reductase from *Thiosphaera pantotropha*. Implications for the mechanism of aerobic nitrous oxide reduction. Eur J Biochem, 212: 467-476.
- Berks BC, Page MD, Richardson DJ, Reilly A, Cavill A, Outen F, Ferguson SJ. 1995. Sequence analysis of subunits of the membrane-bound nitrate reductase from a denitrifying bacterium: the integral membrane subunit provides a prototype for the dihaem electron-carrying arm of a redox loop. Mol Microbiol, 15: 319-31.

- Bertolucci C, Ming LJ, Gonzalez G y Gilles-Gonzalez MA. 1996. Assignment of the hyperfine-shifted $^1\text{H-NMR}$ signals of the heme in the oxygen sensor FixL from *Rhizobium meliloti*. *Chem Biol*, 3 (7): 561-6.
- Blasco FC, Iobbi C, Ratouchniak J, Bonnefoy V y Chippaux M. 1990. Nitrate reductases of *E. coli*: sequence of the second nitrate reductase and comparison with that encoded by the *narGHJI* operon. *Mol Gen Genet*, 222: 104-111.
- Blasco F, Guigliarelli B, Magalon A, Asso M, Giordano G, Rothery RA.. 2001. The coordination and function of the redox centres of the membrane-bound nitrate reductases. *Cell Mol Life Sci*, 58 (2): 179-93.
- Blatter EE, Ross W, Tang H, Gourse RL y Ebright RH. 1994. Domain organization of RNA polymerase alpha subunit: C-terminal 85 amino acids constitute a domain capable of dimerization and DNA binding. *Cell*, 78 (5): 889-96.
- Bolivar F y Backman K. 1979. Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vector. *Methods Enzymol*, 68: 245-267.
- Bonnefoy V y Demoss JA. 1994. Nitrate reductases in *Escherichia coli*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 66: 47-56.
- Bradley DJ, Wood EA, Larkins AP, Galfré G, Butcher GW y Brewin NJ. 1988. Isolation of monoclonal antibodies reacting with peribacteroid membranes and other components of pea root nodules containing *Rhizobium leguminosarum*. *Planta*, 173: 149-160.
- Braker G, Fesefeldt A y Witzel KP. 1998. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *App Environ Microbiol*, 64: 3768-3775.
- Braun C y Zumft WG. 1992. The structural genes of the nitric oxide reductase complex from *Pseudomonas stutzeri* are part of a 30-kb gene cluster for denitrification. *J Bacteriol*, 174: 2394-2397.
- Brennan RG, Matthews BW. 1989. The helix-turn-helix DNA binding motif. *J Biol Chem*, 264 (4): 1903-6.
- Bueno E, Gómez-Hernández N, Girard L, Bedmar EJ y Delgado MJ. 2005. Function of the *Rhizobium etli* CFN42 *nirK* gene in nitrite metabolism. *Biochem Soc Trans*, 35: 166-167.
- Busby S y Ebright RH. 1994. Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. *Cell*, 79 (5): 743-6.
- Busby S y Ebright RH. 1997. Transcription activation at class II CAP-dependent promoters. *Mol Microbiol*, 23 (5): 853-9.

- Busby S y Ebright RH. 1999. Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J Mol Biol*, 293 (2): 199-213.
- Busby S, West D, Lawes M, Webster C, Ishihama A, Kolb A. 1994. Transcription activation by the *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein. Receptors bound in tandem at promoters can interact synergistically. *J Mol Biol*, 241 (3): 341-52.
- Butler AR y Megson IL. 2002. Non-heme iron nitrosyls in biology. *Chem Rev*, 102 (4): 1155-66.
- Carr GJ y Ferguson SJ. 1990. The nitric oxide reductase of *Paracoccus denitrificans*. *Biochem J*, 269: 423-9.
- Carter JP, Richardson DJ, y Spiro S. 1995. Isolation and characterisation of a strain of *Pseudomonas putida* that can express a periplasmic nitrate reductase. *Arch Microbiol*, 163: 159-166.
- Cartron ML, Roldan MD, Ferguson SJ, Berks BC, y Richardson DJ. 2002. Identification of two domains and distal histidine ligands to the four haems in the bacterial *c*-type cytochrome NapC; the prototype connector between quinol / quinone and periplasmic oxido-reductases. *Biochem J*, 368: 425-432.
- Casella S, Shapleigh JP, y Payne WJ. 1986. Nitrite reduction in *Rhizobium "hedysari"* strain HCTN1. *Arch Microbiol*, 146: 233-238.
- Casella S, Shapleigh JP, Toffanin A y Basaglia M. 2006. Investigation into the role of the truncated denitrification chain in *Rhizobium sullae* strain HCNT1. *Biochem Soc Trans*, 34: 130-2.
- Cebron A y Garnier J. 2005. *Nitrobacter* and *Nitrospira* genera as representatives of nitrite-oxidizing bacteria: detection, quantification and growth along the lower Seine River (France). *Water Res*, 39 (20): 4979-92.
- Chamberlin M. 1976. RNA polymerase- an overview, pp. 17-67. En Losick R y Chamberlin M (eds.), *RNA Polymerase*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Chan YK, McCormick WA y Watson RJ. 1997. A new nos gene downstream from *nosDFY* is essential for dissimilatory reduction of nitrous oxide by *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*. *Microbiology*, 143: 2817-24.
- Chen JY, Chang WC, Chang T, Chang WC, Liu MY, Payne WJ y LeGall J. 1996. Cloning, characterization, and expression of the nitric oxide-generating nitrite reductase and of the blue copper protein genes of *Achromobacter cycloclastes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 219: 423-428.

- Coyle CL, Zumft WG, Kroneck PMH, Körner H, y Jakob W. 1985. Nitrous oxide reductase from denitrifying *Pseudomonas perfectomarina*. Purification and properties of a novel multicopper enzyme. *Eur J Biochem*, 153: 459-467.
- Cramm R, Siddiqui RA y Friedrich B. 1997. Two isofunctional nitric oxide reductases in *Alcaligenes eutrophus* h16. *J Bacteriol*, 179: 6769-6777.
- Crossman LC, Moir JW, Enticknap JJ, Richardson DJ y Spiro S. 1997. Heterologous expression of heterotrophic nitrification genes. *Microbiology*, 143: 3775-83.
- Crosson S, McGrath PT, Stephens C, McAdams HH y Shapiro L. 2005. Conserved modular design of an oxygen sensory/signaling network with species-specific output. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (22): 8018-23.
- Cutruzzola F. 1999. Bacterial nitric oxide synthesis. *Biochim Biophys Acta*, 1411 (2-3): 231-49.
- Cuypers H, Viebrock-Sambale A y Zumft WG. 1992. NosR, a membrane-bound regulatory component necessary for expression of nitrous oxide reductase in denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. *J Bacteriol*, 174: 5332-5339.
- Cuypers H, Berghöfer J y Zumft WG. 1995. Multiple *nosZ* promoters and anaerobic expression of *nos* genes necessary for *Pseudomonas stutzeri* nitrous oxide reductase and assembly of its copper centers. *Biochim Biophys Acta*, 1264: 183-190.
- Darwin AJ y Stewart V. 1996. The NAR modulon systems: nitrate and nitrite regulation of anaerobic gene expression, pp. 343-359. En Lin ECC y Lynch AS (eds.), *Regulation of gene expression in Escherichia coli*. Chapman & Hall. Nueva York, N.Y.
- Darwin AJ, Tyson KL, Busby SJ y Stewart V. 1997. Differential regulation by the homologous response regulators NarL and NarP of *Escherichia coli* K-12 depends on DNA binding site arrangement. *Mol Microbiol*, 25 (3): 583-95.
- Darwin AJ, Ziegelhoffer EC, Kiley PJ y Stewart V. 1998. Fnr, NarP, and NarL regulation of *Escherichia coli* K-12 *napF* (periplasmic nitrate reductase) operon transcription in vitro. *J Bacteriol*, 180 (16): 4192-8.
- David M, Daveran ML, Batut J, Dedieu A, Domergue O, Ghai J, Hertig C, Boistard P y Kahn D. 1988. Cascade regulation of *nif* gene expression in *Rhizobium meliloti*. *Cell*, 54 (5): 671-83.
- De Boer AP, Reijnders WN, Kuenen JG, Stouthamer AH y van Spanning RJ. 1994. Isolation, sequencing and mutational analysis of a gene cluster involved in nitrite reduction in *Paracoccus denitrificans*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 66: 111-127.

- De Boer AP, van der Oost J, Reijnders WN, Westerhoff HV, Stouthamer AH y 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.
- De Groote MA, Granger D, Xu Y, Campbell G, Prince R, Fang FC. 1995. Genetic and redox determinants of nitric oxide cytotoxicity in a *Salmonella typhimurium* model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (14): 6399-403.
- Delgado MJ, Olivares J y 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, Bonnard N, Tresierra-Ayala A, Bedmar EJ y Müller P. 2003. The *Bradyrhizobium japonicum napEDABC* genes encoding the periplasmic nitrate reductase are essential for nitrate respiration. *Microbiology*, 149: 3395-3403.
- Deutscher MP (ed.). 1990. Guide to protein purification. Col. Meth in Enzymol. 182. Academic Press Inc., CA.
- Dispensa M, Thomas CT, Kim MK, Perrotta JA, Gibson J y Harwood CS. 1992. Anaerobic growth of *Rhodospseudomonas palustris* on 4-hydroxybenzoate is dependent on AadR, a member of the cyclic AMP receptor protein family of transcriptional regulators. *J Bacteriol*, 174 (18): 5803-13.
- DiSpirito AA, Taaffe LR, Lipscomb JD y Hooper AB. 1985. A 'blue' copper oxidase from *Nitrosomonas europaea*. *Biochim Biophys Acta*, 827: 320-326.
- Dumorwitz MC y Maier RJ. 1998. The FixK₂ protein is involved in regulation of symbiotic hydrogenase expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol*, 180: 3253-3256.
- Dunham CM, Dioum EM, Tuckerman JR, Gonzalez G, Scott WG y Gilles-Gonzalez MA. 2003. A distal arginine in oxygen-sensing heme-PAS domains is essential to ligand binding, signal transduction, and structure. *Biochemistry*, 42 (25): 7701-8.
- Ebright RH, Ebright YW y Gunasekera A. 1989. Consensus DNA site for the *Escherichia coli* catabolite gene activator protein (CAP): CAP exhibits a 450-fold higher affinity for the consensus DNA site than for the *E. coli lac* DNA site. *Nucleic Acids Res*, 17 (24): 10295-305.
- Erickson JW, Vaughn V, Walter WA, Neidhardt FC y Gross CA. 1987. Regulation of the promoters and transcripts of *rpoH*, the *Escherichia coli* heat shock regulatory gene. *Genes Dev*, 1 (5): 419-32.

- Erickson JW y Gross CA. 1989. Identification of the sigma E subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: a second alternate sigma factor involved in high-temperature gene expression. *Genes Dev*, 3 (9): 1462-71.
- Evans HJ. 1954. Diphosphopyridine Nucleotide-Nitrate Reductase from Soybean Nodules. *Plant Physiol*, 29 (3): 298-301.
- Fang FC. 1997. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J Clin Invest*, 99 (12): 2818-25.
- Fischer HM. 1994. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol Rev*, 58: 352-386.
- Fischer HM, Velasco L, Delgado MJ, Bedmar EJ, Schären S, Zingg D, Göttfert M y Hennecke H. 2001. One of two *hemN* genes in *Bradyrhizobium japonicum* is functional during anaerobic growth and in symbiosis. *J Bacteriol*, 183: 1300-1311.
- Gaal T, Ross W, Blatter EE, Tang H, Jia X, Krishnan VV, Assa-Munt N, Ebright RH y Gourse RL. 1996. DNA-binding determinants of the alpha subunit of RNA polymerase: novel DNA-binding domain architecture. *Genes Dev*, 10 (1): 16-26.
- Galibert F, Finan TM, Long SR, Puhler A, *et al.* 2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science*, 293: 668-672.
- Galimand M, Gamper M, Zimmermann A y Haas D. 1991. Positive FNR-like control of anaerobic arginine degradation and nitrate respiration in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 173 (5): 1598-606.
- Gallegos MT, Schleif R, Bairoch A, Hofmann K y Ramos JL. 1997. Arac/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol Mol Biol Rev*, 61(4): 393-410.
- Gilles-Gonzalez MA y Gonzalez G. 1993. Regulation of the kinase activity of heme protein FixL from the two-component system FixL/FixJ of *Rhizobium meliloti*. *J Biol Chem*, 268 (22): 16293-7.
- Gilles-Gonzalez MA, Gonzalez G, Perutz MF, Kiger L, Marden MC y 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 (26): 8067-73.
- Gilles-Gonzalez MA y Gonzalez G. 2005. Heme-based sensors: defining characteristics, recent developments, and regulatory hypotheses. *J Inorg Biochem*, 99 (1): 1-22.
- Girsch P y De Vries S. 1997. Purification and initial kinetic and spectroscopic characterization of NO reductase from *Paracoccus denitrificans*. *Biochim Biophys Acta* 1318: 202-216.

- Glockner AB, Jungst A y Zumft WG. 1993. Copper-containing nitrite reductase from *Pseudomonas aureofaciens* is functional in a mutationally cytochrome *cd*₁-free background (*nirS*) of *Pseudomonas stutzeri*. Arch Microbiol, 160: 18-26.
- Gonzalez PJ, Correia C, Moura I, Brondino CD y Moura JJ. 2006. Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction. J Inorg Biochem, 100 (5-6): 1015-23.
- Goretski J, Zafiriou OC, Hollocher TC. 1990. Steady-state nitric oxide concentrations during denitrification. J Biol Chem, 265(20): 11535-8.
- Green J y Baldwin ML. 1997. LixX, the Fnr homologue of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, is a [4Fe-4S]-containing oxygen-responsive transcription regulator that anaerobically activates Fnr-dependent class I promoters via an enhanced AR1 contact. Mol Microbiol, 24: 593-605.
- Grove J, Tanapongpipat S, Thomas G, Griffiths L, Crooke H, y Cole J. 1996. *Escherichia coli* K-12 genes essential for the synthesis of *c*-type cytochromes and a third nitrate reductase located in the periplasm. Mol Microbiol, 19: 467-481.
- Guest J, Green J, Irvine A y Spiro S. 1996. The FNR modulon and FNR-regulated gene expression, pp. 317-342. En Lin ECC, Symon Lynch A (eds), Regulation of gene expression in *E. coli*. RG Landes Company. Nueva York.
- Hageman RH y Hucklesby DP. 1971. Nitrate reduction from higher plants. Methods Enzymol, 491-503. Academic Press. Nueva York.
- Hakansson K, Broder D, Wang AH y Miller CG. 2000. Crystallization of peptidase T from *Salmonella typhimurium*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 56: 924-6.
- Hall VA y Guest JM. 1992. Sodium nitroprusside-induced cyanide intoxication and prevention with sodium thiosulfate prophylaxis. Am J Crit Care, 1 (2):19-25.
- Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J Mol Biol, 166: 557-580.
- Härtig E, Schiek U, Vollack KU, Zumft WG. 1999. Nitrate and nitrite control of respiratory nitrate reduction in denitrifying *Pseudomonas stutzeri* by a two-component regulatory system homologous to NarXL of *Escherichia coli*. J Bacteriol, 181: 3658-65.
- Hausladen A, Privalle CT, Keng T, DeAngelo J y Stamler JS. 1996. Nitrosative stress: activation of the transcription factor OxyR. Cell, 86 (5): 719-29.

- Heis B, Frunzke K y Zumft WG. 1989. Formation of the N-N bond from nitric oxide by a membrane-bound cytochrome *bc* complex of nitrate-respiring (denitrifying) *Pseudomonas stutzeri*. *J Bacteriol*, 171: 3288-3297.
- Hefti MH, Van Vugt-Van der Toorn CJ, Dixon R y Vervoort J. 2001. A novel purification method for histidine-tagged proteins containing a thrombin cleavage site. *Anal Biochem*, 295(2): 180-5.
- Hendriks J, Warne A, Gohlke U, Haltia T, Ludovici C, Lubben M y Saraste M. 1998. The active site of the bacterial nitric oxide reductase is a dinuclear iron center. *Biochemistry* 37: 13102-9.
- Hendriks J, Oubrie A, Castresana J, Urbani A, Gemeinhardt S y Saraste M. 2000. Nitric oxide reductases in bacteria. *Biochem Biophys Acta*, 1459: 266-273.
- Hengge-Aronis R. 1993. Survival of hunger and stress: the role of *rpoS* in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. *Cell*, 72 (2): 165-8.
- Heyduk T y Lee JC. 1989. *Escherichia coli* cAMP receptor protein: evidence for three protein conformational states with different promoter binding affinities. *Biochemistry*, 28 (17): 6914-24.
- Heyduk T, Lee JC, Ebright YW, Blatter EE, Zhou Y y Ebright RH. 1993. CAP interacts with RNA polymerase in solution in the absence of promoter DNA. *Nature*, 364 (6437): 548-9.
- Hochuli E, Dobeli H y Schacher A. 1987. New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J Chromatogr*, 411: 177-84.
- Hoffman T, Troup B, Szabo A, Hungerer C y Jahn D. 1995. The anaerobic life: of *Bacillus subtilis* cloning of the genes encoding the respiratory nitrate reductase system. *FEMS Microbiol Lett*, 131: 219-225.
- Holloway P, McCormick W, Watson RJ y Chan YK. 1996. Identification and analysis of the dissimilatory nitrous oxide reduction genes, *nosRZDFY*, of *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol*, 178: 1505-1514.
- Honisch U y Zumft WG. 2003. Operon structure and regulation of the *nos* gene region of *Pseudomonas stutzeri*, encoding an ABC-Type ATPase for maturation of nitrous oxide reductase. *J Bacteriol*, 185 (6): 1895-902.
- Hutchings MI, Shearer N, Wastell S, van Spanning RJ, Spiro S. 2000. Heterologous NNR-mediated nitric oxide signaling in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 182 (22): 6434-9.

- Jain R y Shapleigh JP. 2001. Characterization of *nirV* and a gene encoding a novel pseudoazurin in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3. *Microbiology* 147: 2505-15.
- Jepson BJ, Marietou A, Mohan S, Cole JA, Butler CS, Richardson DJ. 2006. Evolution of the soluble nitrate reductase: defining the monomeric periplasmic nitrate reductase subgroup. *Biochem Soc Trans*, 34: 122-6.
- Joung JK, Le LU y Hochschild A. 1993. Synergistic activation of transcription by *Escherichia coli* cAMP receptor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (7): 3083-7.
- Kalkowski I y Conrad R. 1991. Metabolism of nitric oxide in denitrifying *Pseudomonas aeruginosa* and nitrate-respiring *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett*, 66 (1): 107-11.
- Kamat JP. 2006. Peroxynitrite: a potent oxidizing and nitrating agent. *Indian J Exp Biol*, 44 (6): 436-47.
- Kaminski PA y Elmerich C. 1991. Involvement of *fixLJ* in the regulation of nitrogen fixation in *Azorhizobium caulinodans*. *Mol Microbiol*, 5: 665-673.
- Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Minamisawa K, Uchiumi T, Sasamoto T, Watanabe A, Idesawa K, Iriguchi M, Kawashima K, *et al.* 2002. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum*, *DNA Res*, 9: 189-197.
- Kennedy JR, Rigaud J y Trinchant JR. 1975. Nitrate reductase from bacteroids of *Rhizobium japonicum*: enzyme assay and characteristics and possible interaction with nitrogen fixation. *Biochim Biophys Acta*, 397: 24-35.
- Kobayashi M y Shoun H. 1995. The copper-containing dissimilatory nitrite reductase involved in the denitrifying system of the fungus *Fusarium oxysporum*. *J Biol Chem*, 270: 4146-4151.
- Kolb A, Busby S, Buc H, Garges S y Adhya S. 1993. Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu Rev Biochem*, 62: 749-95.
- Körner H, Sofia HJ y Zumft WG. 2003. Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiol Rev*, 27(5): 559-92.
- Kovach ME, Phillips RW, Elzer PH, Roop II RM y Peterson KM. 1994. pBBR1MCS: A broad-host-range cloning vector. *Biotechniques*, 16: 800-802.
- Kwiatkowski AV, Laratta WP, Toffanin A y Shapleigh JP. 1997. Analysis of the role of the *nnrR* gene product in the response of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 to exogenous nitric oxide. *J Bacteriol*, 179: 5618-5620.

- Kwiatkowski AV y 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.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.
- Lambden PR y Guest JR. 1976. Mutants of *Escherichia coli* K12 unable to use fumarate as an anaerobic electron acceptor. J Gen Microbiol, 97(2): 145-60.
- Langdon RC y Hochschild A. 1999. A genetic method for dissecting the mechanism of transcriptional activator synergy by identical activators. Proc Natl Acad Sci U S A, 96 (22): 12673-8.
- Laratta WP y Shapleigh JP. 2003. Site-directed mutagenesis of NnrR: a transcriptional regulator of nitrite and nitric oxide reductase in *Rhodobacter sphaeroides*. FEMS Microbiol Lett, 229 (2): 173-8.
- Law EC, Savery NJ y Busby SJ. 1999. Interactions between the *Escherichia coli* cAMP receptor protein and the C-terminal domain of the alpha subunit of RNA polymerase at class I promoters. Biochem J, 337: 415-23.
- Lawson CL, Swigon D, Murakami KS, Darst SA, Berman HM y Ebright RH. 2004. Catabolite activator protein: DNA binding and transcription activation. Curr Opin Struct Biol, 14 (1): 10-20.
- Lazazzera BA, Beinert H, Khoroshilova N, Kennedy MC y Kiley PJ. 1996. DNA binding and dimerization of the Fe-S-containing FNR protein from *Escherichia coli* are regulated by oxygen. J Biol Chem, 271(5): 2762-8.
- Lee YY, Shearer N y 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: 1461-70.
- Li J, Kustu S y Stewart V. 1994. In vitro interaction of nitrate-responsive regulatory protein NarL with DNA target sequences in the *fdnG*, *narG*, *narK* and *frdA* operon control regions of *Escherichia coli* K-12. J Mol Biol, 241 (2): 150-65.
- Lissenden S, Mohan S, Overton T, Regan T, Crooke H, Cardinale JA, Householder TC, Adams P, O'Conner CD, Clark VL, Smith H y Cole JA. 2000. Identification of transcription activators that regulate gonococcal adaptation from aerobic to anaerobic or oxygen-limited growth. Mol Microbiol, 37 (4): 839-55.

- Luque I, Herrero A, Flores E y Mandueño F. 1992. Clustering of genes involved in nitrate assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus*. *Mol Gen Genet*, 232:7-11.
- Magasanik B. 1982. Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. *Annu Rev Genet*, 16: 135-68.
- Malan TP, Kolb A, Buc H y McClure WR. 1984. Mechanism of CRP-cAMP activation of lac operon transcription initiation activation of the P1 promoter. *J Mol Biol*, 180 (4): 881-909.
- Martin E, Sharina I, Kots A y Murad F. 2003. A constitutively activated mutant of human soluble guanylyl cyclase (sGC): implication for the mechanism of sGC activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (16): 9208-13.
- McKay DB y Steitz TA. 1981. Structure of catabolite gene activator protein at 2,9 Å resolution suggests binding to left-handed B-DNA. *Nature*, 290 (5809): 744-9.
- McNicholas PM, Rech SA y Gunsalus RP. 1997. Characterization of the ModE DNA-binding sites in the control regions of *modABCD* and *moaABCDE* of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 23 (3): 515-2
- Membrillo-Hernandez J, Coopamah MD, Anjum MF, Stevanin TM, Kelly A, Hughes MN y Poole RK. 1999. The flavohemoglobin of *Escherichia coli* confers resistance to a nitrosating agent, a "Nitric oxide Releaser," and paraquat and is essential for transcriptional responses to oxidative stress. *J Biol Chem*, 274 (2): 748-54.
- Mesa S, Bedmar EJ, Chanfon A, Hennecke H y Fischer HM. 2003. *Bradyrhizobium japonicum* NnrR, a denitrification regulator, expands the FixLJ-FixK2 regulatory cascade. *J Bacteriol*, 185 (13): 3978-82.
- Mesa S, Velasco L, Manzanera ME, Delgado MJ y Bedmar EJ. 2002. Characterization of the *norCBQD* genes, encoding nitric oxide reductase, in the nitrogen fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Microbiology*, 148: 3553-60.
- Miller JH. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, CHS. New York.
- Miller A, Wood D, Ebright RH y Rothman-Denes LB. 1997. RNA polymerase beta' subunit: a target of DNA binding-independent activation. *Science*, 275 (5306): 1655-7.
- Mitchell DM, Wang Y, Alben JO y Shapleigh JP. 1998. FT-IR analysis of membranes of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3 grown under microaerobic and denitrifying conditions. *Biochim Biophys Acta* 1409: 99-105.

- Moreno-Vivián C, Cabello P, Martínez-Luque M, Blasco R y Castillo F. 1999. Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. *J Bacteriol*, 181 (21): 6573-84.
- Murakami K, Fujita N, Ishihama A. 1996. Transcription factor recognition surface on the RNA polymerase alpha subunit is involved in contact with the DNA enhancer element. *EMBO J*, 15 (16): 4358-67.
- Nellen-Anthamatten D, Rossi P, Kullik PI, Babst M, Fisher HM y Hennecke H. 1998. *Bradyrhizobium japonicum* FixK₂, a crucial distributor in the FixLJ-dependent regulatory cascade for control of genes inducible by low oxygen. *J Bacteriol*, 180: 5251-5255.
- Niu W, Kim Y, Tau G, Heyduk T y Ebright RH. 1996. Transcription activation at class II CAP-dependent promoters: two interactions between CAP and RNA polymerase. *Cell*, 87 (6): 1123-34.
- Ogawa KI, Akagawa E, Yamane K, Sun ZW, LaCell M, Zubeer P y Nakano MM. 1993. The *nasB* operon and *nasA* gene are required for nitrate (nitrite) assimilation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 177: 1409-1413.
- Palmedo G, Seither P, Korner H, Matthews JC, Burkhalter RS, Timkovich y Zumft WG. 1995. Resolution of the *nirD* locus for heme *d*₁ synthesis of cytochrome *cd*₁ (respiratory nitrite reductase) from *Pseudomonas stutzeri*. *Eur J Biochem*, 232: 737-746.
- Passner JM, Schultz SC y Steitz TA. 2000. Modeling the cAMP-induced allosteric transition using the crystal structure of CAP-cAMP at 2.1 Å resolution. *J Mol Biol*, 304 (5): 847-59.
- Philippot L, Clays-Josserand A, Lensi R, Trinsoutreau I, Normand P, Potier P. 1997. Purification of the dissimilative nitrate reductase of *Pseudomonas fluorescens* and the cloning and sequencing of its corresponding genes. *Biochim Biophys Acta*, 1350 (3): 272-6.
- Philippot L y Hojberg O. 1999. Dissimilatory nitrate reductases in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, 1446: 1-23.
- Pohlman A, Cramm R, Schmelz K y Friederich B. 2000. A novel NO-responding regulator controls the reduction of nitric oxide in *Ralstonia eutropha*. *Mol Microbiol*, 38: 626-638.
- Poole RK, Anjum MF, Membrillo-Hernandez J, Kim SO, Hughes MN y Stewart V. 1996. Nitric oxide, nitrite, and Fnr regulation of *hmp* (flavo-hemoglobin) gene expression in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 178 (18): 5487-92.

- Poole RK y Hughes MN. 2000. New functions for the ancient globin family: bacterial responses to nitric oxide and nitrosative stress. *Mol Microbiol*, 36 (4): 775-83.
- Prentki P y Krisch HM. 1984. In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene*, 29 (3): 303-13.
- Quandt J y Hynes MF. 1993. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene*, 127 (1): 15-21.
- Rabin RS, Collins LA y Stewart V. 1992. In vivo requirement of integration host factor for nar (nitrate reductase) operon expression in *Escherichia coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (18): 8701-5.
- Rabin RS y Stewart V. 1993. Dual response regulators (NarL and NarP) interact with dual sensors (NarX and NarQ) to control nitrate- and nitrite-regulated gene expression in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 175 (11): 3259-68.
- Rajagopalan T. 1938. *Indian J Agr Sci* 8: 379-402.
- Ramírez Bahena, ME. 2006. Estudio de la biodiversidad de las poblaciones de *Rhizobium* que establecen simbiosis con trébol en España. Universidad de Salamanca. Tesis doctoral.
- Ramos F, Blanco G, Gutierrez JC, Luque F y Tortolero M. 1993. Identification of an operon involved in the assimilatory nitrate-reducing system of *Azotobacter vinelandii*. *Mol Microbiol*, 20: 1145-1153.
- Regensburger B y Hennecke H. 1983. RNA polymerase from *Rhizobium japonicum*. *Arch Microbiol*, 135 (2): 103-9.
- Rhodus VA, West DM, Webster CL, Busby SJ y Savery NJ. 1997. Transcription activation at class II CRP-dependent promoters: the role of different activating regions. *Nucleic Acids Res*, 25 (2): 326-32.
- Richardson DJ, McEwan AG, Page MD, Jackson JB, y Ferguson SJ. 1990. The identification of cytochromes involved in the transfer of electrons to the periplasmic nitrate- reductase of *Rhodobacter capsulatus*. *Eur J Biochem*, 194: 263-70.
- Robles EF, Sanchez C, Bonnard N, Delgado MJ y Bedmar EJ. 2006. The *Bradyrhizobium japonicum* *napEDABC* genes are controlled by the FixLJ-FixK₂-NnrR regulatory cascade. *Biochem Soc Trans*, 34: 108-10.
- Rodríguez RL y Tait RC. 1983. Recombinant DNA techniques. Addison-Wesley Publishing.

- Ross W y Gourse RL. 2005. Sequence-independent upstream DNA-alphaCTD interactions strongly stimulate *Escherichia coli* RNA polymerase-lacUV5 promoter association. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (2): 291-6.
- Sabaty M, Schwintner C, Cahors S, Richaud P y Vermeglio A. 1999. Nitrite and nitrous oxide reductase regulation by nitrogen oxides in *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans* IL106. *J Bacteriol*, 181: 6028-32.
- Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York, N.Y.
- Saunders NF, Houben EN, Koefoed S, de Weert S, Reijnders WN, Westerhoff HV, De Boer AP y Van Spanning RJ. 1999. Transcription regulation of the *nir* gene cluster encoding nitrite reductase of *Paracoccus denitrificans* involves NNR and NirI, a novel type of membrane protein. *Mol Microbiol*, 34: 24-36.
- Saunders NF, Hornberg JJ, Reijnders WN, Westerhoff HV, de Vries S y Van Spanning RJM. 2000. The NosX and NirX proteins of *Paracoccus denitrificans* are functional homologues: their role in maturation of nitrous oxide reductase. *J Bacteriol*, 182: 5211-7.
- Savery NJ, Lloyd GS, Kainz M, Gaal T, Ross W, Ebright RH, Gourse RL y Busby SJ. 1998. Transcription activation at Class II CRP-dependent promoters: identification of determinants in the C-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit. *EMBO J*, 17(12): 3439-47.
- Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Puhler A. 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 (1): 69-73.
- Sears HJ, Bennett B, Spiro S, Thomson AJ, y Richardson DJ. 1995. Identification of periplasmic nitrate reductase Mo(V) EPR signals in intact cells of *Paracoccus denitrificans*. *Biochem J*, 310: 311-314.
- Sears HJ, Sawers G, Berks BC, Ferguson SJ y Richardson DJ. 2000. Control of periplasmic nitrate reductase gene expression (*napEDABC*) from *Paracoccus pantotrophus* in response to oxygen and carbon substrates. *Microbiology*, 146: 2977-85.
- Sears HJ, Spiro S y Richardson DJ. 1997. Effect of carbon substrate and aeration on nitrate reduction and expression of the periplasmic and membrane-bound nitrate reductases in

- carbon-limited continuous cultures of *Paracoccus denitrificans* Pd1222. *Microbiology*, 143: 3767-3774.
- Shaw DJ y Guest JR. 1982. Amplification and product identification of the *fnr* gene of *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol*, 128 (10): 2221-8.
- Shaw DJ, Rice DW y Guest JR. 1983. Homology between CAP and Fnr, a regulator of anaerobic respiration in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 166 (2): 241-7.
- Siddiqui RA, Warneckeberz U, Hengsberger A, Schneider B, Kostka S y Friedrich B. 1993. Structure and function of a periplasmic nitrate reductase in *Alcaligenes eutrophus* H16. *J Bacteriol*, 175: 5867-5876.
- Simon R, Priefer U y Pühler A. 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: Transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Biotechnology*, 1: 784-791.
- Snyder SW y Hollocher TC. 1987. Purification and some characteristics of nitrous oxide reductase from *Paracoccus denitrificans*. *J Biol Chem*, 262: 6515-25.
- Southern EM. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 98 (3): 503-17.
- Spaank HP, Okker JH, Wijffelman CA, Pees E y Lugtenberg BJJ. 1987. Promoters in the nodulation region of *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1JI. *Plant Mol Biol*. 9:27-39.
- Spencer ME y Guest JR. 1973. Isolation and properties of fumarate reductase mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 114 (2): 563-70.
- Spiro S. 1994. The FNR family of transcriptional regulators. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 66: 23-36.
- Spiro S y Guest JR. 1990. FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev*, 75: 399-428.
- Stach P, Einsle O, Schumacher W, Kurun E, Kroneck PM. 2000. Bacterial cytochrome c nitrite reductase: new structural and functional aspects. *J Inorg Biochem*. 79 (1-4): 381-5.
- Stamler JS. 1994. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*, 78 (6): 931-6.
- Stewart V. 1994. Regulation of nitrate and nitrite reductase synthesis in enterobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 66: 37-45.

- Stewart V y Bledsoe PJ. 2005. Fnr-, NarP- and NarL-dependent regulation of transcription initiation from the *Haemophilus influenzae* Rd *napF* (periplasmic nitrate reductase) promoter in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 187 (20): 6928-35.
- Stouthamer AH, de Boer AP, van der Oost J y van Spanning RJ. 1997. Emerging principles of inorganic nitrogen metabolism in *Paracoccus denitrificans* and related bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 71: 33-41.
- Takaya N. 2002. Dissimilatory nitrate reduction metabolisms and their control in fungi. *J Biosci Bioeng*, 94 (6): 506-10.
- Taoka A, Yoshimatsu K, Kanemori M, y Fukumori Y. 2003. Nitrate reductase from the magnetotactic bacterium *Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1: purification and sequence analyses. *Can J Microbiol*, 49 (3): 197-206.
- Taylor BL y Zhulin IB. 1999. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63 (2): 479-506.
- Teran W, Krell T, Ramos JL, Gallegos MT. 2006. Effector-repressor interactions, binding of a single effector molecule to the operator-bound TtgR homodimer mediates derepression. *J Biol Chem*, 281 (11): 7102-9.
- Terpe K. 2003. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60 (5): 523-33.
- Thorsteinsson MV, Kerby RL, Youn H, Conrad M, Serate J, Staples CR y Roberts GP. 2001. Redox-mediated transcriptional activation in a CooA variant. *J Biol Chem*, 276 (29): 26807-13.
- Toffanin A, Wu Q, Maskus M, Casella S, Abruna HD, y Shapleigh JP. 1996. Characterization of the gene encoding nitrite reductase and the physiological consequences of its expression in the 'nondenitrifying *Rhizobium "hedysari"* strain HCNT1. *Appl Environ Microbiol*, 62: 4019-4025.
- Toffanin, M. Basaglia, C. Ciardi, P. Vian, S. Povoletto y S. Casella. 2000. Energy content decrease and viable-not-culturable status induced by oxygen limitation coupled to the presence of nitrogen oxides in *Rhizobium "hedysari"*. *Biol. Fertil. Soils*, 31: 484-488.
- Tosques IE, Kwiatkowski AV, Shi J y Shapleigh JP. 1997. Characterization and regulation of the gene encoding nitrite reductase in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3. *J Bacteriol*, 179: 1090-1095.
- Tosques IE, Shi J y 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.

- Trageser M, Spiro S, Duchene A, Kojro E, Fahrenholz F, Guest JR y Uden G. 1990. Isolation of intact FNR protein (Mr 30,000) of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 4 (1): 21-7.
- Tuckerman JR, Gonzalez G y Gilles-Gonzalez MA. 2001. Complexation precedes phosphorylation for two-component regulatory system FixL/FixJ of *Sinorhizobium meliloti*. *J Mol Biol*, 308 (3): 449-55.
- Tuckerman JR, Gonzalez G, Dioum EM y Gilles-Gonzalez MA. 2002. Ligand and oxidation-state specific regulation of the heme-based oxygen sensor FixL from *Sinorhizobium meliloti*. *Biochemistry*, 41 (19): 6170-7.
- Uden G y Schirawski J. 1997. The oxygen-responsive transcriptional regulator FNR of *Escherichia coli*: the search for signals and reactions. *Mol Microbiol*, 25: 205-210.
- Van Spanning RJ, de Boer AP, Reijnders WN, Spiro S, Westerhoff HV, Stouthamer AH y van der Oost J. 1995. Nitrite and nitric oxide reduction in *Paracoccus denitrificans* is under the control of NNR, a regulatory protein that belongs to the FNR family of transcriptional activators. *FEBS Lett*, 360: 151-154.
- Van Spanning RJ, de Boer AP, Reijnders WN, Westerhoff HV, Stouthamer A y van Der Oost J. 1997. FnrP and NNR of *Paracoccus denitrificans* are both members of the FNR family of transcriptional activators but have distinct roles in respiratory adaptation in response to oxygen limitation. *Mol Microbiol*, 23:893-907.
- Van Spanning RJ, Delgado MJ y Richardson DJ. 2005. The nitrogen cycle: denitrification and its relationship to N₂ fixation, pp. 277-342. En Werner D y Newton E (eds), *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment*. Springer, NL.
- Van Spanning RJ, Houben E, Reijnders WN, Spiro S, Westerhoff HV y Saunders N. 1999. Nitric oxide reduction is a signal for NNR-mediated transcription activation in *Paracoccus denitrificans*. *J Bacteriol*, 181: 4129-4132.
- Velasco L, Mesa S, Delgado MJ y Bedmar EJ. 2001. Characterization of the *nirK* gene encoding the respiratory, Cu-containing nitrite reductase of *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochim Biophys Acta*, 1521 (1-3): 130-4.
- Velasco L, Mesa S, Xu CA, Delgado MJ y Bedmar EJ. 2004. Molecular characterization of *nosRZDFYLX* genes coding for denitrifying nitrous oxide reductase of *Bradyrhizobium japonicum*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 85 (3): 229-35.

- Vincent JM. 1970. A manual for the practical study of the root nodule bacteria. International Biological Programme Handbook 15. Blackwell. Oxford.
- Virts EL, Stanfield SW, Helinski DR y Ditta GS. 1988. Common regulatory elements control symbiotic and microaerobic induction of *nifA* in *Rhizobium meliloti*. Proc Natl Acad Sci U S A, 85 (9): 3062-5.
- Vollack K, Härtig E, Körner H y Zumft WG. 1999. Multiple transcription factors of the Fnr family in denitrifying *Pseudomonas stutzeri*: characterization of four *fnr*-like genes, regulatory responses and cognate metabolic processes. Mol Microbiol, 31: 1681-1694.
- Vollack KU y Zumft WG. 2001. Nitric oxide signaling and transcriptional control of denitrification genes in *Pseudomonas stutzeri*. J Bacteriol, 183: 2516-26.
- Wang H, Tseng CP y Gunsalus RP. 1999. The *napF* and *narG* nitrate reductase operons in *Escherichia coli* are differentially expressed in response to submicromolar concentrations of nitrate but not nitrite. J Bacteriol, 181: 5303-5308.
- Winkler WC, Gonzalez G, Wittenberg JB, Hille R, Dakappagari N, Jacob A, Gonzalez LA y Gilles-Gonzalez MA. 1996. Nonsteric factors dominate binding of nitric oxide, azide, imidazole, cyanide, and fluoride to the rhizobial heme-based oxygen sensor FixL. Chem Biol, 3 (10): 841-50.
- Williams R, Bell A, Sims G y Busby S. 1991. The role of two surface exposed loops in transcription activation by the *Escherichia coli* CRP and FNR proteins. Nucleic Acids Res, 19 (24): 6705-12.
- Wood NJ, Alizadeh T, Bennett S, Pearce J, Ferguson SJ, Richardson DJ y Moir JW. 2001. Maximal expression of membrane-bound nitrate reductase in *Paracoccus* is induced by nitrate via a third FNR-like regulator named NarR. J Bacteriol, 183: 3606-3613.
- Wood NJ, Alizadeh T, Richardson DJ, Ferguson SJ y Moir JW. 2002. Two domains of a dual-function NarK protein are required for nitrate uptake, the first step of denitrification in *Paracoccus pantotrophus*. Mol Microbiol, 44 (1): 157-70.
- Wu J y Filutowicz M. 1999. Hexahistidine (His₆)-tag dependent protein dimerization: a cautionary tale. Acta Biochim Pol, 46 (3): 591-9.
- Wunsch P y Zumft WG. 2005. Functional domains of NosR, a novel transmembrane iron-sulfur flavoprotein necessary for nitrous oxide respiration. J Bacteriol, 187 (6): 1992-2001.
- Yanisch-Perron C, Vieira J y Messing J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene, 33 (1): 103-19.

- Ye RW, Arunakumari A, Averill BA y Tiedje JM. 1992. Mutants of *Pseudomonas fluorescens* deficient in dissimilatory nitrite reduction are also altered in nitric oxide reduction. *J Bacteriol*, 174: 2560-2564.
- Ye RW, Haas D, Ka JO, Krishnapillai V, Zimmermann A, Baird C y Tiedje JM. 1995. Anaerobic activation of the entire denitrification pathway in *Pseudomonas aeruginosa* requires Anr, an analog of Fnr. *J Bacteriol*, 177 (12): 3606-9.
- Zhang X y Broderick M. 2000. Amperometric detection of nitric oxide. *Mod Asp Immunobiol*, 1 (4): 160-165.
- Zumft WG. 1993. The biological role of nitric oxide in bacteria. *Arch. Microbiol*, 160: 253-264.
- Zumft WG. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev*, 4: 533-616.
- Zumft WG. 2002. Nitric oxide signaling and NO dependent transcriptional control in bacterial denitrification by members of the FNR-CRP regulator family. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 4: 277-86.
- Zumft WG. 2005. Nitric oxide reductases of prokaryotes with emphasis on the respiratory, heme-copper oxidase type. *J Inorg Biochem*, 99 (1): 194-215.
- Zumft WG, Braun C y Cuypers H. 1994. Nitric oxide reductase from *Pseudomonas stutzeri*. Primary structure and gene organization of a novel bacterial cytochrome *bc* complex. *Eur J Biochem*, 219: 481-490.
- Zweier JL, Samouilov A y Kuppusamy P. 1999. Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems. *Biochim Biophys Acta*, 1411 (2-3): 250-62.