

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN



UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS



**DEGRADACIÓN ANAEROBIA DE COMPUESTOS
AROMÁTICOS HIDROXILADOS EN *Azoarcus*
anaerobius Y *Thauera aromatica* AR-1**

TESIS DOCTORAL

Águeda Molina Fuentes

2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Águeda Molina Fuentes
D.L.: GR 1729-2012
ISBN: 978-84-9028-087-4

**DEGRADACIÓN ANAEROBIA DE COMPUESTOS AROMÁTICOS
HIDROXILADOS EN *Azoarcus anaerobius* Y *Thauera aromatica* AR-1**

Memoria que presenta la licenciada en Biología,
Águeda Molina Fuentes,
para aspirar al Título de Doctor

Fdo.. **Águeda Molina Fuentes**

VºBº El Director

Fdo.: **Silvia Marqués Martín**

Doctora en Biología

Investigadora Científica del C.S.I.C.

Universidad de Granada
2012

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Protección Ambiental de la Estación Experimental del Zaidín (C.S.I.C), Granada

**A mi abuela
A mi madre
A Paco**

**“El que sólo busca la salida no entiende el laberinto,
y, aunque la encuentre, saldrá sin haberlo entendido”**

José Bergamín

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
1. COMPUESTOS AROMÁTICOS EN LA NATURALEZA Y SU BIODEGRADACIÓN	3
1.1 Metabolismo aeróbico de compuestos aromáticos	6
1.2 Metabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos	8
1.2.1 Ruta del benzoil-CoA	9
2. DEGRADACIÓN ANAERÓBICA DE AROMÁTICOS HIDROXILADOS	12
2.1 Degradación de fenol	12
2.2 Degradación de hidroquinona y catecol	13
2.3 Degradación de trihidroxibenzenos y trihidroxibenzoatos	14
2.4 Degradación de resorcinol y α -resorcilato (3,5-DHB)	16
3. DEGRADACIÓN DE RESORCINOL POR <i>Azoarcus anaerobius</i>	18
4. DEGRADACIÓN DE α -RESORCILATO POR <i>Thauera aromatica</i> AR-1	22
5. REGULACIÓN DE LA DEGRADACIÓN ANAEROBIA DE COMPUESTOS AROMÁTICOS	24
5.1 Reguladores transcripcionales de promotores dependientes de σ^{54}	25
5.2 Reguladores transcripcionales de la familia LysR	30
5.2.1 Regulación transcripcional por LTTR	31
6. REGULACIÓN GLOBAL	33
6.1 Regulación por oxígeno	33
6.2 Represión catabólica	35
OBJETIVOS	37
MATERIALES Y MÉTODOS	41
1. CEPAS BACTERIANAS	43
2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	44
2.1 Medios ricos	44
2.2 Medios mínimos	44
2.3 Obtención de las condiciones anaeróbicas en los medios de cultivo	45
2.4 Antibióticos	45
2.5 Condiciones de cultivo	45
2.6 Conservación de las cepas bacterianas	46
3. PLÁSMIDOS	46

4. AISLAMIENTO DE ADN	48
4.1 Aislamiento de ADN plasmídico	48
4.1.1 Método “Quiapreps”	48
4.1.2 Método de lisis alcalina	48
4.2 Aislamiento de ADN cromosómico	49
5. TRANSFERENCIA DE PLÁSMIDOS	49
5.1 Conjugación	49
5.2 Transformación por choque térmico	50
5.3 Electroporación	50
6. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ADN Y ARN	51
6.1 Determinación de la concentración de ADN y ARN	51
6.2 Digestión de ADN con enzimas de restricción	51
6.3 Defosforilación de ADN con fosfatasa alcalina	51
6.4 Tratamiento del ADN con el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I	52
6.5 Electroforesis de ADN y ARN	52
6.6 Recuperación de fragmentos de ADN de geles de agarosa	53
6.7 Ligación de ADN	53
6.8 Reacción en cadena con ADN polimerasa (PCR)	53
6.8.1 PCR de colonia	54
6.9 Secuenciación de ADN	55
6.10 Extracción de ARN	56
6.11 Reacción en cadena con ADN polimerasa acoplada a transcripción reversa (RT-PCR)	57
6.12 Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente a tiempo real (PCR a tiempo real)	59
6.12.1 Síntesis de ADNc	60
6.12.2 Cálculo de la eficiencia de la PCR a tiempo real	60
6.12.3 Cuantificación de ADNc en PCR a tiempo real	61
7. EXTENSIÓN REVERSA A PARTIR DE CEBADOR	62
7.1 Marcaje de cebadores	62
7.2 Reacción de extensión	63
7.3 Separación de las cadenas extendidas de ADNc mediante electroforesis en gel desnaturizante	63
8. CONSTRUCCIÓN DE GENOTECA EN CÓSMIDO	
DE <i>Thauera aromatica</i> AR-1	64
8.1 Restricciones parciales de ADN y ligación	64
8.2 Empaquetamiento de cósmidos	64

8.3 Preparación de células transfectantes de <i>E. coli</i> HB101 y su transfección	64
9. TRANSFERENCIA DE ADN A MEMBRANA POR EL MÉTODO DE “SOUTHERN BLOT” E HIBRIDACIÓN	65
9.1 Transferencia de ADN	65
9.1.1 Transferencia de ADN por capilaridad	65
9.1.2 Transferencia de ADN mediante hibridación de colonia	66
9.2 Marcaje no radiactivo de ADN lineal	67
9.3 Prehibridación e hibridación	67
9.4 Detección	67
9.5 Reutilización de las membranas	68
10. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES	68
10.1 Mutagénesis dirigida utilizando pCHESIQkM	68
10.2 Mutagénesis al azar mediante pUT-Km	69
11. ENSAYOS ENZIMÁTICOS	70
11.1 Preparación de extracto celular de <i>T. aromatica</i> AR-1	70
11.2 Determinación de la actividad enzimática 3,5-DHB hidroxilasa	70
12. TÉCNICAS ANALÍTICAS	71
12.1 Determinación de 3,5-dihidroxibenzoato (3,5-DHB)	71
12.2 Determinación de succinato y otros metabolitos	71
12.3 Determinación de nitrato y nitrito	72
12.3.1 Mediante HPLC	72
12.3.2 Mediante el método de diazotación de Snell y Snell, 1949	72
13. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS	72
RESULTADOS	75
CAPÍTULO I:	
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA RUTA DE DEGRADACIÓN DE RESORCINOL (1,3-DIHIDROXIBENCENO) EN <i>Azoarcus anaerobius</i>	77
1. ORGANIZACIÓN TRANSCRIPCIONAL Y EXPRESIÓN DE LOS OPERONES PARA LA DEGRADACIÓN DE RESORCINOL	80
1.1 Organización transcripcional de los genes de la ruta de degradación de resorcinol	80
1.2 Expresión de los operones I, II y IV	83
2. ANÁLISIS DE LOS PROMOTORES QUE CONTROLAN LA EXPRESIÓN DE LA RUTA DE DEGRADACIÓN DE RESORCINOL	84

2.1 Caracterización de la región promotora del operón I	84
2.2 Caracterización de la región promotora del operón II	86
2.3 Caracterización de la región promotora del operón IV	88
2.4 Elementos reguladores conservados en los promotores que controlan la degradación de resorcinol	89
3. ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS REGULADORAS RedR1 Y RedR2 PRESENTES EN LA AGRUPACIÓN GÉNICA DE DEGRADACIÓN DE RESORCINOL	90
3.1 Análisis de la secuencia de las proteínas reguladoras RedR1 y RedR2	90
3.2 Identificación del regulador de la ruta	93
3.2.1 Crecimiento de los mutantes en los genes reguladores <i>redR1</i> , <i>redR2</i> y en el primer paso de la ruta, <i>rhL</i>	94
3.2.2 Expresión de los operones I, II y IV en ausencia de los reguladores RedR1 y RedR2	95
4. BÚSQUEDA DE POSIBLES INDUCTORES ESPECÍFICOS DE LA RUTA DE DEGRADACIÓN DE RESORCINOL	97
4.1 Identificación del inductor de la ruta	97
4.2 Análogos estructurales a la HHQ como posibles inductores de la ruta	99
CAPÍTULO II:	
DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES INVOLUCRADOS EN LA DEGRADACIÓN DE α-RESORCILATO (3,5-DIHIIDROXIBENZOATO) EN <i>Thauera aromatica</i> AR-1	101
1. DETECCIÓN DE LOS GENES DE DEGRADACIÓN DE 3,5-DHB	103
1.1 Búsqueda por homología con genes de la ruta de degradación de resorcinol de <i>A. anaerobius</i>	103
1.2 Identificación de cósmidos portadores de genes para la degradación de 3,5-DHB en la genoteca de <i>T. aromatica</i> AR-1	105
2. SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN CODIFICANTE DE LA RUTA DE DEGRADACIÓN DE 3,5-DHB DE <i>T. aromatica</i> AR-1	107
3. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA: ANOTACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN LA DEGRADACIÓN ANAERÓBICA DE 3,5-DHB	110
3.1 Análisis de secuencia. Búsqueda de los marcos abiertos de lectura (ORFs)	110
3.2 Mutantes de <i>T. aromatica</i> AR-1	129

CAPITULO III:

ESTUDIO DE LA REGULACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES

DE LA RUTA DE DEGRADACIÓN DE 3,5-DHB EN *Thauera aromatica* AR-1 135

1. ORGANIZACIÓN GÉNICA Y EXPRESIÓN DE LA RUTA DE DEGRADACIÓN DE 3,5-DHB EN *Thauera aromatica* AR-1 137
 - 1.1 Expresión de los genes *dbhLS* de *T. aromatica* AR-1 137
 - 1.2 Organización transcripcional de los genes para la degradación de 3,5-DHB de *T. aromatica* AR-1 138
2. IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES PROMOTORES IMPLICADOS EN LA DEGRADACIÓN DE 3,5-DHB EN *Thauera aromatica* AR-1 140
 - 2.1 Caracterización de la región promotora del gen *dbhL* (P_{dbhL}) 141
 - 2.2 Caracterización de la región promotora de *orf18* (P_{orf18}) 142
 - 2.3 Caracterización de la región promotora de *orf20* (P_{orf20}) 144
3. IDENTIFICACIÓN DEL INDUCTOR ESPECÍFICO DE LA RUTA DE DEGRADACIÓN DE 3,5-DHB 146
4. EFECTO DE FUENTES DE CARBONO ALTERNATIVAS SOBRE LA DEGRADACIÓN DE 3,5-DHB POR *T. aromatica* AR-1 148
 - 4.1 Caracterización del crecimiento de *T. aromatica* AR-1 en presencia de dos fuentes alternativas de carbono 148
 - 4.2 Efectos en la degradación de 3,5-DHB en los mutantes de *T. aromatica* AR -1 en presencia de una fuente adicional de carbono 150

DISCUSIÓN 151

1. Organización transcripcional y expresión de los genes para la degradación de resorcinol en *A. anaerobius* 153
2. Detección e identificación de los genes involucrados en la degradación de α -resorcilato (3,5-dihidroxibenzoato) en *T. aromatica* 165
3. Evidencias de represión catabólica en la degradación de resorcinol y 3,5-DHB 175
4. Diferencias y semejanzas en la degradación de resorcinol y 3,5-DHB en bacterias nitratorreductoras 177

CONCLUSIONES 183

BIBLIOGRAFÍA 187

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fuentes naturales y antropogénicas de compuestos aromáticos en la naturaleza.	3
Figura 2. Utilización microbiana de los compuestos aromáticos.	5
Figura 3. Acción de monooxigenas y dioxigenasas en el metabolismo aeróbico.	7
Figura 4. Esquema del catabolismo anaerobio de compuestos aromáticos, donde se puede apreciar las rutas periféricas y el denominado embudo catabólico.	8
Figura 5. Reacciones enzimáticas de la ruta de degradación de benzoato.	10
Figura 6. Organización de los genes involucrados en el metabolismo anaeróbico del benzoato.	11
Figura 7. Pasos iniciales en la degradación de fenol por la bacteria nitrato reductora <i>T. aromatica</i> .	12
Figura 8. Pasos iniciales en la degradación de hidroquinona y catecol por bacterias sulfatorreductoras y fermentadoras.	14
Figura 9. A) Degradación de trihidroxibencenos por bacterias fermentadoras. B) Reacción de transhidroxilación pirogalol-floroglucinol en <i>Pelobacter acidigacilli</i> .	15
Figura 10. Reducción de HHQ por una HHQ reductasa en <i>Desulfovibrio inopinatus</i> .y formación de distintas formas tautoméricas de la dihidrohidroxihidroquinona.	16
Figura 11. Pasos iniciales en la degradación anaeróbica de resorcinol y α -resorcilato.	17
Figura 12. Relación filogenética basada en el ARNr 16S que relaciona la cepa LuFRes1 ^T con otros miembros muy relacionados pertenecientes a la subclase de las β -proteobacterias.	19
Figura 13. Ruta de degradación de resorcinol en <i>A. anaerobius</i> .	20
Figura 14. Ruta de degradación de α -resorcilato en <i>Thauera aromatica</i> .	23
Figura 15. Mecanismo de acción de la ARN polimerasa en promotores dependientes de σ^{54} .	26
Figura 16. Representación esquemática de los dominios de una proteína de la familia de reguladores dependientes de σ^{54} (familia NtrC).	27
Figura 17. Modelo de activación de DmpR y XylR por su efector aromático específico.	29
Figura 18. Modelo de organización en dominios de los reguladores LTTR.	31
Figura 19. Representación esquemática de los pasos de la activación transcripcional de un regulador LysR.	33
Figura 20. Esquema representativo de mutagénesis por inserción mediante el plásmido pCHESI Ω Km.	69

Figura 21. Organización transcripcional del cluster de genes de degradación de resorcinol de <i>A. anaerobius</i> entre la <i>orf4</i> y <i>redR2</i> .	82
Figura 22. Promotor P_{rhL} .	85
Figura 23. Promotor P_{bqdhL} .	87
Figura 24. Promotor P_{orf14} de <i>A. anaerobius</i> .	88
Figura 25. Alineamiento del sitio de unión de la ARN polimerasa de los promotores P_{rhL} , P_{bqdhL} y P_{orf14} .	89
Figura 26. Alineamiento del sitio de reconocimiento de IHF en los promotores P_{rhL} , P_{bqdhL} y P_{orf14} .	90
Figura 27. Alineamiento de las repeticiones invertidas encontradas aguas arriba de <i>rhL</i> , <i>bqdhL</i> y <i>orf14</i> .	90
Figura 28. Alineamiento de la secuencia de las proteínas RedR1 y RedR2.	92
Figura 29. Estructura del dominio PAS de RedR2.	93
Figura 30. Efecto de la mutación de los genes reguladores <i>redR1</i> , <i>redR2</i> y <i>rhL</i> sobre la capacidad de utilizar resorcinol.	94
Figura 31. Efecto de la inactivación de los genes reguladores <i>redR1</i> y <i>redR2</i> sobre la expresión desde el promotor <i>PrhL</i> .	95
Figura 32. Efecto de la inactivación de los genes reguladores <i>redR1</i> y <i>redR2</i> sobre la expresión desde el promotor P_{bqdhL} .	96
Figura 33. Efecto de la inactivación de los genes reguladores <i>redR1</i> y <i>redR2</i> sobre la expresión desde el promotor P_{orf14} .	96
Figura 34. Efecto de mutaciones en los tres primeros pasos de la ruta sobre la inducción de los operones I, II y IV.	98
Figura 35. Estructura de las moléculas aromáticas protocatecuato, HHQ y catecol.	99
Figura 36. Efecto de la presencia de análogos estructurales a la HHQ sobre la inducción de los operones I, II y IV.	100
Figura 37. Hibridación <i>Southern</i> de ADN cromosómico de <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 (KT), <i>Thauera aromatica</i> AR-1 (Th) y <i>Azoarcus anaerobius</i> (Az) digeridos con <i>Pst</i> I o <i>Eco</i> R1 e hibridado con las sondas A-TH (A) y PyDHE2 (B).	104
Figura 38. Restricción de cósmidos de la genoteca de <i>T. aromatica</i> AR-1.	105
Figura 39. Mapa completo del cósmido pCOS4 dónde se indican los marcos abiertos de lectura y su anotación basada en la homología presentada al compararlos con la base de datos empleando blastx.	108
Figura 40. Esquema de la región completa resultante de la secuenciación de los cósmidos pCOS2B, 6B, 12, 19 y 4.	110
Figura 41. Alineamiento múltiple entre el producto de <i>orf7</i> de <i>T. aromatica</i> AR-1, RhL de <i>A. anaerobius</i> y AthL de <i>P. acidigacilli</i> .	114

Figura 42. Alineamiento del producto de <i>orf8</i> de <i>T. aromatica</i> AR-1, RhS de <i>A. anaerobius</i> y BthL de <i>P. acidigacilli</i> .	116
Figura 43. La homología estructural de los productos de <i>orf9</i> y <i>orf10</i> <i>T. aromática</i> , y <i>cup</i> de <i>A. anaerobius</i> .	117
Figura 44. Alineamiento múltiple del producto de <i>orf9</i> de <i>T. aromatica</i> AR-1 Cup de <i>A. anaerobius</i> y Cup de <i>Coprobacillus</i> sp. 29_1 (ZP_08011617.1).	118
Figura 45. Alineamiento del producto de <i>orf11</i> de <i>T. aromatica</i> AR-1 con BtdhL de <i>A. anaerobius</i> .	119
Figura 46. Alineamiento del producto de <i>orf19</i> de <i>T. aromatica</i> AR-1 y BqdhM de <i>A. anaerobius</i>	122
Figura 47. Alineamiento de los productos de <i>orf20</i> de <i>T. aromatica</i> AR-1 y <i>orf12</i> de <i>A. anaerobius</i> .	123
Figura 48. Alineamiento de los productos de <i>orf21</i> de <i>T. aromatica</i> y de <i>orf10</i> de <i>A. anaerobius</i> .	124
Figura 49. Alineamiento del producto de <i>orf22</i> de <i>T. aromatica</i> AR-1 y BqdhL de <i>A. anaerobius</i> .	126
Figura 50. Alineamiento entre los productos de <i>orf23</i> de <i>T. aromatica</i> AR-1 y <i>orf5</i> de <i>A. anaerobius</i> .	127
Figura 51. Alineamiento del producto de <i>orf24</i> de <i>T. aromatica</i> AR-1 y BqdhS de <i>A. anaerobius</i> .	127
Figura 52. Alineamiento del producto de <i>orf25</i> de <i>T. aromatica</i> AR-1 con el regulador YP_297902.1 de <i>R. eutropha</i> JMP134.	128
Figura 53. Crecimiento de <i>T. aromatica</i> AR-1 silvestre y sus mutantes en <i>dbhL</i> , <i>dbhS</i> , <i>orf13</i> , <i>bqdM</i> , <i>orf20</i> , <i>orf21</i> y <i>bqdL</i>	130
Figura 54. Crecimiento de distintas cepas de <i>T. aromatica</i> AR-1.	130
Figura 55. Actividad específica 3,5-DHB hidroxilasa en extractos celulares de <i>T. aromatica</i> AR-1 silvestre (WT) y de los mutantes AR-1Mut Ω <i>dbhL</i> (Δ <i>dbhL</i>) y AR-1Mut Ω <i>dbhS</i> (Δ <i>dbhS</i>).	131
Figura 56. Actividad específica 3,5-DHB hidroxilasa a distintos tiempos durante el crecimiento de <i>T. aromatica</i> AR-1 (azul) y de los mutantes AR-1Mut Ω <i>dhbL</i> (amarillo) y AR-1Mut Ω <i>dhbS</i> (morado).	132
Figura 57. Actividad específica 3,5-DHB hidroxilasa en <i>T. aromatica</i> AR-1 (wt) y mutantes crecidos anaeróbicamente con 3,5-DHB (1 mM), succinato (2 mM) y NO ₃ (8 mM) como aceptor final de electrones.	132
Figura 58. Degradación de 3,5-DHB por la cepa mutante <i>bqdM</i> .	133
Figura 59. Expresión de los genes <i>dbhLS</i> en células cultivadas con distintas fuentes de carbono	138

Figura 60. Organización transcripcional del cluster de genes de degradación de 3,5-DHB de <i>T. aromatica</i> AR-1 entre la orf5 hasta la orf25.	139
Figura 61. Determinación del punto de inicio de la transcripción y secuencia del promotor P _{dbhL} .	142
Figura 62. Determinación del punto de inicio de la transcripción y secuencia del promotor P _{orf18} .	143
Figura 63. Determinación del punto de inicio de la transcripción y secuencia del promotor P _{orf20} .	144
Figura 64. Alineamiento de la secuencia que corresponde con el posible sitio ABS de unión de reguladores LysR.	145
Figura 65. Bandas de expresión constitutiva delante de los genes orf18 y orf20.	145
Figura 66. Expresión del operón B en la cepa silvestre de <i>T. aromatica</i> AR-1 y en los mutantes de la ruta de degradación de 3,5DHB.	146
Figura 67. Identificación del inductor de la ruta de degradación 3,5-DHB.	147
Figura 68. Crecimiento diauxico de <i>T. aromatica</i> AR-1 con succinato (3,5 mM), 3,5-DHB (1 mM) y KNO ₃ (8 mM) como aceptor final de electrones.	149
Figura 69. Crecimiento de las cepas mutantes dbhS (A) y bqdM (B) con succinato (3,5 mM), 3,5-DHB (1 mM) y KNO ₃ (8 mM) como aceptor final de electrones.	150
Figura 70. Principales pasos enzimáticos implicados en la ruta de degradación de resorcinol.	157
Figura 71. Esquema que muestra la transferencia de electrones en la oxidación de HHQ hasta HBQ mediada por BtdhLS.	152
Figura. 72. Modelo de regulación en la degradación de resorcinol en <i>A. anaerobius</i> .	164
Figura 73. Ejemplos de organización genética de transportadores TRAP.	171
Figura 74. Principales pasos enzimáticos implicados en la ruta de degradación de 3,5-DHB.	172
Figura 75. Alineamiento de la región promotora de los genes dbhL, orf18 y orf20.	174
Figura 76. Comparación entre las rutas de degradación de resorcinol y 3,5-DHB.	178
Figura 77. Árbol filogenético construido a partir de las secuencias de proteínas más relacionadas con DbhL (A) y DbhS (B)	179
Figura78. Árbol filogenético construido a partir de las secuencias de proteínas más relacionadas con BqdhL (A), BqdhS (B) y BqdhM (C)	181

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo.	43
Tabla 2. Plásmidos utilizados y construidos en este trabajo.	46
Tabla 3. Pareja de oligonucleótidos sintéticos utilizados en este trabajo para la amplificación de productos por PCR	54
Tabla 4A. Pares de oligonucleótidos sintéticos utilizados en este trabajo para la amplificación de productos por RT-PCR a partir de ARN de <i>T. aromatica</i> AR-1	57
Tabla 4B. Oligonucleótidos sintéticos utilizados en este trabajo para la amplificación de productos por RT-PCR a partir de ARN de <i>A. anaerobius</i>	58
Tabla 5. Oligonucleótidos complementarios a secuencias de <i>A. anaerobius</i> utilizados en la PCR a tiempo real.	61
Tabla 6. Oligonucleótidos empleados para la extensión a partir de cebador	62
Tabla 7. Cambios en la anotación del cluster de degradación de resorcinol de <i>A. anaerobius</i>	79
Tabla 8. Niveles de inducción de los principales operones implicados en la degradación de resorcinol en <i>A. anaerobius</i>	84
Tabla 9. Sondas utilizadas para la búsqueda de genes por homología de secuencia	104
Tabla 10. Primeras secuencias detectadas con homología a genes para la degradación de resorcinol en <i>A. anaerobius</i>	106
Tabla 11. Sondas utilizadas para la búsqueda de cósmidos solapantes a pCOS4	109
Tabla 12. Hibridación de las sondas <i>dbhL</i> , <i>dbhS</i> , <i>dctP</i> , <i>mob</i> , <i>bqdl</i> y <i>lysR</i> con los cósmidos de la genoteca de <i>T. aromatica</i> AR-1.	109
Tabla 13. Propiedades de los genes y productos génicos de la secuencia parcial de <i>T. aromatica</i> AR-1	112
Tabla 14. Resumen de correspondencia entre genes de <i>A. anaerobius</i> y genes <i>T. aromatica</i> .	129

INTRODUCCIÓN

1. COMPUESTOS AROMÁTICOS EN LA NATURALEZA Y SU BIODEGRADACIÓN

Los compuestos aromáticos son abundantes en la naturaleza, donde desempeñan gran variedad de funciones. Presentan mucha diversidad estructural, y son producidos o transformados por una gran variedad de organismos, siendo las plantas las que más prolíficamente los producen y los microorganismos los que más los utilizan como sustrato, pudiendo servir como sustrato para el crecimiento de numerosas bacterias (Figura 1). Muchos compuestos naturales, entre los que se incluyen algunos aminoácidos como el triptófano, fenilalanina y tiroxina, tienen anillos aromáticos; también las quinonas y los flavonoides, que actúan como componentes de membrana en la transferencia de electrones, o los compuestos fenólicos y taninos, y numerosas coenzimas aromáticas que participan en las reacciones enzimáticas. Además, la estructura del anillo aromático se encuentra en polímeros como la lignina de plantas superiores, que supone el 30% del material de la planta y es el segundo polímero en importancia en la naturaleza después de la celulosa (Adler, 1977; Heider and Fuchs, 1997). También los compuestos aromáticos son importantes constituyentes de los tejidos de las plantas, donde actúan como protectores frente a la invasión de microorganismos, o polimerizan en contacto con el aire para sellar las heridas (Schink et al., 2000).

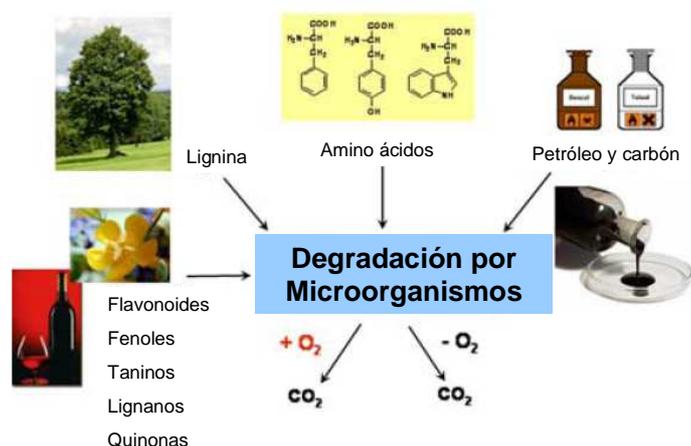


Figura 1. Fuentes naturales y antropogénicas de compuestos aromáticos en la naturaleza. Tomado de (Fuchs, 2008).

Los compuestos aromáticos presentes en la naturaleza también pueden ser de origen sintético, y desempeñan una gran variedad de funciones en la industria. La actividad industrial libera de forma continuada al medio ambiente numerosos

contaminantes de distinta naturaleza. Por ejemplo, la industria farmacéutica y química liberan un amplio rango de compuestos xenobióticos y polímeros sintéticos; la industria del papel libera al ambiente compuestos orgánicos clorados; los combustibles fósiles (carbón y petróleo) pueden liberarse accidentalmente y contaminar ecosistemas; y no hay que olvidar la agricultura intensiva, que libera una gran cantidad de fertilizantes, pesticidas y herbicidas (Dua et al., 2002; Rieger et al., 2002; Diaz, 2004). La mayoría de estos contaminantes liberados al medio ambiente por el hombre son compuestos tóxicos para los organismos vivos. Entre ellos, los compuestos aromáticos constituyen uno de los motivos principales de preocupación de las Agencias Medioambientales debido a su gran persistencia en el medio ambiente, gracias en parte a la gran estabilidad del anillo aromático. Es sabido que los contaminantes aromáticos tienen efectos tóxicos en el hombre, muchos de ellos son carcinogénicos, mutagénicos y pueden tener efectos teratógenos. Debido a su toxicidad y al incremento del riesgo de causar cáncer, la concentración permitida de compuestos aromáticos en el agua potable está estrictamente regulada.

Plantas y animales son capaces de modificar la estructura del anillo aromático y degradar un número limitado de estos compuestos, pero no contribuyen en gran medida a su mineralización; en la naturaleza, ésta la llevan a cabo esencialmente los microorganismos, especialmente hongos y bacterias que son capaces de atacar incluso grandes polímeros como la lignina en presencia de oxígeno molecular. Los compuestos aromáticos de bajo peso molecular pueden ser usados como sustrato para el crecimiento por organismos aerobios, como hongos, bacterias y algunas algas; además, algunas bacterias los pueden usar como sustrato en condiciones anaeróbicas (Heider and Fuchs, 1997).

Esta gran habilidad de las bacterias para utilizar muchos compuestos aromáticos se debe, como hemos visto, a que muchos de ellos son muy comunes en el medio ambiente. Sin embargo, otros son relativamente recientes, como es el caso de los compuestos xenobióticos de origen antropogénico y que sólo han estado en contacto con la microbiota desde la era industrial (unos 100 años). A pesar de esto, es posible encontrar bacterias capaces de degradar algunos de ellos (Diaz, 2004).

El oxígeno es el principal aceptor de electrones en la respiración microbiana, y la respiración aerobia es la que más energía proporciona a la célula (Figura 2).

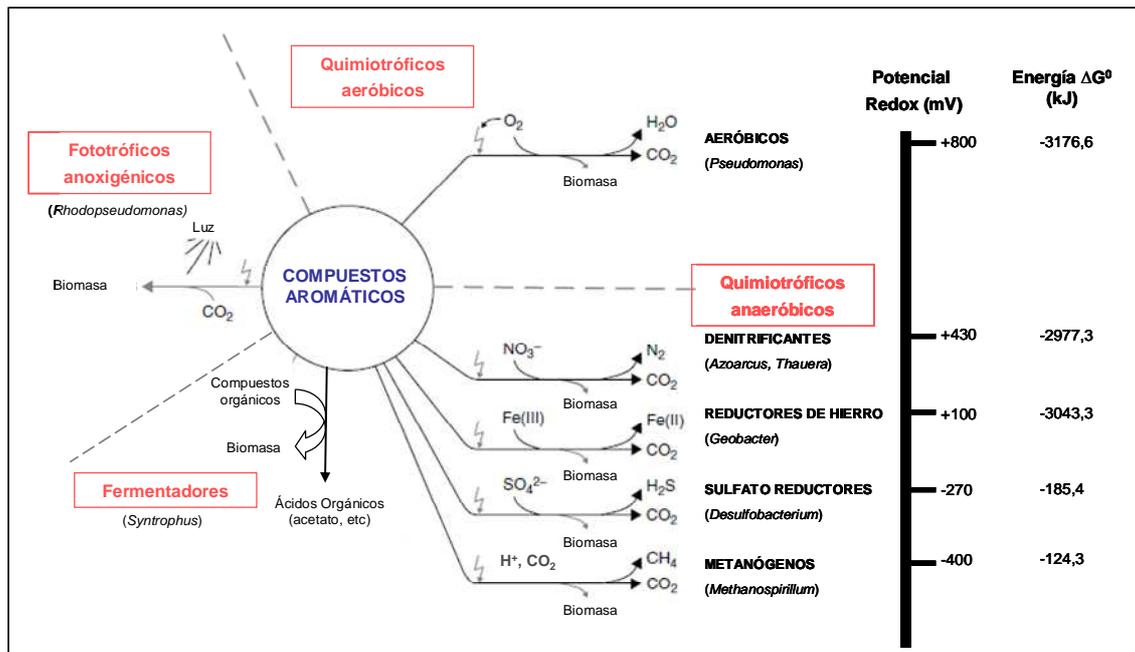


Figura 2. Utilización microbiana de los compuestos aromáticos. A la derecha, la energética de la degradación con los distintos tipos de respiración (aeróbica y anaeróbica) utilizando como compuesto modelo el benzoato. La metanogénesis necesita una reacción de fermentación acoplada. Los géneros bacterianos representativos de cada tipo de metabolismo están entre paréntesis. Los distintos tipos de microorganismos en base a su respiración se presentan en recuadros en color rojo (Widdel and Rabus, 2001; Diaz, 2004)

Existe una gran diversidad filogenética de microorganismos capaces de degradar aromáticos aeróbicamente, que han sido estudiados profusamente en los últimos 60 años (Kreft and Schink, 1994). Sin embargo, muchos de los ambientes contaminados son a menudo anóxicos, como lo son algunos acuíferos contaminados, los sedimentos marinos o de agua dulce, suelos anegados, etc. En estos ambientes los procesos activos son esencialmente anaerobios, y la biodegradación de los compuestos aromáticos puede ocurrir en condiciones de anaerobiosis tanto estricta, como facultativa si el ambiente es microaerófilo. En estos entornos los microorganismos utilizan aceptores de electrones alternativos al oxígeno, como nitrato (bacterias nitratorreductoras, *nitrate reducing bacteria*, NRB), sulfato (bacterias sulfatorreductoras, *sulfate reducing bacteria* SRB), Fe (III) (bacterias reductoras de ión férrico), CO₂ (metanógenas) u otros aceptores (clorato, Mn, Cr, U, etc.) (Figura 2) (Widdel and Rabus, 2001; Gibson and Harwood, 2002; Lovley, 2003; Diaz, 2004).

El uso de aceptores de electrones diferentes del oxígeno por la microbiota autóctona en un determinado entorno va a depender de su disponibilidad y de la competencia entre los organismos con diferentes tipos de respiración por los donadores de electrones (Lovley, 2003; Diaz, 2004). Como se muestra en la figura 2,

en términos energéticos, la degradación de aromáticos utilizando nitrato y Fe(III) como aceptor final de electrones es casi tan eficiente como el uso de oxígeno; sin embargo, las bacterias reductoras de sulfato y las metanógenas generan comparativamente mucha menos energía (Field et al., 1995; Diaz, 2004). Por su parte, los organismos fermentadores sólo consiguen llevar a cabo una biodegradación completa en sintrofia, ya que sólo es energéticamente favorable cuando está acompañada de la utilización de los productos finales generados durante la fermentación por parte de metanógenos o SRB. Finalmente, las bacterias fotosintéticas obtienen la energía de la luz y degradan los compuestos aromáticos anaeróbicamente hasta formar metabolitos intermediarios, como acetil-CoA, que es utilizado después en reacciones biosintéticas (Gibson and Harwood, 2002; Diaz, 2004). En general existe una gran diversidad en el metabolismo de compuestos aromáticos, que en la naturaleza va a depender de la disponibilidad de oxígeno y de la capacidad de utilizar aceptores de electrones alternativos para la respiración. La presencia de microorganismos con esta capacidad supone una ventaja cuando se producen fluctuaciones entre condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Fuchs, 2008).

Como hemos visto, en el medio ambiente se encuentran numerosos compuestos aromáticos, y los microorganismos son los principales biodegradadores. Las técnicas de biodegradación pretenden aprovechar los procesos metabólicos de los microorganismos para eliminar los contaminantes aromáticos, un proceso que debe ser rentable para jugar un papel importante en la recuperación de ambientes contaminados (Cao et al., 2009).

1.1 Metabolismo aerobio de compuestos aromáticos

La degradación de compuestos aromáticos en condiciones aeróbicas se basa en el uso del oxígeno molecular para la rotura del anillo aromático. Este mecanismo enzimático está muy extendido en la naturaleza y una gran cantidad de sustratos, entre lo que se incluyen compuestos aromáticos e hidrocarburos, requieren oxígeno molecular para su metabolismo (Wackett and Hershberger, 2001; Burton, 2003). Estas reacciones las llevan a cabo oxigenasas, enzimas que utilizan el oxígeno como cosustrato y lo incorporan al anillo aromático. Este mecanismo se demostró inicialmente gracias a los trabajos de Hayaishi en 1955, quien demostró por primera vez que el oxígeno incorporado al catecol por una pirocatecasa bacteriana para dar ácido mucónico procedía del O₂ molecular y no del agua, como se creía hasta ese momento (Hayaishi, 1994). Las oxigenasas involucradas en la degradación de

compuestos aromáticos pueden ser mono- y di-oxigenasas. Las monooxigenasas catalizan la incorporación de un átomo de O_2 a la molécula orgánica y otro es reducido hasta agua (Figura 3). Estas enzimas generalmente usan NADH o NADPH como cofactor que proporciona el poder reductor y pueden ser dependientes de metales, grupo hemo o flavinas (Bugg, 1997; Burton, 2003; Ullrich and Hofrichter, 2007). Las dioxigenasas incorporan ambos átomos de la molécula de oxígeno a la molécula orgánica (Burton, 2003; Boyd and Bugg, 2006; Boyd et al., 2006; Ullrich and Hofrichter, 2007). Dentro de las dioxigenasas se distinguen dos clases principales: dioxigenasas hierro azufre dependientes de hemo y dioxigenasas no dependientes de hemo, donde la mayoría son dependientes de NADH (Burton, 2003; Wackett, 2003).

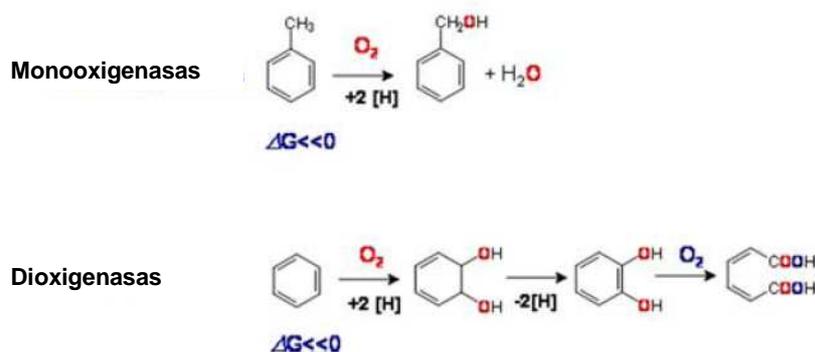


Figura 3. Acción de monooxigenasas y dioxigenasas en el metabolismo aerobio. Ejemplo de la acción de monooxigenasas sobre una molécula de tolueno y de dioxigenasas sobre una molécula de benceno, donde la introducción de grupos hidroxilo y la rotura del anillo aromático dependen del oxígeno (Fuchs 2008).

En el metabolismo aerobio de aromáticos, una gran variedad de sustratos son canalizados a través de rutas periféricas para dar lugar a unos pocos intermediarios centrales. Los principales intermediarios que se producen tienen dos grupos hidroxilo, bien adyacente o bien situados en posición *para*. Como ejemplo tenemos el catecol (1,2-dihidroxi-benceno), protocatecuato (3,4-dihidroxi-benzoato) y gentisato (2,5-dihidroxi-benzoato), compuestos intermediarios que son el sustrato de dioxigenasas de las rutas centrales, enzimas encargadas de la rotura del anillo aromático. Ésta puede ocurrir entre dos grupos hidroxilo (rotura en *ortho*) o próxima a uno de estos grupos (rotura en *meta*), mediante la introducción de una molécula de oxígeno, dando lugar a un compuesto no aromático que a través de una serie de reacciones enzimáticas dará

lugar a intermediarios del ciclo de Krebs (Dagley et al., 1971; Harayama et al., 1992; Harwood and Parales, 1996; Fuchs, 2008).

1.2 Metabolismo anaerobio de compuestos aromáticos

El catabolismo anaerobio bacteriano de los compuestos aromáticos permite que una gran variedad de compuestos aromáticos, a través de numerosas rutas periféricas, den lugar a un número limitado de intermediarios aromáticos centrales (monocíclicos); el intermediario más común es el benzoil-CoA, pero algunas rutas confluyen en resorcinol (1,3-dihidroxibenceno), floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenceno), hidroxi-hidroquinona (HHQ, 1,2,4-trihidroxibenceno), 6-hidroxinicotinato, o derivados del benzoil-CoA. La figura 4 muestra un esquema de las principales rutas periféricas descritas y los intermediarios centrales en los que confluyen.

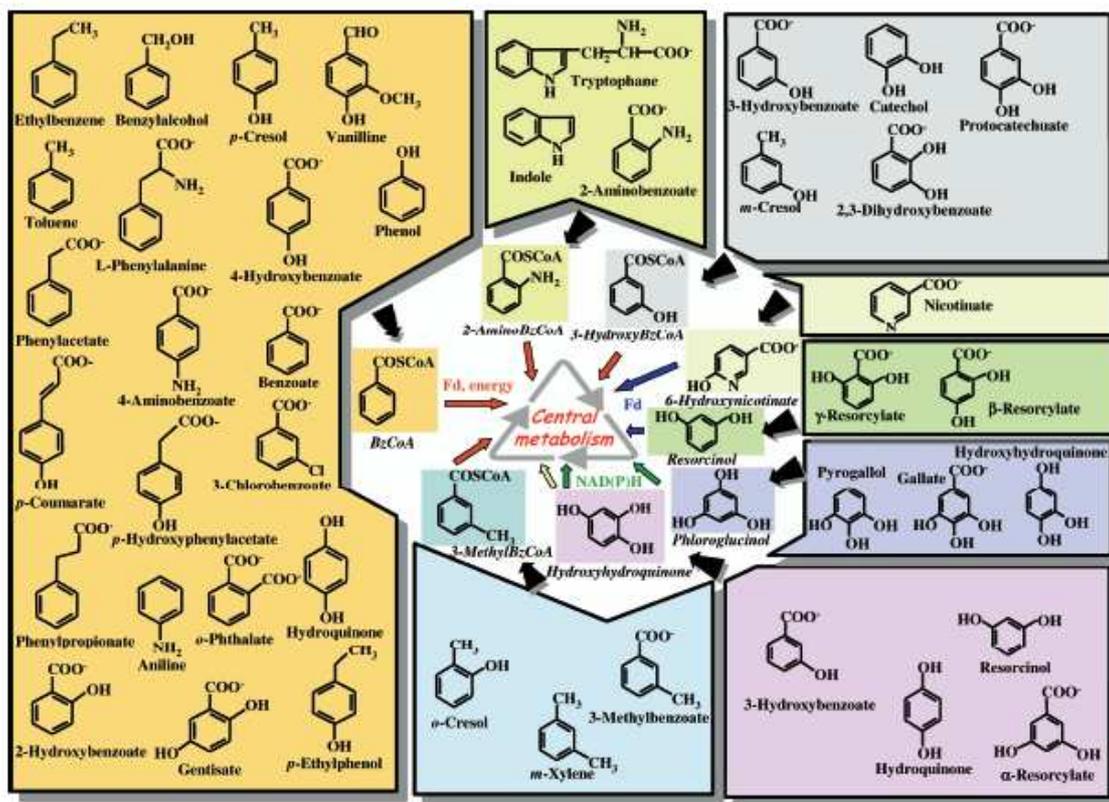


Figura 4. Esquema del catabolismo anaerobio de compuestos aromáticos, donde se puede apreciar las rutas periféricas y el denominado embudo catabólico. Los compuestos periféricos desembocan en un compuesto del metabolismo central (flecha negra). En la desaromatización de los intermediarios centrales puede intervenir una ferredoxina (Fd) y energía (por ejemplo, ATP) (flecha roja), una ferredoxina (flecha azul) o NAD(P)H (flecha verde) como donadores de electrones. También se ha descrito una desaromatización oxidativa de HHQ (flecha amarilla) (Carmona *et al.*, 2009).

En la degradación de los compuestos aromáticos hidroxilados, resorcinol y α -resorcilato, por bacterias desnitrificantes, tema objeto de estudio de esta tesis doctoral, estos son hidroxilados hasta dar el intermediario común HHQ, que sufre una desaromatización oxidativa hasta HBQ.

1.2.1 Ruta del benzoil-CoA

Uno de los compuestos aromáticos mejor estudiados y modelo en los estudios de degradación anaerobia es el benzoato, que se degrada a través de la ruta del benzoil-CoA. El catabolismo anaeróbico del benzoato se ha estudiado a nivel molecular en numerosos organismos anaerobios facultativos, como por ejemplo en las bacterias desnitrificantes *Thauera aromatica*, *Azoarcus* spp. (betaproteobacterias) (Breese et al., 1998; Harwood et al., 1999; López Barragan et al., 2004b) y en la alfavroteobacteria *Magnetospirillum* spp. (López Barragan et al., 2004a; Shinoda et al., 2005); en bacterias fotosintéticas como *R. palustris* (alfaproteobacteria) (Egland et al., 1997); y en deltaproteobacterias anaerobias estrictas reductoras de Fe(III) como *G. metallireducens*, y fermentadoras como *S. aciditrophicus* (Wischgoll et al., 2005; McInerney et al., 2007). En todas estas bacterias la degradación de benzoato empieza por una vía periférica de un solo paso, donde se produce la activación de benzoato a benzoil-CoA gracias a la acción de la benzoato-CoA ligasa dependiente de ATP (Villemur, 1995; Heider and Fuchs, 1997; Fuchs, 2008). Posteriormente el benzoil-CoA es degradado hasta acetyl-CoA y CO₂ a través de una serie de reacciones que constituye la llamada vía del benzoil-CoA (Figura 5). La vía del benzoil-CoA se divide en dos bloques metabólicos: la ruta superior (*upper*), que convierte el benzoil-CoA en un compuesto alifático C₇-dicarboxil-CoA y la ruta inferior (*lower*) que transforma este compuesto hasta acetyl-CoA y CO₂ (Carmona and Díaz, 2005). En la vía superior ocurre en primer lugar una desaromatización del anillo de benceno por la benzoil-CoA reductasa (BCR), la única enzima sensible a oxígeno en la vía del benzoato hasta benzoil-CoA, y que sólo se ha podido aislar hasta la fecha de *T. aromatica*. Esta enzima cataliza la transferencia de dos electrones de la ferredoxina al anillo aromático del benzoil-CoA dando lugar a ciclohex-1,5-dieno-1-carbonil-CoA por el mecanismo de Birch, donde ocurre una transferencia secuencial de electrones y protones con un bajo potencial redox (Boll and Fuchs, 1998; Boll, 2005a; Boll, 2005b; Thiele et al., 2008). Posteriormente este compuesto sufre una β -oxidación modificada con la adición de agua a un doble enlace (acyl-CoA hidratasa), seguido de una dehidrogenación (hidroxiacyl-CoA dehidrogenasa) y finalmente la rotura hidrolítica del anillo (oxoacyl-CoA hidrolasa) que genera el compuesto alifático C₇-dicarboxil-CoA (Gallus and

Schink, 1994; Harwood and Gibson, 1997; Harwood et al., 1999; Carmona and Díaz, 2005). En la ruta inferior (lower) se lleva a cabo la degradación completa de este compuesto alifático hasta dar tres moléculas de acetil-CoA y una de CO₂ (Gallus and Schink, 1994; Harrison and Harwood, 2005).

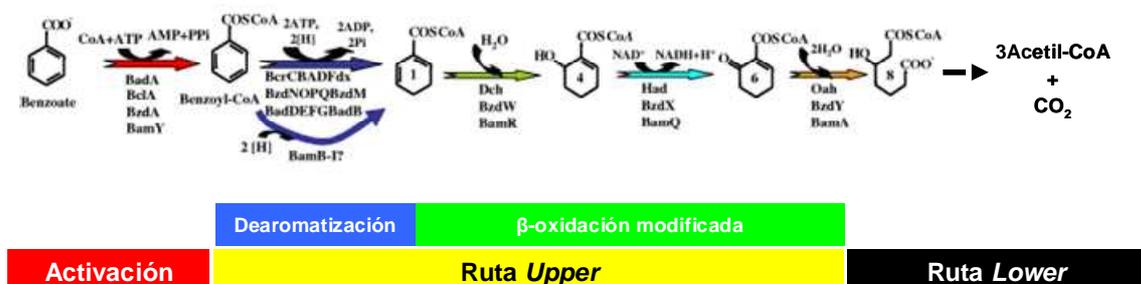


Figura 5. Reacciones enzimáticas de la ruta de degradación de benzoato. Los pasos de la reacción se indican en la parte inferior: I, activación del benzoato hasta benzoil-CoA por la benzoato-CoA ligasa (flecha roja); II, ruta *upper* del benzoil-coA donde se produce la dearomatización por la benzoil-CoA reductasa (flechas azul oscuro) y beta oxidación modificada vía hidratación (flecha verde), dehidrogenación (flecha azul claro), y rotura hidrolítica del anillo aromático (flecha naranja); III, ruta *lower* del benzoil-CoA (flechas de puntos) que genera tres moléculas de acetil-CoA y una de CO₂. Se indican las enzimas y el nombre de sus correspondientes genes (Carmona et al., 2009).

La mayoría de los genes involucrados en el catabolismo anaerobio del benzoato, como *bad* de *R. palustris*, *bcr* de *T. aromatica* y *Magnetospirillum* spp., *bzd* de *Azoarcus* spp. y *S. aciditrophicus* y *bam* de *G. metallireducens* se encuentran agrupados en el cromosoma. Sin embargo, en algunos organismo como *T. aromatica* y *Magnetospirillum* spp., los genes para la benzoato CoA ligasa se encuentran en regiones distintas del cromosoma (Carmona and Díaz, 2005; Carmona et al., 2009). Normalmente, la inducción de estos genes se produce por el sustrato y/o por intermediarios de la ruta, y los genes reguladores se suelen encontrar en la misma agrupación génica. Esto ocurre en *Azoarcus* sp. CIB, donde el gen regulador *bzdR* se encuentra aguas arriba de los genes para el catabolismo anaerobio del benzoato, cuya expresión se induce en presencia de este sustrato (López Barragan et al., 2004b) y en *R. palustris* con dos genes reguladores en la agrupación génica; *badR* y *badM* (Egland and Harwood, 1999; Peres and Harwood, 2006). En *T. aromatica*, *Magnetospirillum* spp. y *S. aciditrophicus*, sin embargo, no se han encontrado genes reguladores junto a los de la ruta del benzoil-CoA. Por otra parte, en muchas de las agrupaciones génicas se encuentran genes transportadores probablemente involucrados en el transporte de aromáticos (Parales et al., 2008). En la figura 6 se muestran ejemplos de organización

génica de los genes para el catabolismo anaerobio del benzoato en α y β -proteobacterias.

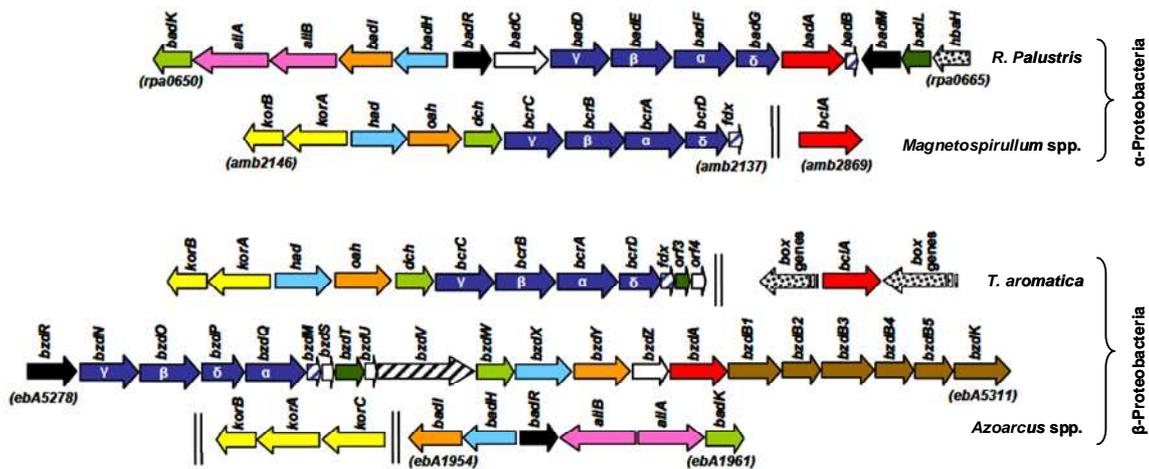


Figura 6. Organización de los genes involucrados en el metabolismo anaerobio del benzoato. *R. palustris* (NC_005296), *Magnetospirillum* spp. (*M. magnetotacticum* AMB-1 [NC_007626]; *M. magnetotacticum* MS-1 [AAAP00000000]) y *Magnetospirillum* sp. TS-6 (AB167726 y AB243675), *T. aromatica* (AJ224959) y *Azoarcus* spp. (*Azoarcus* sp. CIB [AF515816], *A. evansi* [AJ428529] y *Azoarcus* sp. EbN1 [NC_006513]). Los genes se representan con flechas: roja, genes que codifican la benzoato-CoA ligasa; azul oscuro, genes que codifican las subunidades α - β - γ - δ de la benzoil-CoA reductasa; rayas azules, genes que codifican la ferredoxina asociada con la benzoil-CoA reductasa; amarillo, genes que codifican KGOR; rayas negras, genes que codifican una posible NADPH ferredoxin oxidoreductasa; verde claro, genes que codifican enoil-CoA hidratasa; azul claro, genes que codifican hidroxiacil-CoA deshidrogenasa dependiente de NAD; naranjas, genes que codifican oxoacil-CoA hidrolasas; negro, genes reguladores, verde oscuro, genes que codifican posibles acil-transferasas; marrón, posibles genes transportadores; rosa, genes que codifican ciclohexanocarboxilato-CoA ligasa (*aliA*) y ciclohexanocarboxil-CoA deshidrogenasa (*aliB*); punteado, genes pertenecientes a otras rutas catabólicas de aromáticos; blanco, genes de función desconocida. Dos líneas verticales significan que los genes no están adyacentes en el genoma (Carmona et al., 2009)

Otro compuesto modelo cuya degradación anaerobia ha sido muy estudiada es el tolueno. La degradación de tolueno fue demostrada por primera vez en microcosmos anóxicos y posteriormente en cultivos puros de bacterias reductoras de hierro, sulfato reductoras y las denitrificantes *Thauera aromatica* K172, *T. aromatica* T1, y *Azoarcus* sp. cepa T, que crecían con tolueno como única fuente de carbono (Coschigano and Young, 1997; Coschigano, 2000; Achong et al., 2001; Hermuth et al., 2002). En todas las cepas, la reacción inicial es la adición de fumarato al grupo metilo del tolueno, una reacción catalizada por la bencilsuccinata sintasa (BSS). El producto de la reacción es convertido a fenilitaconil coenzima A por la transferencia del CoA del succinil-CoA, que se metaboliza posteriormente al metabolito central benzoil Co-A mediante oxidaciones similares a las tipo β (Spormann & Widdel, 2000).

2. DEGRADACIÓN ANAEROBIA DE AROMÁTICOS HIDROXILADOS

La degradación anaeróbica de los compuestos aromáticos hidroxilados se produce principalmente a través de las vías del benzoil-CoA, resorcinol y floroglucinol, siendo el principal metabolito intermediario el benzoil-CoA. Existe otra vía en bacterias nitratorreductoras dónde el intermediario principal es la HHQ. Este es el caso de la degradación de resorcinol en *A. anaerobius* y 3,5-DHB en *T. aromatica* AR-1, que son las rutas objeto de estudio de esta Tesis Doctoral.

2.1 Degradación de fenol.

La degradación anaerobia de fenol ocurre a través de la vía del benzoil-CoA. Se ha estudiado muy intensamente en *T. aromatica* y *R. palustris*, donde los dos primeros pasos en el metabolismo son una fosforilación a fenilfosfato mediada por la fenilfosfato sintasa, gracias a un donador de grupo fosfato desconocido, seguida de una carboxilación hasta 4-hidroxibenzoato mediada por una fenilfosfato carboxilasa, con la consiguiente liberación de fosfato (Figura 7).

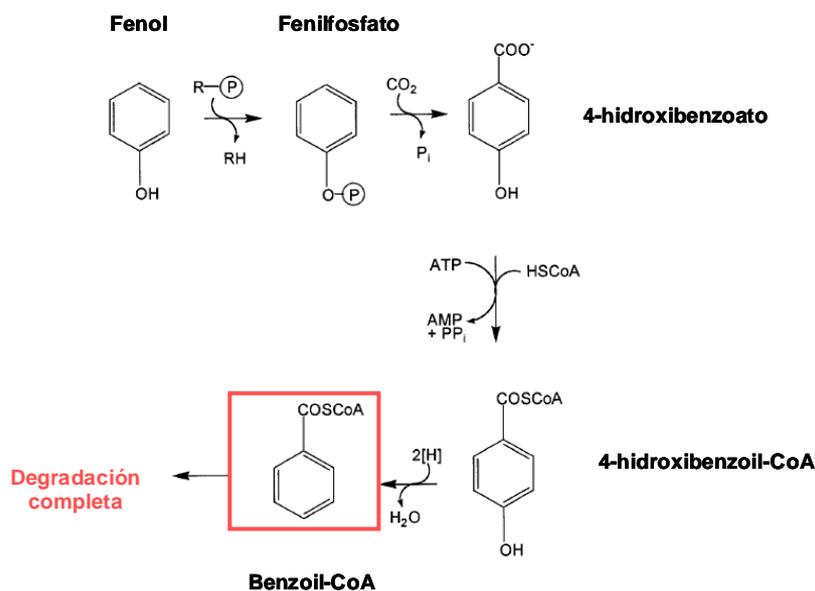


Figura 7. Pasos iniciales en la degradación de fenol por la bacteria nitrato reductora *T. aromatica*. R representa el donador desconocido del grupo fosforilo. Se muestra la transformación hasta el intermediario central benzoil-CoA (Schink et al., 2000)

Ambas enzimas se inducen por la presencia de fenol. La degradación del 4-hidroxibenzoato prosigue con la formación de 4-hidroxibenzoil-CoA mediante una ligasa, que es posteriormente reducido por la 4-hidroxibenzoil-CoA reductasa hasta benzoil-CoA utilizando ferredoxina como donador de electrones. La degradación posterior del benzoil-CoA formado sigue la vía del benzoil-CoA descrita anteriormente (Tschech and Fuchs, 1989; Gibson et al., 1994; Breese and Fuchs, 1998; Breinig et al., 2000) (Figura 7). Recientemente, se han encontrado SRB relacionadas filogenéticamente con *Desulfobacterium anilini* que también degradan fenol vía fosforilación y descarboxilación (Ahn et al., 2009).

Se conoce poco de la degradación de 4-hidroxibenzoato en bacterias fermentadoras, pero en enriquecimientos de metanógenos se ha visto que ocurre una descarboxilación hasta fenol, que se degrada lentamente hasta metano y CO₂ (Tschech and Schink, 1986). La descarboxilación hasta fenol ocurre también en *Clostridium hydroxybenzoicum*, donde el 4-hidroxibenzoato es cometabolizado durante la fermentación de amino ácidos y no es utilizado como fuente de carbono o energía (Zhang and Wiegel, 1994; Schink et al., 2000).

2.2 Degradación de hidroquinona y catecol

Se han aislado bacterias sulfatorreductoras y fermentadoras capaces de degradar hidroquinona. La ruta de degradación se ha estudiado en *Desulfococcus* spp (Gorny and Schink, 1994b) y en una bacteria fermentadora clasificada como *Syntrophus gentianae* (Gorny and Schink, 1994c). En ambos casos, la hidroquinona se carboxila para dar gentisato (Figura 8A), que es posteriormente activado hasta gentisil-CoA gracias a la acción de una CoA-ligasa. En *S. gentianae* el gentisil-CoA se reduce hasta benzoil-CoA, que posteriormente se degrada por una vía modificada del benzoil-CoA. La reducción de los dos grupos hidroxilo se produce en un solo paso, ya que no se han detectado intermediarios monohidroxilados. En *Desulfococcus* spp. el gentisil-CoA no es reducido hasta benzoil-CoA, y se ha postulado una reducción directa del anillo aromático (Schink et al., 2000).

El catecol, que es el principal intermediario en la degradación aeróbica de compuestos aromáticos, es degradado muy lentamente en condiciones anaeróbicas. En *Desulfobacterium* spp. el catecol es carboxilado hasta protocatecuato (Gorny and Schink, 1994a), que es activado hasta protocatecoil-CoA y después dehidroxilado hasta benzoil-CoA (Figura 8B).

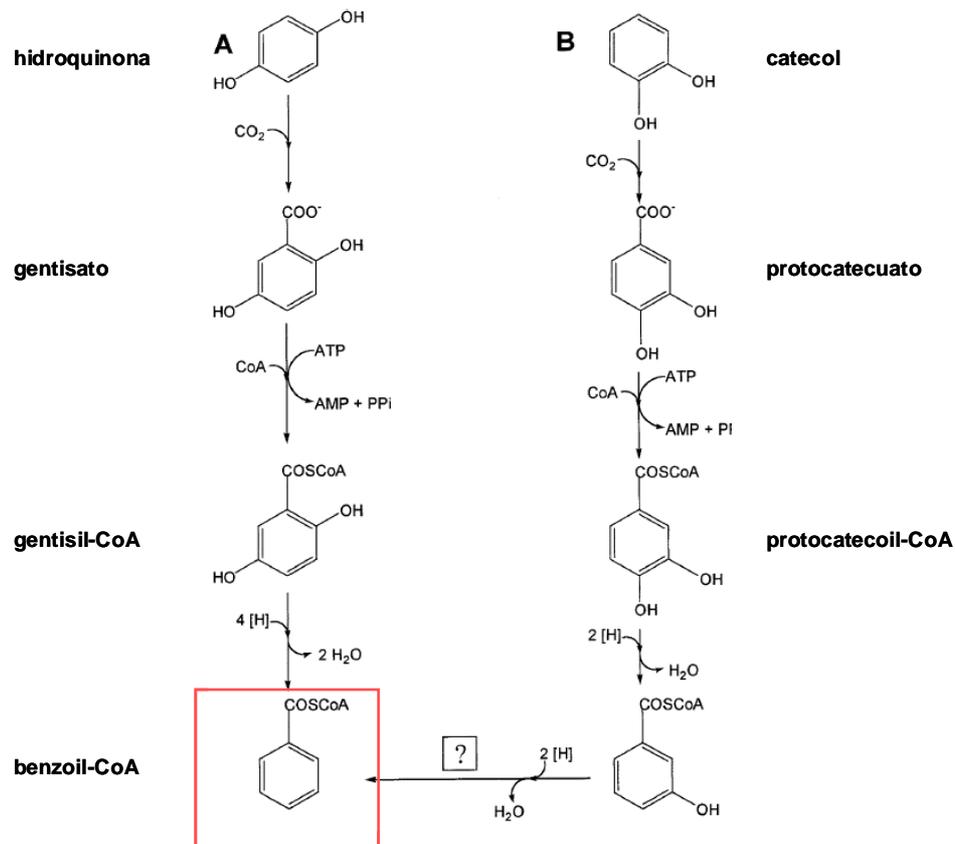


Figura 8. Pasos iniciales en la degradación de hidroquinona y catecol por bacterias sulfatorreductoras y fermentadoras. Las dos rutas convergen en la ruta *lower* del benzoil-CoA. A) Degradación de hidroquinona. B) Degradación de catecol (Schink et al., 2000).

2.3 Degradación de trihidroxibenzenos y trihidroxibenzoatos

Los primeros compuestos trihidroxilados para cuya degradación se aisló un cultivo puro de bacterias anaerobias fueron pirogalol y floroglucinol, dos isómeros del trihidroxibenceno (Schink and Pfennig, 1982). La degradación del floroglucinol se ha estudiado en detalle en las bacterias fermentadoras *Eubacterium oxidoreducens* y *Pelobacter acidigacilli*. El floroglucinol es reducido inicialmente hasta dihidrofloroglucinol por una reductasa dependiente de NADPH (Figura 9A) (Haddock and Ferry, 1989; Brune and Schink, 1992), la misma estrategia descrita posteriormente en *Holophaga foetida* TMBS4 (Kreft and Schink, 1994). La rotura hidrolítica del anillo aromático de dihidrofloroglucinol produce ácido 3-hidroxi-5-oxohexanoico, que se degrada paulatinamente hasta rendir tres residuos de acetato (Brune and Schink, 1992). Sin embargo, el pirogalol no puede ser hidrolizado o reducido directamente por esta vía, por lo que sufre inicialmente una transhidroxilación para rendir floroglucinol

(Figura 9A) (Krumholz R. and Bryant M.P., 1988; Brune and Schink, 1990). La bacteria fermentadora *P. acidigacilli* es capaz de convertir el pirogalol en floroglucinol, y esta reacción requiere 1,3,4,5-tetrahidroxibenceno como co-sustrato y una enzima, la pirogalol-floroglucinol transhidroxilasa (TH), que transfiera el grupo hidroxilo desde el tetrahidroxibenceno hasta el pirogalol con la liberación de floroglucinol como producto y tetrahidroxibenceno como co-producto (Figura 9B) (Brune and Schink, 1990). Se trata de una enzima citoplásmica que pertenece a la familia de las DMSO (dimetil sulfóxido) reductasas y requiere molibdeno, y está constituida por una subunidad grande (α) de 875 amino ácidos y una subunidad pequeña (β) de 274 amino ácidos. La subunidad α coordina Mo, gracias a la acción a través del cofactor molibdopterin guanina dinucleótido (MGD) y la subunidad β tiene tres centros sulfoférricos del tipo [4Fe-4S]. Esta proteína ha sido cristalizada y se han determinado los residuos esenciales para su actividad (Baas and Rétey, 1999; Reichenbecher and Schink, 1999; Messerschmidt et al., 2004).

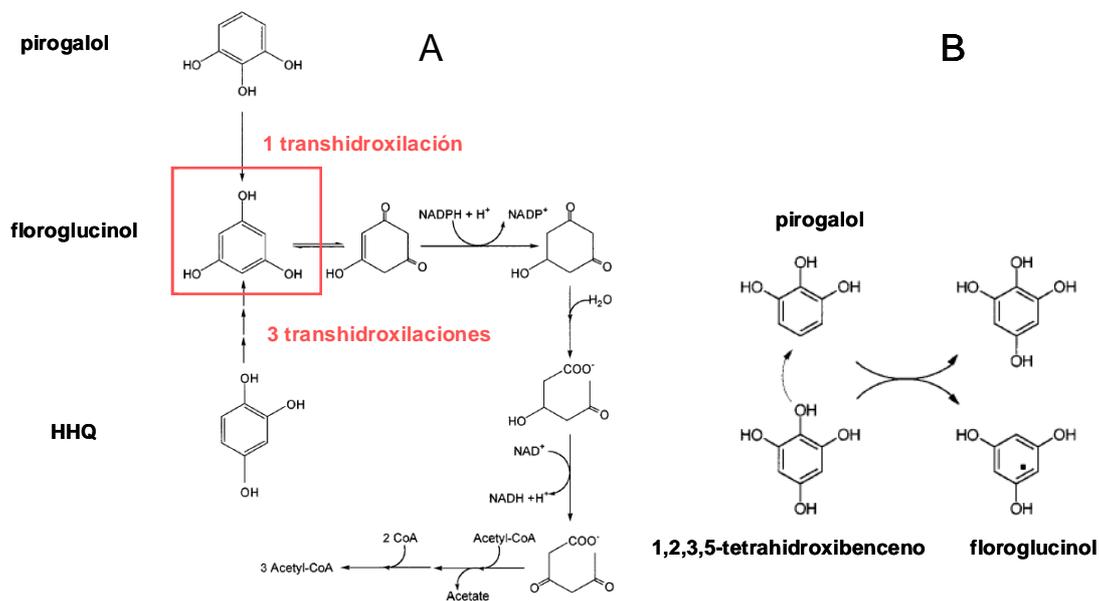


Figura 9. A) Degradación de trihidroxibencenos por bacterias fermentadoras. B) Reacción de transhidroxilación pirogalol-floroglucinol en *Pelobacter acidigacilli* (Schink et al., 2000).

En *Pelobacter masiliensi* la degradación de (hidroxihidroquinona) HHQ, un tercer isómero del trihidroxibenceno, requiere tres transhidroxilaciones análogas a las

de pirogalol-floroglucinol para dar floroglucinol, que es el compuesto aromático susceptible de rotura hidrolítica para dar finalmente tres moléculas de acetato (Figura 9A) La estrategia en bacterias sulfato reductoras es muy diferente y no sigue la vía del floroglucinol: en *Desulfovibrio inopinatus* el primer paso es una desestabilización de la HHQ, que es reducida hasta dehidro-HHQ (Figura 10), para más tarde formar acetato y un derivado no identificado de 4 carbonos (Reichenbecher et al., 2000).

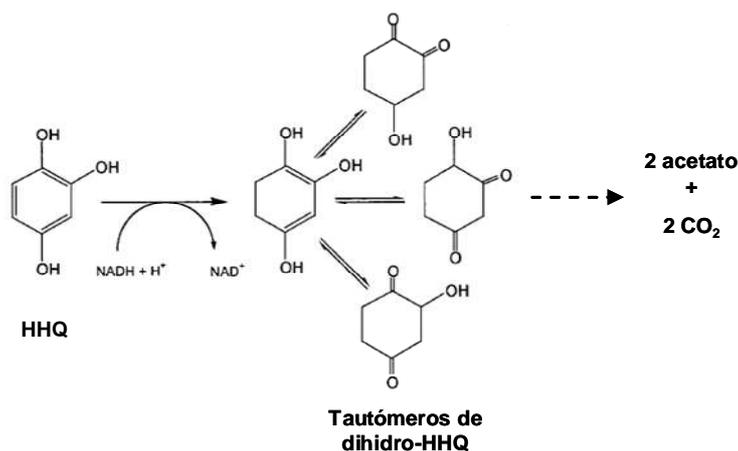


Figura 10. Reducción de HHQ por una HHQ reductasa en *Desulfovibrio inopinatus* y formación de distintas formas tautoméricas de la dihidrohidroxihidroquinona (Reichenbecher et al., 2000).

Esta cepa no es capaz de oxidar acetato, por lo que el producto final de la reducción de HHQ son dos moléculas de acetato y dos de CO₂ por cada mol de sulfato reducido hasta sulfuro.

2.4 Degradación de resorcinol y α -resorcilato (3,5-dihidroxibenzoato)

Existen diferentes estrategias para la degradación anaerobia de resorcinol y sus derivados carboxilados. Los dos grupos hidroxilo del resorcinol se encuentran en una posición que permite la tautomerización para dar lugar a un derivado ciclohexanodiona con un doble enlace aislado (Figura 11A). La bacteria fermentadora *Clostridium* sp es capaz de convertir el resorcinol en dihidro-resorcinol (Tschech and Schink, 1985; Kluge et al., 1990) para formar posteriormente ciclohexanodiona, que sería después hidrolizada para dar 5-oxohexanoato, probablemente por un ataque nucleofílico en uno de los átomos de carbono del grupo carbonilo. La resorcinol reductasa de esta bacteria, responsable del primer paso de la ruta, consta de una única subunidad de 49,5 kDa y contiene FAD como cofactor (Schüler, 1997). Esta

bacteria también es capaz de degradar β y γ -resorcilato por la misma vía después de descarboxilarlos hasta resorcinol.

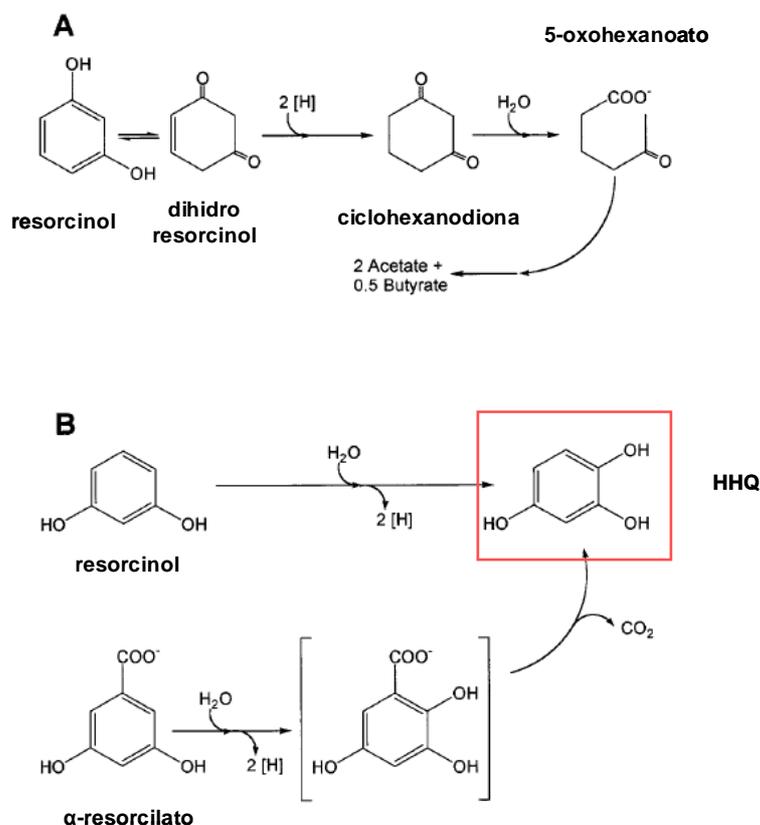


Figura 11. Pasos iniciales en la degradación anaeróbica de resorcinol y α -resorcilato. A) Degradación de resorcinol por una bacteria fermentadora, *Clostridium* KN245. B) Degradación de resorcinol y α -resorcilato por bacterias nitratorreductoras (Schink et al., 2000).

Sin embargo, las bacterias nitrato-reductoras capaces de crecer con resorcinol aisladas hasta la fecha siguen una vía diferente para la degradación de este aromático (Gorny et al., 1992). Philipp y Schink (1998) demostraron que en la degradación de resorcinol por la bacteria anaerobia estricta *A. anaerobius* no se producía una rotura hidrolítica, sino que el anillo aromático del resorcinol se desestabilizaba por la introducción de un grupo hidroxilo para formar hidroxihidroquinona (HHQ) (Figura 11B). En *T. aromatica* AR-1 se encontró un mecanismo semejante para la degradación del 3,5-DHB (α -resorcilato), ya que en esta cepa el primer paso en la degradación de 3,5-DHB es una hidroxilación hasta 2,3,5-trihidroxibenzoato. Este es posteriormente descarboxilado hasta dar HHQ (Figura 11B), que sufre una reacción de deshidrogenación para dar HBQ, que se degrada finalmente hasta intermediarios del ciclo de Krebs (Gallus and Schink, 1998). En ambos casos pues, el primer paso de la

ruta es una oxidación donde el oxígeno procede del agua, dando lugar a un compuesto trihidroxilado. Estas dos rutas son el objeto de estudio de esta Tesis Doctoral y se analizan en profundidad en los apartados 3 y 4 de esta introducción, respectivamente.

En este contexto, hay que mencionar la degradación de etilbenceno en la bacteria desnitrificante *A. aromaticum* EbN1 (Rabus and Widdel, 1995). Aunque no se trate de un compuesto aromático hidroxilado, el primer paso en su degradación, como ocurre en la degradación de resorcinol y 3,5-DHB, es una hidroxilación catalizada por la enzima etilbenceno dehidrogenasa en, donde el oxígeno procede de una molécula de agua. Esta enzima está formada por tres subunidades α , β y γ . Igual que en la enzima principal de la ruta de degradación de resorcinol y 3,5-DHB, la subunidad α en su centro catalítico contiene un átomo de molibdeno coordinado por MGD (molibdopterín guanina dinucleótido) como cofactor (Kniemeyer & Heider 2001, JBC:276:21381). Además la etilbenceno deshidrogenasa contiene un centro sulfoférrico [$\text{Fe}_4\text{-S}_4$] en la subunidad α y tres en la subunidad β . La subunidad γ contiene un grupo hemo. Esta enzima junto con otras molibdoenzimas constituyen el grupo II dentro de las DMSO reductasas (Heider, 2007).

3. DEGRADACIÓN DE RESORCINOL POR *Azoarcus anaerobius*

El resorcinol (1,3-dihidroxibenceno), es un compuesto monoaromático con dos grupos hidroxilo en posición meta, producido y utilizado en gran cantidad en la industria de la madera, en la fabricación de adhesivos y en la industria del petróleo. Es el sustrato inicial para la síntesis de muchos productos, desde fármacos hasta colorantes como la fluoresceína, y se utiliza directamente como antiséptico dermatológico. Sin embargo su mayor utilización está en la producción de resinas artificiales, que se utilizan por ejemplo en la producción de neumáticos como adherentes entre el tejido de acero y la goma. Por este motivo es un contaminante de entornos naturales de agua dulce a través de numerosos vertidos procedentes de la industria. Además las raíces de plantas acuáticas, como *Nuphar lutea*, exudan de forma natural cantidades considerables de resorcinol (hasta 15 nmol / plántula / día). Debido a sus propiedades tóxicas, parece desempeñar un papel en la defensa frente a la acción de otros organismos del ecosistema acuático (Sütfeld et al., 1996).

El resorcinol también puede ser transformado fotoquímicamente por exposición a la luz solar, aunque esta transformación química es un proceso muy lento que no lo degrada completamente hasta CO₂ (Vialaton and Richard, 2002). Por tanto la única detoxificación completa y reintroducción de los constituyentes del resorcinol en el ciclo del carbono se lleva a cabo gracias a la degradación microbiana (Darley et al., 2007).

Azoarcus anaerobius LuFRes1^T (DMS 1281^T), una de las cepas objeto de este estudio, es una β-proteobacteria nitratorreductora anaerobia estricta aislada de aguas residuales por su capacidad para crecer con resorcinol como única fuente de carbono y nitrato como aceptor de electrones. Tiene un tamaño de 2,7-3,3 μm x 1,5 μm, es móvil, catalasa-negativa y superóxido-dismutasa positiva. Tiene un metabolismo estrictamente oxidativo, usando el nitrato como único aceptor de electrones, que es reducido hasta nitrito y finalmente hasta N₂. Tiene un pH óptimo de crecimiento de 7,2 y un rango de temperatura entre 20 y 32°C, siendo su óptimo 28°C, y su crecimiento es máximo en agua dulce (Springer et al., 1998). Esta cepa está relacionada filogenéticamente con *T. aromatica* y sus secuencias de ARNr 16S presentan un 92,7% de similitud (Figura 12).

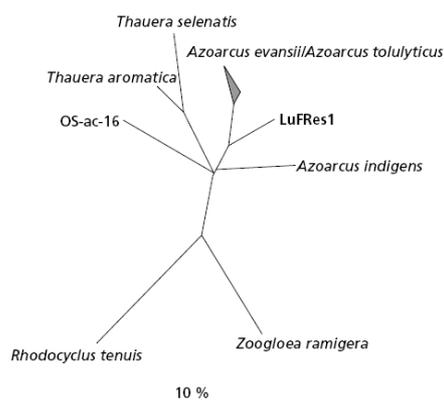


Figura 12. Relación filogenética basada en el ARNr 16S que relaciona la cepa LuFRes1^T con otros microorganismos pertenecientes a la subclase de las β-proteobacterias. Para la construcción del árbol solo se tuvieron en cuenta aquellas secuencias que compartían al menos un 50% de residuos de la secuencia completa del ARNr 16S. La barra indica un 10% estimado de divergencia entre las secuencias (Springer et al., 1998).

Philipp y Schink (1998) estudiaron la degradación anaeróbica de resorcinol en *A. anaerobius* analizando en anaerobiosis extractos celulares de bacterias cultivadas en este compuesto. Observaron que en un primer paso el resorcinol se hidroxilaba hasta hidroxihidroquinona utilizando directamente nitrato como aceptor de electrones. La reacción también era posible con aceptores artificiales de electrones, como el ferricianuro de potasio (K₃Fe(CN)₆). La HHQ se degradaba posteriormente hasta 2-hidroxi-1,4-benzoquinona (HBQ) (Figura 13A). La actividad específica media para la resorcinol hidroxilasa era de 60 mU/mg de proteína, y de 150 mU/mg de proteína para

la HHQ deshidrogenasa. Ambas actividades eran sensibles a oxígeno y se encontraban exclusivamente en la fracción de membrana. Ambas actividades no eran detectables en extractos de células crecidas con benzoato, lo que indica que ambas actividades eran inducibles por sustrato (Philipp and Schink, 1998).

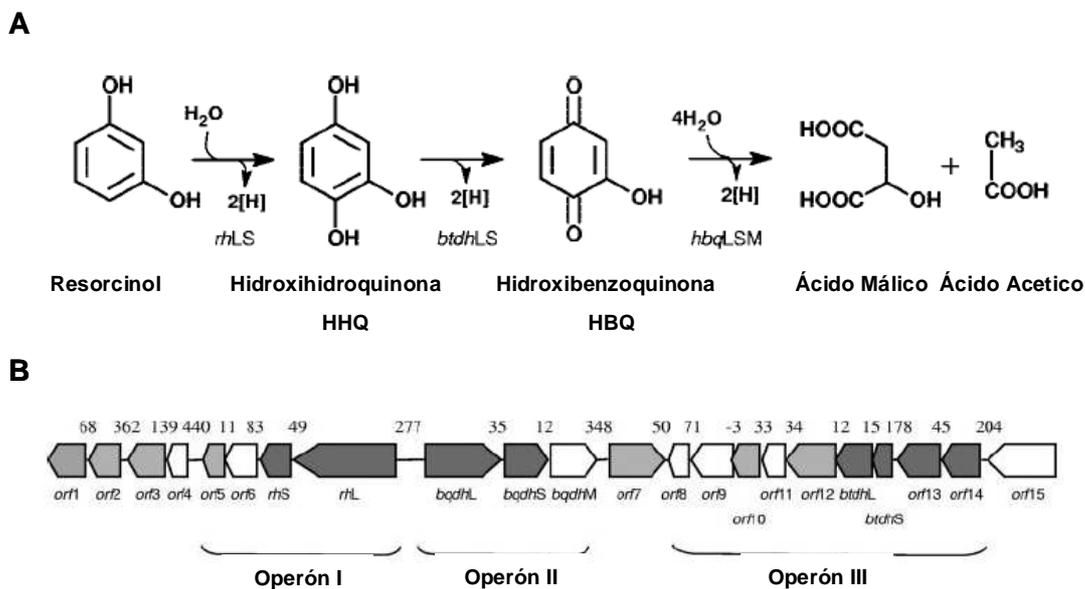


Figura 13. Ruta de degradación de resorcinol en *A. anaerobius*. A) Ruta propuesta para la degradación de resorcinol y genes involucrados en las reacciones iniciales. B) Organización de la agrupación génica de 29,880 kb del cósmido R⁺ responsable del metabolismo anaerobio del resorcinol. Las flechas muestran el sentido de cada ORF. Los genes que codifican enzimas esenciales para la degradación de resorcinol están en gris oscuro, los genes que codifican proteínas no esenciales para la degradación de resorcinol se muestran en gris claro y los genes no caracterizados hasta el momento están en blanco. La disposición de los genes y su orientación sugiere la presencia de tres operones (corcheas horizontales) (Darley et al., 2007).

Se han caracterizado los genes involucrados en la degradación anaerobia de resorcinol en *Azoarcus anaerobius* (Figura 13B). Estos genes se detectaron en un cósmido seleccionado de una genoteca de *A. anaerobius* por su capacidad de conferir a *T. aromatica* la capacidad de crecer anaeróticamente con resorcinol como fuente de carbono. La secuencia del fragmento de 29,88 Kb clonado en el cósmido reveló la presencia de 22 pautas abiertas de lectura (*open reading frames*, ORFs). La obtención de mutantes del cósmido R⁺ y su caracterización utilizando como huésped heterólogo distintas cepas de *T. aromática* permitieron definir ocho genes esenciales para el crecimiento en resorcinol y asignarles una función. En otros casos, la función se asignó por homología con secuencias depositadas en las base de datos (Darley et al., 2007).

Genes para la resorcinol hidroxilasa. La caracterización de mutantes en los genes *rhL* y *rhS* permitió anotarlos como dos subunidades de una resorcinol hidroxilasa. En un análisis de BLAST los productos de estos genes presentan homología con enzimas anaerobias de tipo molibdopterin-oxidorreductasas como las dimetilsulfóxido reductasas; *rhL* tiene una identidad del 52% con la subunidad α de la pirogalol-floroglucinol transhidroxilasa de *P. acidigacilli* y *rhS* presenta un 49% de identidad con la subunidad β de la misma enzima. La localización celular de la resorcinol hidroxilasa es todavía un problema no resuelto; según la predicción de la secuencia de aminoácidos se trata de una proteína soluble sin fragmentos transmembrana. Sin embargo, su actividad se ha medido exclusivamente en la fracción de membranas de *A. anaerobius* (Philipp and Schink, 1998) o de *T. aromatica* con el cósmido R⁺ (Darley et al., 2007).

Genes para la HHQ deshidrogenasa. La comparación del fenotipo de dos cepas de *T. aromatica* portadoras de un mutante del cósmido R⁺ en *btdhL* permitió anotar este gen como una subunidad de una HHQ deshidrogenasa (benzenetriol deshidrogenasa). Efectivamente, un mutante en este gen no confería la capacidad de crecer en resorcinol a la cepa *T. aromática* K172, y sí a la cepa *T. aromatica* AR-1. La explicación a este hecho era que *T. aromatica* AR-1, cepa capaz de degradar 3,5-DHB hasta CO₂ y agua a través de una ruta semejante a la de *A. anaerobius*, era capaz de metabolizar la HHQ a HBQ (Gallus and Schink, 1998). Por tanto, la función mutada de *btdhL* se suplía probablemente por un gen homólogo presente en el cromosoma de esta cepa. El producto del gen *btdhL* muestra una gran similitud con una β -hidroxiácido deshidrogenasa de varios géneros de proteobacterias, lo que sugiere que estas proteínas tienen un mismo mecanismo de acción. Aguas arriba de *btdhL* se encuentra un pequeño gen, *btdhS*, homólogo a proteínas de membrana de función desconocida. Como en el caso anterior, *T. aromatica* K172 portadora de un cósmido mutado en *btdhS* tampoco era capaz de utilizar resorcinol como fuente de carbono, mientras que *T. aromatica* AR-1 con el mismo cósmido mutante acumulaba una sustancia coloreada que indicaba una insignificante transformación de HHQ a HBQ. Por todos estos indicios, los genes *btdhLS* se anotaron como una HHQ deshidrogenasa (Darley et al., 2007).

Genes para la HBQ deshidrogenasa. La conversión de HBQ a acetato y malato requiere la rotura de dos enlaces C-C y la liberación de dos electrones. Esta reacción oxidativa es compatible con un sistema análogo al complejo piruvato deshidrogenasa, que cataliza la reacción de descarboxilación oxidativa del piruvato a acetyl-CoA utilizando tiamina pirofosfato (TPP) como cofactor. Los genes *bqdhL*,

bqdhS y *bqdhM* presentes en el cósmido R+ tienen similitud con los componentes E1, E2 y E3, respectivamente, del complejo enzimático piruvato deshidrogenasa, por lo que se propuso que *bqdhLSM* podían codificar el complejo HBQ deshidrogenasa implicado en la reacción de rotura de la HBQ y apertura del anillo. Se observó que efectivamente, mutaciones en los genes *bqdhL* y *bqdhS* generaban una serie de cósmidos mutantes incapaces de conferir la capacidad de crecer en resorcinol a *T. aromatica* AR-1 y K172 (Darley et al., 2007).

Otros genes cuyas mutaciones resultan esenciales para la degradación de resorcinol son *orf13* y *orf14*. El producto de *orf13* tiene una gran similitud con aminopeptidasas, miembros de la familia M24, de *Psychromonas ingrahamii* y *Acidothermus cellulolyticus* (48% de identidad). Estas enzimas parecen esenciales para la maduración de muchas proteínas, y podrían estar involucradas en la maduración de las enzimas de la ruta de degradación de resorcinol. Por otro lado, la *orf14* que presenta similitud con NADH flavín oxidorreductasas de α y β proteobacterias como *Thiobacillus denitrificans* y *Bradyrhizobium japonicum*, podría estar involucrado en la transferencia de electrones en la membrana (Darley et al., 2007).

4. DEGRADACIÓN DE α -RESORCILATO POR *Thauera aromatica* AR-1

Se han descrito tanto bacterias sulfato reductoras, como *Desulfobacterium* sp. Cat2, como enriquecimientos de metanógenos capaces de crecer con 3,5-dihidroxibenzoato (3,5-DHB) como fuente de carbono (Tschech and Schink, 1985; Schnell et al., 1989). Sin embargo, donde mejor se ha estudiado la degradación de 3,5-DHB es en la bacteria desnitrificante *T. aromatica* AR-1, aislada por su capacidad de crecer con 3,5-DHB como única fuente de carbono y energía (Gallus et al., 1997).

Thauera aromatica AR-1 es una β -proteobacteria anaerobia facultativa que fue aislada de cultivos de enriquecimiento obtenidos a partir de lodos activos de la planta municipal de Tübingen-Lustnau (Alemania) utilizando 3,5-DHB como única fuente de carbono y energía y nitrato como aceptor de electrones. Es una bacteria anaerobia facultativa con forma de bacilos móviles y con un tamaño de 1,5-3 μm x 0,5 μm , con actividad catalasa y oxidasa positiva. Su ADN tiene un contenido en G+C de 66,4%. Crece a temperaturas entre 10°C y 41°C con un óptimo de 37°C. Tiene un metabolismo estrictamente oxidativo. En esta cepa la degradación de 3,5-DHB a CO₂ está acoplada a la reducción de nitrato a nitrógeno atmosférico, acumulándose nitrito

transitoriamente. Además de nitrato, puede utilizar nitrito y óxido nitroso como aceptor final de electrones. *T. aromatica* AR-1 es capaz de utilizar anaeróbicamente ácidos grasos de cadena corta, alcoholes y derivados de benzoato. Igualmente puede crecer aeróbicamente con aromáticos como el benzoato, pero la degradación de α -resorcilato es estrictamente anaeróbica. Esta bacteria no es capaz de degradar azúcares, ácidos dicarboxílicos y compuestos fenólicos como resorcinol o floroglucinol (Gallus et al., 1997). La secuencia de ARNr 16S muestra una cercanía filogenética con *T. aromatica* K172, cepa que no es capaz de crecer con 3,5-DHB como única fuente de carbono (Tschech and Fuchs, 1987).

Como ocurre con el resorcinol en *A. anaerobius*, la degradación de 3,5-DHB por *T. aromatica* AR-1 no tiene lugar a través de la ruta del benzoil-CoA, resorcinol o floroglucinol, los principales intermediarios en la degradación anaeróbica de compuestos aromáticos.

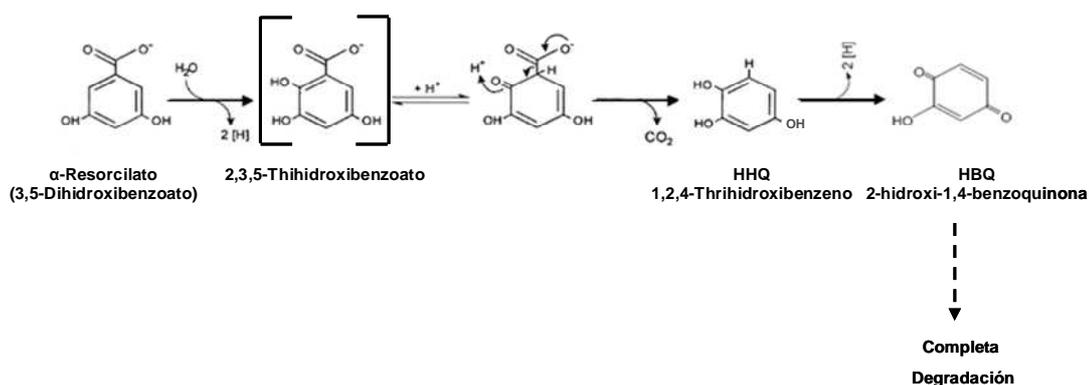


Figura 14. Ruta de degradación de α -resorcilato en *Thauera aromatica* (Gallus and Schink, 1998). Entre corchetes el compuesto 2,3,5-trihidroxibenzoato que no ha sido identificado cuya existencia se postula como intermediario hasta HHQ.

Gallus and Schink (1998) observaron que en ensayos de degradación de 3,5-DHB con extractos de membrana de *T. aromatica* AR-1 crecida con 3,5-DHB como fuente de carbono, se acumulaba un producto no identificado que desaparecía al añadir fracción citosólica, formándose HHQ. Por tanto, para la formación de HHQ intervendrían tanto enzimas citosólicas como asociadas a membrana (Gallus and Schink, 1998). El intermediario postulado sería el 2,3,5-trihidroxibenzoato, que se descarboxilaría para dar HHQ (figura 14). Dada la estructura del compuesto, no se descarta que se pueda producir una descarboxilación espontánea. En la fracción de membrana de estas células cultivadas se detecta igualmente actividad HHQ deshidrogenasa, capaz de oxidar HHQ a HBQ, que finalmente se degrada hasta CO_2 y agua (Philipp and Schink, 2000).

Hasta la fecha, sólo se han encontrado estas dos cepas capaces de degradar compuestos aromáticos hidroxilados utilizando una estrategia oxidativa a través del intermediario común HHQ. La oxidación posterior de HHQ hasta HBQ es un proceso que necesita un potencial estándar de membrana de +180 mV, lo que podría explicar por qué esta estrategia sólo se ha detectado en bacterias nitrato-reductoras y no en sulfato-reductores o fermentadores (Philipp and Schink, 1998).

5. REGULACIÓN DE LA DEGRADACIÓN ANAEROBIA DE COMPUESTOS AROMÁTICOS

Las bacterias pueden adaptarse rápidamente a cambios en su entorno gracias a su capacidad para dar una respuesta fisiológica apropiada. La regulación se puede llevar a cabo a diferentes niveles (transcripcional, traduccional y postraduccional), pero los mecanismos de control de la expresión génica más estudiados en el catabolismo de compuestos aromáticos son los de regulación transcripcional (Díaz and Prieto, 2000; Shingler, 2003; Tropel and van der Meer, 2004). En muchas ocasiones, las señales del medio ambiente son recogidas por la célula gracias a proteínas auxiliares que generan una señal intracelular que está directamente relacionada con la transcripción. Sin embargo, en otros casos, la señal del medio ambiente puede influir directamente en la regulación de la transcripción (Shingler, 1996).

Hoy día se conocen bastantes mecanismos de regulación del metabolismo anaerobio de compuestos aromáticos. Bien conocido es el mecanismo de acción del regulador BzdR de *Azoarcus* sp. CIB que controla la transcripción desde el promotor P_N para la expresión de los genes *bzd* para la degradación de benzoato (López Barragan et al., 2004b; Barragán et al., 2005). BzdR es miembro de una nueva familia de reguladores transcripcionales (familia BzdR) que tiene una actividad represora sobre los promotores P_R , que controla la transcripción del regulador, y P_N , del operón *bzd*, y que reconoce el primer intermediario de la ruta de degradación del benzoato, el benzoil-CoA (Barragán et al., 2005; Carmona et al., 2009). Además, como veremos más adelante la expresión desde el promotor P_N va a estar sometida a mecanismos de regulación sobreimpuesta por oxígeno y a fenómenos de represión catabólica.

La expresión del gen *gcdH* que codifica para la glutaril-CoA deshidrogenasa en *Azoarcus* sp. CIB está controlada por un regulador transcripcional de la familia LysR que se transcribe divergentemente, GcdR. Se trata de un activador transcripcional que tiene especificidad por glutamato y glutaconato, que son sustratos catalizados por la

enzima GcdH (Blázquez et al., 2008). En la bacteria anaerobia *Eubacterium barkeri* se ha encontrado un gen con homología a reguladores de la familia LysR en el *cluster* de genes para el catabolismo del nicotinato (Alhapel et al., 2006).

En el *cluster* de genes para la degradación de resorcinol en *A. anaerobius* se han encontrado dos genes con homología con reguladores transcripcionales pertenecientes a la familia NtrC (Darley et al., 2007) y entre los genes para la degradación de 3,5-DHB en *T. aromatica* AR-1 identificados en esta tesis se ha encontrado un regulador transcripcional que probablemente esté involucrado en la degradación del compuesto y que pertenece a la familia LysR. A continuación describimos el mecanismo de acción de estas dos familias de reguladores transcripcionales.

5.1 Reguladores transcripcionales de promotores dependientes de σ^{54}

La expresión génica está controlada a nivel transcripcional por las proteínas reguladoras, moléculas efectoras y otros elementos que pueden actuar directa o indirectamente modulando la actividad de la ARN polimerasa, como pueden ser los factores sigma (σ). El núcleo enzimático de la ARN polimerasa está formado por cinco subunidades ($\sigma_2\beta\beta'\omega$) que para iniciar eficazmente la transcripción necesita asociarse al factor sigma para formar la holoenzima ($\sigma_2\beta\beta'\omega\sigma$), que es capaz de reconocer la secuencia de los promotores. Los genomas bacterianos codifican distintos factores sigma que confieren especificidad en el reconocimiento de la ARN polimerasa entre distintos tipos de promotores (Ishihama, 2000); hay uno principal, el factor sigma 70 (σ^{70}), que está dedicado a la transcripción de genes esenciales para el mantenimiento de las funciones celulares. Además hay otros factores alternativos que dirigen al núcleo de la ARN polimerasa hacia promotores de genes para la expresión de proteínas implicadas en respuestas específicas, como virulencia, fijación de nitrógeno, respuesta a estrés, desarrollo, etc. Dentro de estos factores alternativos está el factor sigma 54 (σ^{54}) que juega un papel crucial en la expresión de genes que permiten adaptarse a cambios en el medio ambiente.

Los reguladores transcripcionales que dependen del factor alternativo σ^{54} (también llamado σ^N) pertenecen a la familia NtrC, también llamados reguladores transcripcionales dependientes de σ^{54} y más recientemente EBPs (*enhancer-binding protein*) dentro de la superfamilia AAA+ (*ATPase associated with various cellular activities*) por contener un dominio central que reconoce e hidroliza ATP, necesario para la activación de la transcripción (Schumacher et al., 2006; Chen et al., 2008).

Esta familia (número de acceso PF00158) está formada por 157 miembros que comparten el dominio AAA+, quien interacciona con σ^{54} y es responsable de la hidrólisis de ATP (Studholme and Dixon, 2003). En el dominio AAA+ de las EBPs hay un motivo conservado GAFTGA, que es el más invariable y que constituye el motivo estructural de interacción con el factor σ^{54} (Zhang et al., 2002). Los reguladores transcripcionales pertenecientes a esta familia controlan la transcripción de promotores reconocidos por la ARN polimerasa unida al factor σ^{54} . Algunos reguladores de la familia reconocen y responden a la presencia de moléculas efectoras, mientras que otros miembros forman parte de un sistema de dos componentes (Shingler, 1996). Las funciones controladas por los reguladores dependientes de σ^{54} no son esenciales para la célula. La ARN polimerasa con σ^{54} se une a las secuencias -12 y -24, características de promotores dependientes de σ^{54} (Thöny and Hennecke, 1989), pero no es capaz por sí sola de formar el complejo abierto. La formación del complejo abierto requiere que un regulador dependiente de σ^{54} hidrolice ATP para que se libere la energía necesaria para la formación de complejo abierto y el inicio de la transcripción (Weiss et al., 1991; Schumacher et al., 2006; Rappas et al., 2007; Wigneshweraraj et al., 2008) (Figura 15).

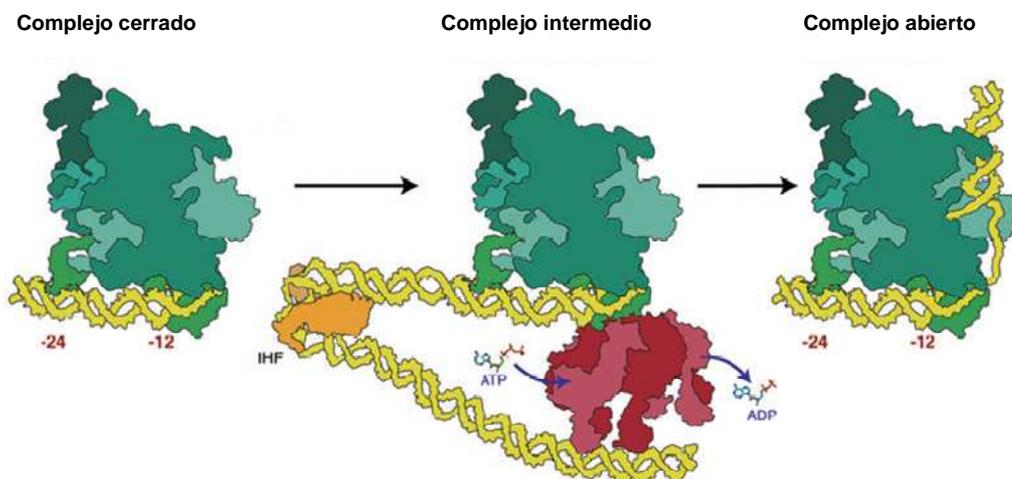


Figura15. Mecanismo de acción de la ARN polimerasa en promotores dependientes de σ^{54} . El complejo formado por la ARN polimerasa y σ^{54} ($E\sigma^{54}$, verde) se une a la región promotora -12 y -24 en el ADN (amarillo), y se forma el complejo cerrado. La unión de IHF (naranja) provoca una curvatura en el ADN necesaria para que el regulador NtrC (rojo) entre en contacto con $E\sigma^{54}$. Cuando el efector se une al regulador provoca un cambio conformacional que deja libre el sitio de unión e hidrólisis de ATP; esta liberación de energía es la que permite la activación del complejo que pasa a complejo abierto y se inicia, por tanto, la transcripción (Wigneshweraraj et al., 2008).

Otra característica de estos reguladores es que tienen sitios de unión localizados a cierta distancia aguas arriba del promotor regulado (*Upstream Activating*

Sequences, UAS) (Kustu et al., 1991; Morett and Segovia, 1993). Estas secuencias de unión suelen ser repeticiones invertidas que en algunos casos pueden desplazarse artificialmente más de 1 Kb y/o invertir su orientación sin que se vea alterada la transcripción (Reitzer and Magasanik, 1986). La correcta interacción entre el activador unido a sus UASs y el complejo transcripcional cerrado unido al promotor requiere una proximidad física entre ambos, que se consigue gracias a la curvatura del ADN (Kustu et al., 1991), que en muchos casos se produce gracias a la unión de la proteína auxiliar IHF (*Integration Host Factor*) o a una curvatura intrínseca del ADN (Pérez-Martín et al., 1994) (Figura 15).

Los miembros de esta familia de reguladores están constituidos por tres dominios funcionales involucrados en la recepción de la señal (dominio A), en la activación transcripcional (dominio C) y en la unión al ADN (dominio D) (Figura 16) (Morett and Segovia, 1993; North et al., 1993; Shingler, 1996).

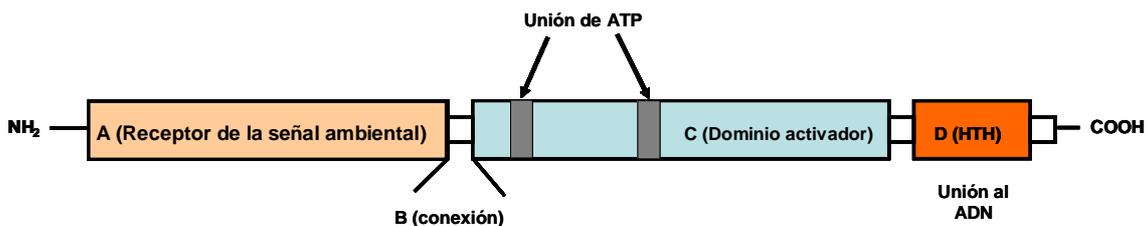


Figura 16. Representación esquemática de los dominios de una proteína de la familia de reguladores dependientes de σ^{54} (familia NtrC). En la región N-terminal se encuentra el dominio A encargado de detectar la señal que activa el regulador transcripcional. El dominio B es una región corta de conexión entre el dominio C y A. El dominio central (C) es el dominio activador encargado de unir e hidrolizar ATP (casillas sombreadas). En la región C-terminal se encuentra el dominio D con estructura hélice-giro-hélice (HTH) que está implicado en la unión al ADN. Modificado de (Shingler, 1996).

El dominio central (C) (de unos 240 residuos), también llamado dominio AAA+, es el dominio más conservado de la proteína y está implicado en la activación transcripcional. El papel de este dominio es la unión y la hidrólisis de ATP y también la interacción con la polimerasa unida al factor sigma 54 ($E\sigma^{54}$). Se han detectado siete regiones con gran homología en este dominio (C1 a C7) (Morett and Segovia, 1993). De estas regiones C1 y C5 serían las implicadas en la unión e hidrólisis de ATP. La región C3, donde se encuentra el motivo GAFTGA, consiste en dos hélices alfa separadas por un giro y estaría implicada en la interacción con $E\sigma^{54}$ (Weiss et al., 1991; Morett and Segovia, 1993). El dominio C-terminal (D) contiene un dominio hélice-giro-hélice (HTH) de unión al ADN. En NifA y NtrC, el dominio D aislado conserva la

capacidad de unión al ADN. Parece ser que el papel del dominio de unión puede ser doble, proporciona especificidad porque incrementa la concentración local del regulador cerca del promotor y facilita la propia oligomerización de la proteína necesaria para la activación transcripcional (Porter et al., 1993).

Entre el dominio A y C existe una región de longitud variable (de 15 a 25 residuos) conocida como dominio B o bisagra flexible (Wootton and Drummond, 1989). En la región N-terminal está localizado el dominio A que varía mucho en su longitud dentro de las proteínas de la familia (desde apenas los 12 residuos de HrpS de *P. syringae* a casi 400 de FhIA de *E. coli*). En este dominio no se han encontrado regiones homólogas entre todos los reguladores de la familia; las proteínas se pueden agrupar atendiendo al modo en que reciben las señales activadoras. Estas se pueden transmitir como fosforilación, mediante interacción directa con otras proteínas o por una activación directa mediada por una molécula efectora (Shingler, 1996).

Regulación por fosforilación. Ocurre en aquellos miembros de la familia, como NtrC o DctD, que son proteínas de respuesta de un sistema de dos componentes. En estos sistemas, una proteína-quinasa, localizada generalmente en la membrana, detecta la señal ambiental y activa al regulador transcripcional, que se expresa constitutivamente (Shingler, 1996). Esta activación se lleva a cabo gracias a la transferencia de un grupo fosfato a un residuo de aspártico conservado en el dominio A (Stock et al., 1989; Stock et al., 1990; Alex and Simon, 1994). Aunque el regulador sin fosforilar es capaz de unirse al ADN, sólo la forma fosforilada es capaz de activar la transcripción. La fosforilación del regulador es necesaria para la actividad ATPasa, la oligomerización y la formación del complejo abierto. La fosforilación del dominio receptor provoca cambios conformacionales que desreprimen o facilitan el ensamblaje de los dominios AAA+, permitiendo la multimerización y la formación del anillo en cuyo interior quedan expuestos los dominios GAGTGA que interactúan con el factor σ^{54} , permitiendo de esta manera un contacto directo con la ARN polimerasa. De esta forma que cuando se produce la hidrólisis de ATP la energía se transfiere directamente al complejo, y la hidrólisis provoca un cambio en el bucle GAFTGA que se libera el factor σ^{54} del núcleo de la polimerasa (Porter et al., 1995; Lee et al., 2003; Chen et al., 2008; Chen et al., 2010).

Regulación por interacción proteína-proteína. Los reguladores de este grupo son proteínas cuya actividad se regula a través de la interacción directa con otras proteínas. A este grupo pertenecen NifA y otras proteínas relacionadas (VnfA y AnfA) que regulan la expresión de nitrogenasas sensibles a oxígeno (Joerger et al., 1989; Martínez-Argudo et al., 2004). El dominio A de estas proteínas tiene una longitud

variable y presentan una moderada similitud entre sí (29-46% de identidad). En *K. pneumoniae* y *A. vinelandi*, NifL inhibe la actividad de NifA en presencia combinada de oxígeno y nitrógeno fijado. Esta inhibición ocurre por una interacción directa proteína-proteína que ha sido evidenciada inmunquímica (Henderson et al., 1989; Schmitz et al., 2002). En la región N-terminal de NifA existe un dominio GAF, cuya estructura tridimensional es similar a la del dominio PAS (Ho et al., 2000), a través del cual interacciona con el dominio ADP de NifL, lo que provoca la inhibición de la función del dominio AAA+ e impide su oligomerización y la unión e hidrólisis de ATP, así como la interacción con σ^{54} (Zhang et al., 2002; Martínez-Argudo et al., 2004).

Regulación por interacción directa con el efector. A este grupo pertenecen proteínas que se activan en respuesta a distintos efectores, y no requieren de una proteína auxiliar que detecte la señal del entorno. DmpR, XylR y PhhR son ejemplos muy estudiados. Estos reguladores se activan en respuesta a sustratos aromáticos (y algunos intermediarios y/o análogos estructurales) de las rutas de degradación que controlan y su dominio A presenta más del 62% de identidad (Abril et al., 1989; Shingler and Moore, 1994; Ng et al., 1995). La unión directa del efector a estos reguladores tiene las mismas consecuencias que la fosforilación, es decir, se estimula la actividad ATPasa del dominio central (Shingler and Pavel, 1995). En ausencia del efector, el dominio A bloquea el sitio de unión e hidrólisis del ATP del dominio C y en presencia del efector aromático se produce un cambio conformacional que deja accesible el sitio de unión de ATP. De hecho, la delección del dominio A en reguladores como DmpR y XylR produce un regulador con actividad constitutiva y por tanto independiente del efector (Fernández et al., 1995; Shingler and Pavel, 1995) (Figura 17).

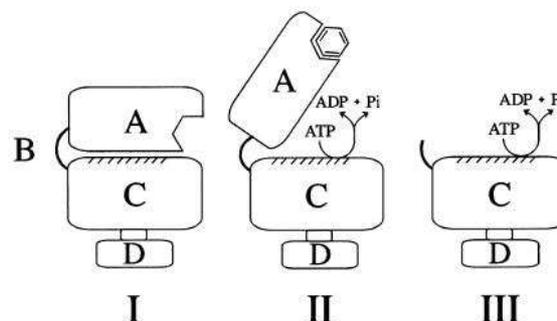


Figura 17. Modelo de activación de DmpR y XylR por su efector aromático específico. I. En ausencia del efector, el dominio A bloquea el sitio de unión e hidrólisis del ATP. II. En presencia del efector aromático se libera el efecto represor del dominio A sobre C. III. Un delección del dominio A provoca una expresión constitutiva del regulador independiente del efector (Shingler, 1996).

5.2 Reguladores transcripcionales de la familia LysR

La familia LysR de reguladores transcripcionales (*LysR type transcriptional regulators*, LTTR) fue descrita inicialmente por Henikoff (Henikoff et al., 1988). Originariamente se describieron como activadores transcripcionales de genes localizados divergentemente con respecto al gen regulado y sometidos a una autorregulación negativa (Lindquist et al., 1989; Schell, 1993; Parsek et al., 1994a). Trabajos más recientes los consideran reguladores globales de la transcripción, que pueden actuar en calidad de activadores o represores de genes individuales u operones, que se suelen transcribir divergentemente al gen regulado, pero que también pueden estar ubicados en cualquier región del cromosoma bacteriano (Heroven and Dersch, 2006; Hernandez-Lucas et al., 2008). Todos los LTTRs involucrados en la degradación de compuestos aromáticos tienen un tamaño de 394 a 403 amino ácidos, con un peso molecular entre 32 y 37 kDa. Todas las evidencias hasta el momento parecen indicar que la forma activa es un tetrámero (Tropel and van der Meer, 2004). Por ejemplo, ClcR y CatR de *P. putida*, que regulan los pasos iniciales de conversión de catecol y 3-clorocatecol, respectivamente, han sido identificados como dímeros en solución (Parsek et al., 1992; Coco et al., 1994), pero se necesitan dos dímeros unidos al ADN para la activación (McFall et al., 1997). Otros reguladores de esta familia son tetrámeros en solución (MacLean et al., 2008). En la mayoría de los casos, los reguladores LysR requieren para su activación interaccionar con efectores de bajo peso molecular, y sólo en unos pocos casos se ha descrito que puedan actuar efectores con efecto positivo y negativo sobre la misma proteína (Ostrowski and Kredich, 1990; Jacobs et al., 1997; Picossi et al., 2007),

Esta familia la componen un grupo numeroso de reguladores de función diversa, con una alta homología en su secuencia N-terminal, que contiene un motivo HTH (hélice-giro-hélice) de unión a ADN. Las otras funciones de activación transcripcional, de unión al efector y la de polimerización residen en el dominio C-terminal, que es el dominio de reconocimiento y respuesta, también llamado dominio regulador (Figura 18) (Schell, 1993; Maddocks and Oyston, 2008).

Dominio de unión al ADN (HTH). El motivo HTH está presente en todos los LTTRs y aproximadamente en el 95% de las proteínas procarióticas de unión a ADN. En la familia LTTR este motivo se localiza entre los residuos 20 a 90 del extremo N-terminal. Se trata de un dominio hélice-giro-hélice de tipo alado (*winged helix-turn-helix*), formado por 3 α hélices y 2 láminas β . La segunda y tercera hélice son las que

interacciona con el ADN, insertándose la tercera en el surco mayor de la doble hélice (Maddocks and Oyston, 2008).

Dominio regulador. Este dominio está menos conservado a nivel de aminoácidos. Esta región está formada por los subdominios α/β (RD1 y RD2) que están conectadas por un región que forma una hendidura dónde se podría alojar el co-inductor (Stec et al., 2006). Se han identificado posiciones en la región comprendida entre los residuos 95 y 210 que son importantes para la interacción con el inductor (Burn et al., 1989; Cebolla et al., 1997; Jorgensen and Dandanell, 1999). El dominio regulador donde se une el co-inductor está conectada al dominio HTH a través de una hélice larga de conexión flanqueada de una región bisagra en cada extremo (Figura 18).

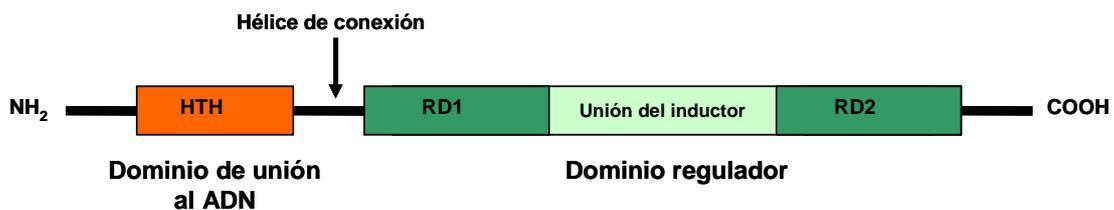


Figura 18. Modelo de organización en dominios de los reguladores LTTR. Los extremos amino y carboxilo se indican como NH₂ y COOH respectivamente (López-Sánchez, 2009).

5.2.1 Regulación transcripcional por LTTR

En los promotores regulados por LTTR se pueden identificar varios sitios de unión del regulador, situados en diferentes posiciones con respecto al punto de inicio de la transcripción: estos reguladores se pueden unir desde la posición -35 a la +20 pb (sitio de unión regulatorio, RBS y sitio autorregulatorio), y entre las posiciones -40 y -20 pb (sitio de unión activador, ABS) (Maddocks and Oyston, 2008). El primer sitio de unión de LTTRs se identificó en *Rhizobium* spp. con un consenso ATC-N₉-GAT, en torno a -20 y -75 pb del gen *nod* (Goethals et al., 1992). Desde entonces se habla de caja LTTR, que consiste en una secuencia pseudopalindrómica cuyo consenso es T-

N_{11} -A, aunque puede variar en la composición de las bases y en la longitud. Este consenso se mantiene sólo para el sitio de unión regulatorio (RBS) pero no para el sitio activador (ABS) (Parsek et al., 1994b). La afinidad de los LTTR por los distintos sitios de unión viene determinada por la unión con el efector.

Mecanismo de regulación clásica. Activación transcripcional y autorregulación negativa. Los LTTR autorregulan su expresión cuando se transcribe divergentemente al gen u operón que regulan gracias a la unión al sitio RBS. Los LTTR funcionan como dímeros uniéndose de manera independiente a la presencia de efector al sitio RBS del promotor que activan. Este sitio solapa con el sitio de unión de la ARN polimerasa en su propio promotor y por tanto impide el acceso de ésta, inhibiendo su propia transcripción. Las evidencias bioquímicas y genéticas parecen indicar que en presencia del efector, un segundo dímero unido al sitio ABS sufriría un cambio conformacional que lo desplazaría ligeramente sobre el ADN, permitiendo la interacción con la ARN polimerasa y la activación del promotor del gen diana (Maddocks and Oyston, 2008). De esta forma actúan los reguladores GltC de *B. subtilis* (Picossi et al., 2007) y AtzR de *Pseudomonas* sp. ADP (Porrúa et al., 2007).

Mecanismo de activación. En los promotores activados por LTTRs, el papel de los sitios RBS y ABS no está del todo claro. En algunos casos, como en ClcR de *Pseudomonas* y CbnR de *Rhizobium*, los reguladores contactan con ambas secuencias en ausencia del efector; sin embargo, en otros casos, como en CatR, en ausencia de efector sólo se ocupa el sitio RBS (Rothmel et al., 1990; Rothmel et al., 1991). Los reguladores tienen una mayor afinidad por el sitio RBS que por el ABS. Sin embargo, los contactos con ABS son imprescindibles para la interacción con la ARN polimerasa. Chugani y colaboradores (1997) propusieron que el complejo regulatorio conectaba directamente con el extremo C-terminal de la subunidad α de la ARN polimerasa (α -CTD) que se unía a una región situada entre los sitios RBS y ABS denominado motivo UP (Figura 19), y que dicha interacción incrementaba la afinidad de la ARN polimerasa por el promotor (Chugani et al., 1997).

También se ha visto que el grado de curvatura del ADN, que se relaja como consecuencia de la unión del segundo dímero en el sitio ABS, controla el nivel de transcripción de los promotores regulados por LTTR (Chugani et al., 1997)

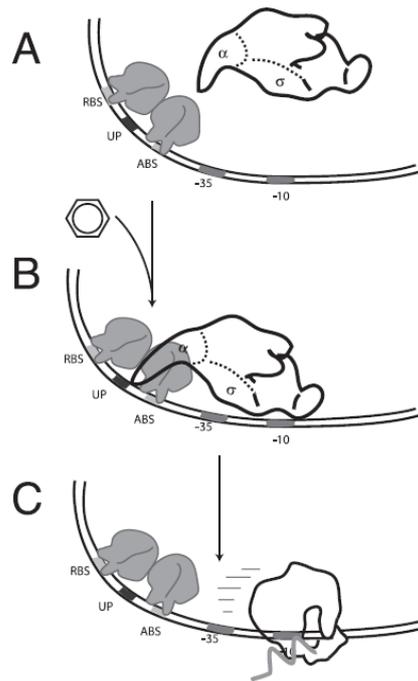


Figura 19. Representación esquemática de los pasos de la activación transcripcional de un regulador de tipo LysR. (A) Dos subunidades del tetrámero regulador se unen al RBS y otras dos subunidades al ABS cerca de la región promotora -35. (B y C) En presencia del inductor la proteína reguladora se desliza hacia la posición -42. Se produce una interacción con la subunidad alfa de la ARN polimerasa (α -CTD) que se une a una región entre RBS y ABS denominada UP (B). Esto incrementa la afinidad de unión de la ARN polimerasa por el promotor y se inicia la transcripción (C) (Tropel and van der Meer, 2004).

6 REGULACIÓN GLOBAL

En la regulación global de las rutas anaerobias de degradación de compuestos aromáticos juegan un papel muy importante la regulación por oxígeno y la represión catabólica, ya que su objetivo es favorecer que se expresen unos genes catabólicos sobre otros en función de la disponibilidad de ciertas fuentes de carbono y aceptores de electrones en el medio ambiente. En organismos anaerobios, el oxígeno constituye una señal ambiental muy importante que va a regular la expresión de los genes catabólicos, siendo de especial importancia en aquellos casos en los que las enzimas son sensibles a oxígeno.

6.1 Regulación por oxígeno.

En *R. palustris* se describió por primera vez cómo una proteína miembro de la familia Fnr (AadR) estaba involucrada en la regulación de la degradación anaerobia de compuestos aromáticos en respuesta a oxígeno (Egland and Harwood, 1999). En *R.*

palustris existen tres proteínas reguladoras que ejercen su efecto sobre el promotor del operón *badDEFG* para la degradación anaerobia de benzoato; BadR es una proteína miembro de la familia MarR que responde al benzoato o benzoil-CoA induciendo la expresión de los genes para la benzoil-CoA reductasa; BadM reprime la degradación de benzoato al unirse al promotor de *badD*, y la unión de benzoato al regulador provoca cambios conformacionales que permiten la liberación del promotor y por tanto la expresión de los genes para la degradación de este (Peres and Harwood, 2006; Carmona et al., 2009); finalmente AadR activa la expresión del operón *badDEFG* en respuesta a anaerobiosis porque la proteína AadR tiene todas las características de una proteína capaz de detectar el potencial redox gracias a cuatro residuos de cisteína, tres en el extremo N-terminal y una en el centro de la proteína, que coordinan los centros [4Fe-4S]. Cuando la proteína AadR se expone a oxígeno esta estructura se desensambla, volviéndose a ensamblar cuando es reducida (Khoroshilova et al., 1997). AadR responde a la ausencia de oxígeno en su forma activa (reducida) uniéndose a la secuencia consenso (TTGAT-N₄-ATCAA), situada en la región promotora del operón *badDEFG*, típica de la unión de proteínas de la familia Fnr, que está centrada en la posición -39,5 relativa al punto de inicio de la transcripción (Egland et al., 1997). No se puede descartar, sin embargo, la posibilidad de que AadR actúe además indirectamente en la transcripción activando a otras proteínas reguladoras (Egland and Harwood, 1999).

Otro caso donde se han estudiado muy bien los mecanismos moleculares de la regulación de genes catabólicos mediada por oxígeno es en *Azoarcus* sp. CIB, donde se ha visto que la proteína AcpR, perteneciente a la familia Fnr de reguladores transcripcionales, regula la expresión del promotor P_N para la expresión de los genes para la degradación de benzoato (Durante-Rodriguez et al., 2006). Como ocurría en *R. palustris*, esta proteína actúa uniéndose a la secuencia consenso TTGA-N₄-ATCAA. Sin embargo, el promotor P_R que controla la expresión del gen *bzdR*, no está sujeto a una regulación por oxígeno dependiente de AcpR (Durante-Rodriguez et al., 2008).

También se ha descrito represión por oxígeno en *T. aromatica*, donde existe una fuerte represión de los genes para la benzoil-CoA reductasa que sólo se detecta en pequeñas cantidades en condiciones de aerobiosis (Heider et al., 1998); en los genes *bss* para la degradación de tolueno en *M. magnetotacticum* TS-6, que sólo se transcriben en anaerobiosis (Shinoda et al., 2005); o en *Azoarcus* sp EbN1 donde se ha observado poca abundancia de proteínas involucradas en la degradación aeróbica de benzoato en células creciendo anaeróticamente con benzoato (Wöhlbrand et al., 2007).

6.2 Represión catabólica.

Muchas bacterias pueden utilizar varios compuestos como fuente de carbono. En algunos casos estos compuestos se pueden co-metabolizar, pero en otros se utiliza preferentemente una fuente de carbono u otra en función de su fácil acceso o de que permita un crecimiento más rápido. Uno de los ejemplos más conocidos en la utilización preferencial de una fuente de carbono es el de *E. coli* cuando se cultiva con glucosa y lactosa, observado por primera vez por Jaques Monod (Monod, 1942). Hoy en día este fenómeno se conoce con el nombre de represión catabólica por carbono (CCR). Es un fenómeno regulatorio por el cual la expresión de los genes y actividad de las enzimas encargadas de metabolizar la fuente de carbono secundaria disminuyen en presencia de la fuente de carbono preferente (Gorke and Stulke, 2008).

En los últimos años se han descrito mecanismos de represión catabólica en la degradación anaerobia de compuestos aromáticos en *T. aromatica* (Heider et al., 1998) y *Azoarcus* sp. CIB (Durante-Rodriguez et al., 2008). Barragán y colaboradores (2004) observaron que algunos ácidos orgánicos como succinato, acetato o malato, ejercían efectos de represión catabólica sobre el promotor P_N que controla los genes para la degradación de benzoato, mientras que otros compuestos que no podían ser utilizados anaeróbicamente (citrato, glicerol, fructosa y maltosa) no ejercían ningún efecto represor. Además, esto se correspondía con una disminución drástica de la actividad benzoato-CoA ligasa cuando *Azoarcus* sp. CIB era cultivado anaeróbicamente con malato, succinato y acetato como fuentes adicionales de carbono (Barragan et al., 2004).

En *T. aromatica* AR-1 la síntesis inicial de enzimas para la degradación de 3,5-DHB parece estar estrictamente regulada y sometida a mecanismos de inducción y de represión catabólica. La degradación de benzoato a través de la ruta del benzoil-CoA puede reprimir la expresión de genes para la degradación de 3,5-DHB incluso en presencia de posibles inductores (Philipp and Schink, 2000). En presencia de benzoato y 3,5-DHB, *T. aromatica* AR-1 presenta un crecimiento diáuxico en el que en una primera fase se produce la degradación de benzoato, seguida de una fase de latencia después de la cual se reanuda el crecimiento a expensas de 3,5-DHB. Los niveles de actividad de las dos primeras enzimas de la ruta, la 3,5-DHB hidroxilasa y la HHQ deshidrogenasa, son significativamente menores en células crecidas con benzoato como fuente de carbono, o en la primera fase del crecimiento diáuxico mientras hay benzoato en el medio. Los niveles aumentan significativamente en la segunda etapa del crecimiento diáuxico, una vez consumido el benzoato e iniciada la

degradación de 3,5-DHB (Philipp and Schink, 2000). Hasta el momento se desconoce cuales son los mecanismos moleculares de represión catabólica que tendrían lugar en *T. aromatica* AR-1.

OBJETIVOS

El trabajo de esta tesis doctoral se ha centrado en el estudio de las rutas de degradación de aromáticos hidroxilados en bacterias desnitrificantes. Anteriormente se habían identificado los genes codificantes de la ruta de degradación de resorcinol de la bacteria anaerobia estricta *Azoarcus anaerobius* (Darley *et al.*, 2007). Igualmente, se había descrito una cepa anaerobia facultativa capaz de degradar en anaerobiosis el derivado carboxilado del resorcinol, el 3,5-dihidroxibenzoato (α -resorcilato), utilizando una ruta semejante a la de *A. anaerobius*, y en la que no intervenía el intermediario central común a la mayoría de las rutas de degradación anaerobia de compuestos aromáticos, el benzoil-CoA. Para profundizar en la genética y biología molecular de estas rutas y sus peculiaridades, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar la regulación de la expresión de la ruta de degradación de resorcinol en la bacteria anaerobia estricta *Azoarcus anaerobius*.
2. Identificar los genes de la ruta de degradación de 3,5-dihidroxibenzoato en la bacteria anaerobia facultativa *Thauera aromatica*.
3. Analizar la regulación de la expresión de la ruta de degradación de 3,5-dihidroxibenzoato en la bacteria anaerobia facultativa *Thauera aromatica*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CEPAS BACTERIANAS

Las estirpes utilizadas en este trabajo, sus genotipos y sus características fenotípicas más relevantes se recogen en la Tabla 1.

Tabla 1. Estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo

Cepa	Genotipo/Características	Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
HB101	<i>supE44 hsdS20 (r_Bm_B) recA13 ara-14proA2 lacY1 galK2 rpsL20 (Sm^R) xyl-5 mtl-1</i>	(Boyer and Roulland-dussoix, 1969)
CC118	β (<i>ara-leu</i>) <i>araD βlacX74 galE galK phoA20 thi1 rpsE (Sp^R) rpoB (Rif^R) argE recA1</i>	(Manoil and Beckwith, 1985)
CC118 λ pir	CC118 lisogenizada con el fago λ pir	(de Lorenzo et al., 1990)
DH5 α	<i>endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA(Nal^R) relA1 Δ(argF-lac) U169 depR(Φ80d<i>lac</i>Δ(<i>lacZ</i>) M15)</i>	(Sambrook and Rusell, 2001)
<i>Thauera aromatica</i> AR-1		
<i>T. aromatica</i> AR-1 (DSM11528)	Cepa silvestre, anaerobia facultativa, degrada 3,5-DHB anaeróticamente	(Gallus et al., 1997)
AR-1Mut Ω <i>dbhL</i>	Mutante de la cepa <i>T. aromatica</i> AR-1 con el plásmido pAM <i>dbhL</i> integrado en el cromosoma, Km ^R	Este trabajo
AR-1Mut Ω <i>dbhS</i>	Mutante de la cepa <i>T. aromatica</i> AR-1 con el plásmido pAM <i>dbhS</i> integrado en el cromosoma, Km ^R	Este trabajo
AR-1Mut Ω <i>orf13</i>	Mutante de la cepa <i>T. aromatica</i> AR-1 con el plásmido pAM <i>orf13</i> integrado en el cromosoma, Km ^R	Este trabajo
AR-1Mut Ω <i>ofr18</i>	Mutante de la cepa <i>T. aromatica</i> AR-1 con el plásmido pAM <i>orf18</i> integrado en el cromosoma, Km ^R	Este trabajo
AR-1Mut Ω <i>bqdm</i>	Mutante de la cepa <i>T. aromatica</i> AR-1 con el plásmido pAM <i>bqdm</i> integrado en el cromosoma, Km ^R	Este trabajo
AR-1Mut Ω <i>orf20</i>	Mutante de la cepa <i>T. aromatica</i> AR-1 con el plásmido pAM <i>orf20</i> integrado en el cromosoma, Km ^R	Este trabajo
AR-1Mut Ω <i>orf21</i>	Mutante de la cepa <i>T. aromatica</i> AR-1 con el plásmido pAM <i>orf21</i> integrado en el cromosoma, Km ^R	Este trabajo
AR-1Mut Ω <i>bqdl</i>	Mutante de la cepa <i>T. aromatica</i> AR-1 con el plásmido pAM <i>bqdl</i> integrado en el cromosoma, Km ^R	Este trabajo
<i>Azoarcus anaerobius</i>		
LuFRes1 (DSM12081)	Cepa silvestre, anaerobia estricta, degrada resorcinol, nitratorreductora	(Springer et al., 1998)
<i>Azoarcus</i> sp. CIB		
	Cepa silvestre, anaerobia facultativa, degradadora de compuestos aromáticos	(López Barragan et al., 2004)

2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Todos los medios de cultivo y soluciones fueron esterilizados bajo calor húmedo, en autoclave, a 120°C y a 1 atmósfera de presión. Los antibióticos y las soluciones que no podían ser autoclavadas, como las vitaminas, se esterilizaron por filtración utilizando filtros estériles de nitrocelulosa o policarbonato de 0,22 µm de diámetro de poro.

2.1 Medios ricos

Como medio habitual de crecimiento para *E. coli* se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook et al., 1989), cuya composición es la siguiente: 10 g de bactotripton, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl. Se ajusta el pH a 7 y se enrasa con agua desionizada hasta 1 litro. Para la preparación de medio sólido LB, a la solución anterior se le añade bacto-agar hasta una concentración final de 2% (p/v).

2.2 Medios mínimos

Las cepas de *Thauera* y *Azoarcus* se cultivaron anaeróbicamente en botellas de 100 o 50 ml, cerradas con tapones de butilo y selladas herméticamente con arandelas de aluminio. El medio de cultivo empleado fue el medio mínimo de sales descrito por Widdel y Pfenning (1981) modificado según Darley *et al.*, (2007), en el que el tampón bicarbonato se sustituye por tampón MOPS (ácido 3-morfolinopropano-1-sulfónico) 30 mM (medio mínimo de Widdel).

Para la preparación de 100 ml de medio mínimo de Widdel, se mezclan 4 ml de medio widdel basal (25X); 1 ml de NaSO₄ (1 mM); 5 ml de MOPS (0,6 M, pH 7,2); 50 µl de vitaminas (500 X); 100 µl de solución SL10 (1000X); 100 µl de solución Se/Wo (1000X); 1 ml de KNO₃ (8 mM) y la fuente de carbono indicada a la concentración deseada.

La composición de 1 litro de **medio Widdel basal 25X** fue: NaCl, 25,0 g/l; MgCl₂·6H₂O, 10 g/l; KH₂PO₄, 5 g/l; NH₄Cl, 6,25 g/l; KCl, 12,5 g/l; CaCl₂·2H₂O, 3,75 g/l; agua hasta 1 litro.

La composición de 1 litro de solución de **elementos traza SL10** fue: HCl 25%(7.7 N), 10 ml; FeCl₂·4H₂O, 1,5 g; ZnCl₂, 70 mg; MnCl₂·4H₂O, 100 mg; H₃BO₃, 6 mg; CoCl₂·5H₂O, 190 mg; CuCl₂·2H₂O, 2 mg; NiCl₂·6H₂O, 24 mg; Na₂MoO₄·2H₂O, 36 mg, agua hasta 1 l.

La composición de la solución de **Selenio/Wolframio** fue: NaOH, 0,5 g; Na₂SeO₃·5H₂O, 3 mg; Na₂WO₄·2H₂O, 4 mg; agua hasta 1 l.

La composición de la **solución de vitaminas** fue: ácido 4-aminobenzoico, 4 mg; Biotina, 1 mg; ácido nicotínico, 10 mg; D-pantotenato cálcico, 5 mg; piridoxina-HCl·2H₂O, 15 mg; tiamina-HCl₂, 10 mg; cianocobalamina, 5 mg; agua hasta 100 ml.

Las fuentes de carbono utilizadas fueron succinato (5 mM), resorcinol (1,3-dihidroxibenzoato) (2 mM) y α-resorcilato (3,5-dihidroxibenzoato) (2 mM).

2.3 Obtención de las condiciones anaeróbicas en los medios de cultivo

Para obtener las condiciones de anaerobiosis, se mezclaron todos los componentes del medio y se añadió el agua todavía caliente, para favorecer la difusión de los gases. Se dispensó la mezcla en botellas de vidrio de 50 ó 100 ml y se gaseó con N₂ a través de filtros de nitrocelulosa de 0,2 µm de diámetro de poro durante 10-15 minutos para garantizar la eliminación total del oxígeno del medio. Finalmente las botellas se cerraron con tapones de butilo y se sellaron con arandelas de aluminio.

Las fuentes de carbono se prepararon en botellas de 100 ml a una concentración de 0,5 a 1 M y se gasearon con N₂. Las botellas se sellaron con tapones de butilo y arandelas de aluminio.

2.4 Antibióticos

Las soluciones de antibióticos se prepararon concentradas mil veces en agua destilada, excepto el cloranfenicol que se preparó en etanol absoluto, y la rifampicina y tetraciclina que se disolvieron en metanol. Las soluciones preparadas en agua destilada se esterilizaron por filtración y todos los antibióticos se almacenaron a -20°C. Los antibióticos se utilizaron a las concentraciones finales siguientes: Piperacilina (PIP), 90 µg/ml; Ampicilina (Ap), 100 µg/ml; Estreptomicina (Sm), 50 µg/ml; Neomicina (Neo), 50 µg/ml; Cloranfenicol (Cm), 30 µg/ml etanol; Kanamicina (Km), 25 µg/ml; Tetraciclina (Tc), 10 µg/ml ; Rifampicina (Rif), 10 µg/ml; Nalidixico (Nal), 10 µg/ml; Gentamicina (Gm), 10 µg/ml.

2.5 Condiciones de cultivo

Las cepas de *E. coli* se cultivaron a 37°C con una agitación de 200 rpm, para cultivos líquidos; los cultivos en medio sólido se incubaron a 37°C en una estufa.

El cultivo en aerobiosis de las cepas *T. aromatica* y *Azoarcus* sp. CIB se llevó a cabo en matraces de 100 ml a 30°C (empleando el mismo medio descrito en el apartado 2.2 pero sin adicionar el aceptor de electrones (KNO₃) ni el tampón MOPS y con agitación suave (100 rpm). Cuando se cultivaron en anaerobiosis, se hizo en oscuridad, en botellas selladas y sin agitación. El crecimiento de los cultivos se monitorizó midiendo la absorbancia a 600 nm (A₆₀₀) empleando un espectrofotómetro Shimadzu UV-266.

2.6 Conservación de las cepas bacterianas

La conservación de las cepas a corto plazo se hizo en cultivos en estría en placas de medios selectivos y en medio líquido a 4°C. La conservación a largo plazo se hizo por congelación de cultivos líquidos en 40% (v/v) de glicerol a -80°C.

3. PLÁSMIDOS

Los plásmidos utilizados y construidos en este trabajo, junto con sus características más relevantes se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Plásmidos utilizados y construidos en este trabajo

Plásmido	Características	Referencia
pBlueScript SK+	Ap ^r , derivado de pUC19.	<i>Stratagene</i>
pGEMT	Ap ^r , vector de clonación para fragmentos de PCR	<i>Promega</i>
pMBLT	Ap ^r , vector de clonación para fragmentos de PCR	<i>Invitrogene</i>
pCHESIΩKm	Ap ^r , Km ^r , pUC18 con oriT de RP4 y fragmento <i>HindIII</i> de pHP45ΩKm (interposón Ω-Km), <i>oriTRP4</i>	(Llamas et al., 2003)
pAM <i>dbhL</i>	pCHESIΩKm con fragmento de 411 pb de la región interna de <i>dbhL</i> de <i>T. aromatica</i> AR-1 clonado en el sitio <i>SacI/EcoRI</i>	Este trabajo
pAM <i>dbhS</i>	pCHESIΩKm con fragmento de 584 pb de la región que incluye el gen <i>dbhS/orf9</i> de <i>T. aromatica</i> AR-1 clonado en el sitio <i>SacI/EcoRI</i>	Este trabajo
pAM <i>orf13</i>	pCHESIΩKm con fragmento de 650 pb de la región interna del gen <i>orf13</i> de <i>T. aromatica</i> AR-1 clonado en el sitio <i>SacI/EcoRI</i>	Este trabajo
pAM <i>orf18</i>	pCHESIΩKm con fragmento de 819 pb de la región interna de la <i>orf18</i> de <i>T. aromatica</i> AR-1 clonado en el sitio <i>SacI/EcoRI</i>	Este trabajo
pAM <i>bqDM</i>	pCHESIΩKm con fragmento de 738 pb de la región interna del gen <i>bqDM</i> de <i>T. aromatica</i> AR-1 clonado en el sitio <i>SacI/EcoRI</i>	Este trabajo

pAMorf20	pCHESIΩKm con fragmento de 700 pb de la región interna de la <i>orf20</i> de <i>T. aromatica</i> AR-1 clonado en el sitio <i>SacI/EcoRI</i>	Este trabajo
pAMorf21	pCHESIΩKm con fragmento de 1010 pb de la región interna de la <i>orf21</i> de <i>T. aromatica</i> AR-1 clonado en el sitio <i>SacI/EcoRI</i>	Este trabajo
pAMbqdl	pCHESIΩKm con fragmento de 863 pb de la región interna del gen <i>bqdl</i> de <i>T. aromatica</i> AR-1 clonado en el sitio <i>SacI/EcoRI</i>	Este trabajo
pGEMAlfaPyr	pGEMT con un fragmento de PCR de 780 pb de la región intergénica comprendida entre los genes <i>rhL</i> y <i>bqdhL</i> de <i>A. anaerobius</i> .	Este trabajo
pRK600	Cm ^r , <i>oriColE1</i> , <i>mobRK2</i> , <i>traRK2</i>	(Kessler et al., 1992)
pLAFR3	Tc ^r , <i>cos</i> , <i>oriV</i> RK2, <i>oriTRK2</i> , β-complementación	(Staskawicz et al., 1987)
R ⁺	Tc ^r , pLAFR3 con fragmento cromosómico de <i>A. anaerobius</i> de 29,9 kb que confiere la capacidad de degradar resorcinol	(Darley et al., 2007)
Mut_13	Tc ^r , Km ^r , R ⁺ <i>btdhS</i> ::TN<KAN-2>; inserción del transposón en el codón 144	(Darley et al., 2007)
Mut_53	Tc ^r , Km ^r , R ⁺ <i>bqdhS</i> ::TN<KAN-2>; inserción del transposón en el codón 126	(Darley et al., 2007)
Mut_rhL	Tc ^r , Km ^r , R ⁺ <i>rhL</i> ::ΩKm	Este trabajo
Mut_redR1	Tc ^r , Km ^r , R ⁺ <i>redR1</i> ::ΩKm	Este trabajo
Mut_redR2	Tc ^r , Km ^r , R ⁺ <i>redR2</i> ::ΩKm; inserción del transposón en el codón 290	Este trabajo
pCOS4	Tc ^R , pLAFR3 con fragmento de 23,6 kb del cromosoma <i>T. aromatica</i> AR-1	Este trabajo
pCOS12	Tc ^R , pLAFR3 con fragmento del cromosoma de <i>T. aromatica</i> AR-1 positivo para las sondas <i>dbhL</i> y <i>dbhS</i>	Este trabajo
pCOS19	Tc ^R , pLAFR3 con fragmento del cromosoma de <i>T. aromatica</i> AR-1 positivo para las sondas <i>dbhL</i> y <i>dbhS</i>	Este trabajo
pCOS2B	Tc ^R , pLAFR3 con fragmento del cromosoma de <i>T. aromatica</i> AR-1 positivo para las sondas <i>mob</i> , <i>bqdl</i> y <i>lysR</i>	Este trabajo
pCOS6B	Tc ^R , pLAFR3 con fragmento del cromosoma de <i>T. aromatica</i> AR-1 positivo para las sondas <i>mob</i> , <i>bqdhL</i> y <i>lysR</i>	Este trabajo

4. AISLAMIENTO DE ADN

Para el aislamiento se utilizaron distintos métodos según el tipo de ADN, la pureza requerida y la cantidad que se quisiera obtener.

4.1 Aislamiento de ADN plasmídico

La cepa bacteriana portadora del plásmido de interés se cultivó en agitación durante 6-14 horas a 37°C en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes.

4.1.1 Método “Quiapreps”

Para la preparación rápida de ADN plasmídico libre de ARN se utilizó el sistema “*Quiapreps spin plasmid kit*” (Quiagen^R), partiendo de un volumen de cultivo de 3 ml y siguiendo las instrucciones del fabricante. Este ADN se utilizó para reacciones de secuenciación y clonación.

4.1.2 Método de lisis alcalina

Para el aislamiento de plásmidos a pequeña escala y análisis tras una clonación se utilizó el método de lisis alcalina (Sambrook et al., 1989) con algunas modificaciones.

Se partió de un volumen de 1,5 ml de cultivo. Las células se recogieron por centrifugación a 16000 x g durante 1 minuto. Tras eliminar el sobrenadante, éstas se resuspendieron en 100 µl de GTE (glucosa, 50 mM; Tris-HCl (pH 8,0), 25 mM; EDTA-Na₂, 10 mM) y lisozima y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 200 µl de solución de lisis (SDS 1% (p/v) y NaOH 0,2 N), se agitó el tubo suavemente por inversión y se incubó durante 5 minutos o hasta que los tubos se pusieran translúcidos. El lisado se neutralizó añadiendo 150 µl de tampón acetato sódico 3 M pH 4,8 y, tras mezclar el tubo por inversión, se incubó durante 30 minutos en un congelador a -20°C. Las proteínas, el ADN cromosómico y los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 16000 x g durante 15 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. Se añadieron dos volúmenes de etanol puro frío y se incubó durante 30 minutos a -20°C y se centrifugó a 16000 x g durante 15 minutos. El precipitado se lavó de sales con un volumen de etanol 70% (v/v) en agua. Tras

descartar el sobrenadante y secar el precipitado, éste se resuspendió en 30 µl de TE (Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM y EDTA-Na₂, 1 mM) o agua Milli-Q.

4.2 Aislamiento de ADN cromosómico

La extracción de ADN cromosómico se realizó con el *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante y partiendo de un volumen de cultivo entre 1 y 50 ml, según la cantidad de ADN cromosómico requerida.

Para la extracción de ADN cromosómico de *Thauera aromatica* AR-1 para la construcción de la genoteca partimos de un cultivo de 45 ml a una DO_{660nm} de 0,3. Se recogieron las células centrifugando a velocidad máxima durante 5 min y se resuspendió en 1,7 ml de TE (TrisCl 1 M pH 8; EDTA 0,5 M), se añadieron 90 µl de SDS 10% y 3 µl de ARNasa (10 mg/ml). Se incubó durante 15 min a 37°C y posteriormente se añadieron 9 µl de proteinasa K (19,2 mg/ml) y se incubó 1 h a 37°C. A continuación se añadieron 300 µl de NaCl 5 M, se mezcló y se añadieron 240 µl de CTAB/NaCl (10% de CTAB; 0,7 M de NaCl) esta solución se incubó durante 10 min a 65°C, tras lo cual se añadieron 2,35 ml de cloroformo/isoamil alcohol (24:1), se mezcló y se centrifugó a 9500 rpm durante 10 min a 4°C. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se añadió un volumen de fenol/cloroformo/isoamil alcohol (25:24:1), y se centrifugó a 9500 rpm durante 10 min a 4°C. Se transfirió nuevamente el sobrenadante a un tubo nuevo, se añadió 0,6 volúmenes de isopropanol frío y se dejó precipitando durante 14 h a -20°C. Después de la precipitación se cogió el ADN cuidadosamente con una varilla y se transfirió a un tubo nuevo que contenía 1,5 ml de etano 70% frío, se centrifugó a 16000 rpm durante 15 min, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente se resuspendió en 100 µl de TrisCl 10 mM y se cuantificó en un Nanodrop (ND-1000 *Spectrophotometer*).

5. TRANSFERENCIA DE PLÁSMIDOS

5.1 Conjugación

La conjugación bacteriana se utilizó para la transferencia de ADN plasmídico desde *Escherichia coli* a cepas de *Azoarcus* sp. CIB y *Thauera aromatica* AR-1. El sistema utilizado fue el denominado "triparental". En este sistema de cruce, las funciones de transferencia (tra) son aportadas en *trans* por un plásmido auxiliar

autotransferible (RK600), que moviliza el plásmido de interés; de esta forma, la bacteria portadora del plásmido auxiliar también forma parte del cruce (de Lorenzo et al., 1990). Se partió de 1 ml de cultivos de 12-16 horas de las cepas de *E. coli* donadora y portadora del plásmido auxiliar y de 15 ml de cultivo (10^8 - 10^9 células/ml) de la cepa receptora cultivada entre 24 y 72 h en medio Widdel succinato en aerobiosis. Las células se recogieron por centrifugación, se mezclaron en 1 ml de medio Widdel y se centrifugaron de nuevo. La suspensión bacteriana resultante se resuspendió en 0,1 ml de medio Widdel y se depositó sobre un filtro estéril de 0,22 μ m de diámetro de poro colocado sobre la superficie de una placa de medio LB sólido que se incubó de 12-16 horas a 30°C. Los transconjugantes se seleccionaron sembrando diluciones seriadas de la mezcla de conjugación en medio mínimo Widdel (ver apartado 2) con succinato 5 mM como fuente de carbono y suplementado con el antibiótico correspondiente, incubando a 30°C hasta la aparición de los transconjugantes.

5.2 Transformación por choque térmico

Este método se utilizó para la preparación de células competentes de *E. coli* y su posterior transformación (Inoue et al., 1990). Con este procedimiento se obtuvieron frecuencias de transformación mayores de 1×10^6 transformantes por μ g de ADN plasmídico.

5.3 Electroporación

En algunos casos, para introducir plásmidos en *E. coli* se empleó el método de electroporación (Choi et al., 2006). Para ello se inoculó *E. coli* en medio LB líquido y se incubó a 37°C durante 12 a 16 horas. Se centrifugaron 1 ó 2 ml de este cultivo y se lavó dos veces con sacarosa 300 mM, resuspendiéndose finalmente en 100 μ l de esa misma solución para obtener una suspensión bacteriana de 10^9 - 10^{10} células/ml. Durante todo el proceso la suspensión celular y las soluciones se mantuvieron a 4°C. Se mezcló el ADN (10-50 ng) con 100 μ l de células electrocompetentes y se transfirió a una cubeta de electroporación (2-mm) y se aplicó un pulso de 12.5 kV/cm (2.5 kV para la cubeta mencionada), 25 μ F y 200 Ω . Inmediatamente se añadió 1 ml de LB, se transfirió a un nuevo tubo y se incubó 1-2 h a 37°C. Posteriormente se sembraron diluciones seriadas en medio selectivo. Se utilizó como control negativo células electroporadas sin ADN (para estimar el número de resistentes espontáneas).

6. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ADN Y ARN

6.1 Determinación de la concentración de ADN y ARN

La concentración de ADN de una solución se determinó espectrofotométricamente utilizando un Nanodrop (ND-1000 *Spectrophotometer*). Se determinó la absorbancia de ADN o ARN a 260 nm y 280 nm frente a un blanco de H₂O o TE, dependiendo del solvente utilizado en la disolución de ácido nucleico. La concentración de ADN o ARN de la muestra se calculó respecto al valor estándar de $A_{260}=1$ para soluciones con 50 µg/ml de ADN de cadena doble o 40 µg/ml de ARN. La relación A_{260}/A_{280} se utilizó para estimar el grado de pureza de la preparación, de forma que los valores de esta relación por debajo de 1,8 se consideraron indicadores de contaminación por proteínas y/o fenol.

6.2 Digestión de ADN con enzimas de restricción

Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones óptimas para cada enzima indicadas por el fabricante. Las reacciones contenían habitualmente 0,1-5 µg de ADN, 0,1 volúmenes del tampón de restricción correspondiente suministrado por la casa comercial (10 veces concentrado), y 0,5-10 unidades de enzima de restricción en volúmenes finales de 10-30 µl, completados con H₂O bidestilada estéril. Las digestiones de plásmidos se llevaron a cabo incubando la mezcla de reacción durante 2 horas a la temperatura indicada por el fabricante, mientras que las restricciones de ADN total se incubaron durante 12-16 h.

6.3 Defosforilación de ADN con fosfatasa alcalina

Con objeto de aumentar la eficiencia de clonación, se defosforiló el ADN del vector linealizado con fosfatasa alcalina de gamba ártica. Para ello, ADN ya cortado con enzimas de restricción se mezcló con la décima parte del tampón suministrado por el fabricante y 0,1 a 0,5 unidades de fosfatasa alcalina de gamba ártica (USB. Amersham) por cada pmol de extremos de ADN. Tras una incubación a 37°C durante 1 hora, la fosfatasa se inactivó por calor incubando la reacción a 65°C durante 15 min.

6.4 Tratamiento del ADN con el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I

Esta enzima se utiliza para generar extremos romos a partir de extremos 3' recesivos. Partimos de 0,1 a 4 µg de ADN digeridos con sus correspondientes enzimas de restricción, en un volumen final de 20 µl. Se añadió 1 µl de cada dNTP 0,5 mM. Seguidamente se añadió de 1 a 5 unidades del fragmento Klenow de la ADN polimerasa y se incubó a 30°C durante 15 minutos. La reacción se detuvo calentando a 75°C durante 10 minutos.

6.5 Electroforesis de ADN y ARN

La electroforesis de ADN se llevó a cabo según Sambrook *et al.*, (1989), utilizando geles de agarosa preparados en tampón Tris/Acetato/EDTA (TAE) (Tris-base 4,84 g; ácido acético glacial 1,14 ml; EDTA-Na₂ 0,5 M pH 8, 2 ml y agua hasta 1 litro. Este tampón se preparó a partir de una solución 50 veces concentrada y esterilizada en autoclave.). La concentración de agarosa usada variaba entre 0,8-2% (p/v) en función del tamaño de los fragmentos que se deseaba separar. Para cada muestra a analizar se añadió 1µl de tampón de carga (glicerol 30% (v/v), azul de bromofenol 0,3%(p/v) y xilencianol 0,3% (p/v)). Como patrones de peso molecular se usaron los fragmentos de ADN del fago lambda cortado con las enzimas *HindIII* ó *BstEII*, o los marcadores comerciales VIII y X (*Roche Molecular Biochemicals*). La separación se realizó por electroforesis horizontal sumergida a un voltaje de 5-10 V/cm.

Las moléculas de ADN separadas en el gel se tiñeron por inmersión en una solución con bromuro de etidio o GelRed (Biotium, Inc.). Tras lavar con agua para eliminar el exceso de colorante, el ADN se visualizó mediante la exposición del gel a luz ultravioleta (245 nm). Las imágenes se recogieron con una videocámara acoplada a una impresora térmica, utilizando el equipo Gel-Doc de BioRad.

La separación y visualización del ARN total también se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa para comprobar la calidad de las muestras y descartar posible contaminación de ADN genómico. El procedimiento fue el mismo que el descrito para ADN, con las variaciones siguientes: todo el material de electroforesis se enjuagó previamente en SDS 1% (p/v) y se aclaró con una solución autoclavada 1:1000 de DEPC en agua (ver 6.10). El tampón TAE se preparó en una solución autoclavada 1:1000 de DEPC en agua. La concentración de la agarosa en el gel fue de 2% (p/v). Todo el material de vidrio para preparar soluciones se trató previamente con cloroformo para eliminar posibles contaminaciones con ARNasas.

6.6 Recuperación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Para la recuperación de fragmentos de ADN de agarosa se utilizó el sistema comercial “*QUIAEX II Gel Extraction Kit*” (QUIAGEN) o el sistema “*QIAquick Gel Extraction Kit*” (QUIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.7 Ligación de ADN

Para la ligación de moléculas de ADN se partió de fragmentos lineales obtenidos por digestión con enzimas de restricción en sitios compatibles para la ligación. El vector linearizado y el fragmento de ADN obtenidos por digestión con uno o varios enzimas de restricción y purificado (según se indica en el apartado 6.5 y 6.6) se mezclaron en una proporción adecuada y se añadió 0,1 volumen de tampón de ligación (suministrado por el fabricante) y 1 unidad de ADN-ligasa del fago T4 (Roche) en un volumen final de 10-15 μ l completados con agua. También se ligaron fragmentos amplificados por PCR con vectores específicos de clonación de productos de PCR. La mezcla se incubó entre 14 y 16°C durante 2-14 horas, y después se introdujo el ADN recombinante en la cepa adecuada utilizando uno de los métodos descritos en el apartado 5.

6.8 Reacción en cadena con ADN polimerasa (PCR)

La reacción de amplificación en cadena de una región concreta de ADN se llevó a cabo cuando los objetivos perseguidos eran amplificar un fragmento determinado de ADN para su posterior clonación o para comprobar la presencia de un fragmento de ADN determinado. Esta reacción incluía: ADN molde (0,2 ng de ADN cromosómico o 10 pg de ADN plasmídico); tampón que permita el correcto funcionamiento de la Taq polimerasa (KCl 50 mM; MgCl₂ 1,5 mM; Tris-HCl 10 mM pH 9); dNTPs (100-200 μ M de cada uno); oligonucleótidos (100-200 μ M); Taq polimerasa (0,5 U/100 μ l); ajustada hasta un volumen final de 25 a 50 μ l con agua. La reacción de amplificación se desarrolló en un termociclador. Las condiciones estándar fueron las siguientes: en primer lugar, se desnaturizó el ADN a 94°C durante 3 minutos. Seguidamente se llevaron a cabo 20-30 ciclos de amplificación. En cada ciclo se desnaturizó el ADN a 94°C durante 30 segundos, se mantuvo la muestra a una temperatura de hibridación adecuada para los cebadores durante 30 segundos y se amplificó a 72°C, temperatura idónea para el buen funcionamiento de la Taq polimerasa. El tiempo de extensión se ajustó en función del tamaño a amplificar,

teniendo en cuenta que es necesario 1 minuto por cada 2 kb del mismo. Una vez terminados los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 5 minutos. En aquellos casos en los que se diseñaron cebadores que presentaban secuencias adicionales en 5' que no hibridaban con el ADN molde, se llevaron a cabo los 5 ciclos iniciales a una temperatura de hibridación calculada sin incluir tal secuencia, y finalmente se realizaron 25 ciclos a la temperatura de hibridación calculada para el cebador completo. Cuando la reacción estándar no resultó satisfactoria se combinaron distintas modificaciones en la concentración de MgCl₂ (incrementándola a 3 ó 4,5 mM) y/o la presencia de ciertos compuestos en la mezcla de reacción, como por ejemplo glicerol al 10% (v/v) o DMSO al 5% (v/v). Ocasionalmente, el producto obtenido tras la amplificación se purificó utilizando el sistema comercial "QIAquick PCR Purification Kit" (QUIAGEN) para eliminar los cebadores y los dNTPs.

Los oligonucleótidos para PCR y secuenciación se diseñaron con el programa informático *Clone Manager Professional Suite* (Sci Ed Central) y se sintetizaron por la empresa *Sigma Aldrich* (<http://www.sigmaaldrich.com/spain.html>). Se trató siempre de evitar la formación de estructuras secundarias y amplificaciones inespecíficas.

6.8.1 PCR de colonia

Es una estrategia rápida para la comprobación de la presencia de determinados insertos a partir de las colonias en placa. En 25 µl de la mezcla de reactivos de PCR descrita anteriormente se resuspende directamente una colonia de la placa mediante un palillo y agitando dentro de la mezcla.

Tabla 3. Pareja de oligonucleótidos sintéticos utilizados en este trabajo para la amplificación de productos por PCR

Cebador	Secuencia 5' a 3'	Localización relativa/(utilización)	Tamaño esperado
U21 R21	GTTGTAAAACGACGGCCAGTG CAGGAAACAGCTATGACCATG	PCR y secuenciación de fragmentos de ADN clonados en plásmidos que portan el promotor <i>lacZ</i> y derivados	variable
rhLF rhLR	GACGCAGCGCTCAGCGACG AACGCCATCGGCACGACC	Región interna de <i>dbhL</i> / (RT-PCR mutante <i>dbhL</i> y sonda)	411 pb
rhSF rhSR	AGAACAGCGGATCGACGGC GGCCCGGGAGGTGGCCGG	Fragmento que incluye <i>dbhS/orf9</i> / (mutante <i>dbhS</i> y sonda)	584 pb
dctPF dctPR	TCAGCGGATCGCGGTCGATG CGATCCCGCGTTCTTCGGC	Fragmento interno de <i>orf13</i> / (mutante <i>orf13</i> y sonda dctP)	650 pb
mobF mobR	AGAAGAACGGAATCCGCC TCCCGGTGCTGACCAACAAC	Fragmento interno de <i>orf18</i> / (mutante <i>orf18</i> y sonda mob)	819 pb
bqdMF bqdMR	TTGCGCAGCTCCAGCGGATG TCACCTGCTGAACAAGAAC	Fragmento interno de <i>bqdM</i> / (mutante <i>bqdM</i>)	738 pb

sucF	GTGAGCTTGCACACCACCG	Fragmento interno de <i>orf20</i> /	700 pb
sucR	CTTTCTCCGGCCTTGAATTG	(mutante <i>orf20</i>)	
p47kF	ATGAAGACGAGCCGGGTACG	Fragmento interno de <i>orf21</i> /	1010 pb
p47kR	CGGGGAAGCAAAAAACGTC	(mutante <i>orf21</i>)	
bqdLR	GGTCAGGACCATGCTCTAC	Fragmento interno de <i>bqdL</i> /	863 pb
bqdLF	CCGCGCTGATGAACTTGACC	(mutante <i>bqdL</i>)	
3'con5	AAGATGCTGCCGTTGTTC	Secuencia entre el contig 5 (<i>orf15</i>)	819 pb
dctP(7)F	ACTCCGGTGCACAAGATGG	y el contig 7 (<i>orf16</i>) / (PCR y secuenciación)	
orf24secF	AGATCGAGACCGACAAGGCG	Fragmento interno de la <i>orf24</i> /	850 pb
orf24secR	CGAGTTGGGCGTTGATCTGC	(secuenciación)	
RH475f	TATTCGAAGGGCGCGAATTGCG	Región intergénica del gen <i>rhL</i> de	389 pb
Alphaint	ACCTACCTTGCGGCGGGCG	<i>A. anaerobius</i> / (Sonda AT-H y PCR)	
Upsalpha	TGCCAGTCCGTGAACAAC	Fragmento que incluye el gen	2750 pb
Acups	CCGTCCCTTCTTGAGCCAGCG	<i>bqdhL</i> de <i>A. anaerobius</i> / (Sonda PyDHE2 y PCR)	
Pyrend	TGCTAACCGACGAGATCCAG	Fragmento que contiene completo	1679 pb
Pdhups	GATGCAGCCCCAGTTGAGG	el gen <i>bqdhS</i> de <i>A. anaerobius</i> / (PCR)	
18ups	GCCGCCGGGATGGATTTTC	Fragmento que contiene completo	1539 pb
20end	GCCGAAGCCCAGTATCCC	el gen <i>orf13</i> de <i>A. anaerobius</i> /(PCR)	
Pepups	CCGCGCTCCCAGTCCTTG	Fragmento que incluye el gen <i>orf14</i>	1540 pb
AcoR2end	GGAGTTCAATGGCAATGTCCG	de <i>A. anaerobius</i> / (Sonda 20X)	
lysRfamF	ACGCCCTCCTGGATCTGGACGG	Fragmento que incluye el gen <i>orf25</i>	320 pb
lysRfamR	CGAAGGTGCTGTTCTGTCTC	de <i>T. aromatica</i> / (Sonda lysR)	

6.9 Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN se realizó tanto de forma manual como automática. Cuando se llevó a cabo la secuenciación manual se siguieron las instrucciones del sistema comercial “*T7 Sequencing Kit*” (Amersham Pharmacia Biotech) basado en el método de Sanger *et al.*, (1977), usando la ADN polimerasa del fago T7. Como una variación de este sistema se utilizó 4 µl de cebador previamente marcado con 10^5 cpm en su extremo 5' con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP (según se describe en el apartado 7.1), y en la que a la reacción de marcaje se le añadió 16 µM de dATP sin marcar (esta reacción de secuenciación se utilizó como patrón de peso molecular en las determinaciones del origen de transcripción mediante análisis de extensión a partir de cebador). La secuenciación automática se llevó a cabo en el servicio de secuenciación automática del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra del CSIC en Granada, así como en la empresa SECUGEN, S.L. (Madrid).

La secuenciación de los cósmidos de la genoteca de *T. aromatica* AR-1 se llevó a cabo por “*shotgun sequencing*” en la empresa MACROGEN Inc. (Seúl, Corea)

o por pirosecuenciación con el sistema Roche GS FLX en GATC-Biotech (Konstanz, Alemania).

6.10 Extracción de ARN

Para el trabajo con ARN es importante mantener un ambiente libre de ribonucleasas. Para ello, se usaron guantes durante todo el proceso, se trató todo el material de vidrio usado con cloroformo y las soluciones se prepararon en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) (H_2O_{DEPC}). Para la preparación del H_2O_{DEPC} se añadió DEPC al 0,1% (v/v) en agua destilada y se dejó agitando durante 14 a 16 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se autoclavó para destruir el DEPC.

Para la preparación de ARN se recogió un volumen de 40 ml de cultivo de *Thauera* o *Azoarcus*, equivalente a 10 unidades de DO. Los cultivos se recogieron en tubos falcon previamente enfriados en nitrógeno líquido. Los sedimentos celulares obtenidos por centrifugación a 4°C se congelaron a -80°C hasta la extracción del ARN.

Para la extracción de ARN se resuspendió cada sedimento en 2 ml de solución TRI Reagent precalentada a 70°C. Tras mezclar con la pipeta se dividió en dos tubos de 2 ml precalentados a 65°C, y se incubó 10 minutos a esta temperatura. Para eliminar restos celulares se centrifugó 10 minutos a 4°C y 19000 x g en una centrifuga de mesa (MIKRO 22R-). Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de 2 ml. Para la separación de las fases se añadió 100 µl de BCP (bromocloropropano) y se agitó de 15 a 30 segundos con el vórtex. Se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó 15 minutos a 4°C y 19000 x g. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo de 1,5 ml y se añadió un volumen de isopropanol. Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y finalmente se precipitó el ARN centrifugando 8 minutos a 4°C y 12000 x g. El sedimento se lavó con etanol al 70% y una vez seco se resuspendió en 80 µl de H_2O_{DEPC} . A cada una de las muestras se le añadieron 20 µl de una solución de H_2O_{DEPC} que contenía Tris-HCl, pH 7,5, 250 mM, $MgCl_2$ 50 mM, ditiotreitól (DTT) 5 mM, 40 U de inhibidor de ARNasas (*RNaseOUT*, Roche) y 10 U de ADNasa I libre de ARNasas (*DNaseI-RNase free*, Roche). La mezcla de reacción se incubó durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se incrementó el volumen con H_2O_{DEPC} hasta 500 µl y se le añadió el mismo volumen de fenol:cloroformo:isoamil alcohol (25:24:1). Se agitó con el vórtex y se centrifugó 10 minutos a 4°C y 19000 x g. Se recuperó la fase acuosa y se repitió la extracción con un volumen de cloroformo:isoamil alcohol (24:1), para eliminar el fenol residual. Se recogió nuevamente la fase acuosa y se precipitó el ARN añadiendo 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 4,8 y 2 volúmenes de etanol

100%. Se mezcló muy bien y se dejó 30 minutos a -80°C o 12 a 16 horas a -20°C tras lo cual se centrifugó 15 minutos a 4°C y $19000 \times g$. Se lavó el sedimento con 1 ml de etanol 70%, se secó y resuspendió en 100 μl de $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$. La concentración de ARN de la solución resultante se cuantificó espectrofotométricamente según se describe en el apartado 6.1 de esta sección y se comprobó la calidad del ARN obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa según se describe en el apartado 6.5.

6.11 Reacción en cadena con ADN polimerasa acoplada a transcripción reversa (RT-PCR)

Con las muestras de ARN libres de ADN (según apartado 6.11) se llevaron a cabo reacciones de amplificación utilizando el kit “*Titan One Tube RT-PCR System*” (Roche *Molecular Biochemicals*) con los oligonucleótidos adecuados para cada caso (Tabla 4A y B). La transcripción reversa se realizó incubando las muestras a 50°C durante 30-40 minutos. Las condiciones estándar de la reacción de amplificación posterior fueron las siguientes: tras una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, se realizaron 30 ciclos en las condiciones siguientes: 94°C , 30 s; $55-65^{\circ}\text{C}$, 30 s; 68°C , 30 s y finalmente se realizó una extensión a 68°C durante 5 minutos. La temperatura de hibridación se modificó en función de los cebadores utilizados. Todos los ensayos se realizaron con sus correspondientes controles negativos, que carecían de la retrotranscriptasa inversa, además de un control positivo de la PCR usando como molde ADN genómico. Los productos de RT-PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa-TAE 1,5-2% (p/v) como se indica en el apartado 6.5.

Tabla 4A. Parejas de oligonucleótidos sintéticos utilizados en este trabajo para la amplificación de productos por RT-PCR a partir de ARN de *T. aromatica* AR-1

Cebador	Secuencia 5' a 3'	Localización relativa (utilización)	Tamaño esperado
rt-korA_3'	AACAGAGCCACGGCGCCAG	Región intergénica <i>orf5/orf6</i>	350 pb
rt-korB_5'	CGAACACGTTGGTGTAGGCG	(1)*	
rt-korB_3'	GAAGGCCAGCGTCGATTCCG	Región intergénica <i>orf6/dhbL</i>	580 pb
rt-rhL_5'	GTGCGCATCTGCACGGTGAG	(2)*	
rt-rhL_3'	CGTCAATCAGCTCACGCCG	Región intergénica <i>dhbL/dhbS</i>	277 pb
rt-rhS_5'	GGCCGAGCTTGCCATTTC	(3)*	
rhSF	AGAACAGCGGATCGACGGC	Fragmento que incluye	584 pb
rhSR	GGCCCGGGAGGTGGCCGG	<i>dhbS/orf9</i> (4)*	
rt-rhS_3'	TTCGCCATGGAAGTGAAG	Región intergénica <i>dhbS/orf9</i>	160 pb
rt-cup_5'	GCACGGTCGAGACGAGCTTG	(5)*	
rt-cup_3'	TCGATCCGCTGTTCTACTTC	Región intergénica <i>orf9/orf10</i>	380 pb
rt-hyp_5'	TGACGTCGTAGTCCTTGCCG	(6)*	

rt-hyp_3'	TCCCTCAACGGCAAGGACTAC	Región intergénica <i>orf10/orf11</i>	448 pb
rt-deh_5'	TGCCCATCGCCAGATGGACG	(7)*	
rt-deh_3'	GATCGCCGACGAGACCTATG	Región intergénica <i>orf11/orf12</i>	396 pb
rt-m24_5'	GGATAGTCGATGCCGAGTTC	(8)*	
rt-m24_3'	AAGTGGTGGTGACGAAGGAC	Región intergénica <i>orf12/orf13</i>	329 pb
rt-dctP_5'	CCGTCCTCGTATAGATGTG	(10)*	
m24F	GGAACCTCGGCATCGACTATC	Fragmento interno de la <i>orf12</i>	450 pb
m24R	TGCTGGCCATCGACCACCTC	(9)*	
rt-dctP_3'	TGCGCAAGCAGTTCATCGAC	Región intergénica <i>orf13/orf14</i>	259 pb
rt-smallper_5'	GGCGCCATGAGGACGTAGC	(11)*	
rt-smallper_3'	CCACCAGGCCGTGCAGTCG	Región intergénica <i>orf14/orf15</i>	236 pb
rt-dctM_5'	AAGCGGAATGGCGAGGAACC	(12)*	
rt-esr_5'	CTTGATGATCTTCTGCGG	Región intergénica <i>orf17/orf16</i>	330 pb
rt-αβhyd_3'	TGGTGCCGATCGAAGACAGC	(13)*	
rt-mob_3'	ACAACCAGCCGCCCTAC	Región intergénica <i>orf18/orf19</i>	167 pb
rt-bqdhM_5'	TCATAGCTGTTGTTGTCG	(14)*	
rt-bqdhM_3'	AAGCCGAGCTGATCGCCAC	Región intergénica <i>orf19/orf20</i>	338 pb
rt-suc_5'	AGGTCGGGATCGGTCAATTC	(15)*	
rt-suc_3'	TTCTACACCTGCGACCTGG	Región intergénica <i>orf20/orf21</i>	515 pb
rt-p47k_5'	GCAGCACACGCAACCGTTGG	(16)*	
rt-p47k_3'	TCGACATCGAGCAGGACGAG	Región intergénica <i>orf21/orf22</i>	495 pb
rt-bqdhL-5'	TCGAGATGGGCGAGGCACTTG	(17)*	
rt-bqdhL_3'	ACAGCGTGCGCAAGACCAAC	Región intergénica <i>orf22/orf23</i>	400 pb
rt-hyprot_5'	CCGATCACCTCGACGAAG	(18)*	
rt-hyprot_3'	CCAGACCTGGGTCTATTTCC	Región intergénica <i>orf23/orf24</i>	338 pb
rt-pydh_5'	CAGGATCTTGCCGAGAATGC	(19)*	
rt-pydh_3'	TGTCCGGTCGATCATCGCGTG	Región intergénica <i>orf24/orf25</i>	289 pb
rt-lysR_5'	TTTTCGTCACCGACGACTGC	(20)*	
rt-lysR_3'	GATGCCGGCGTGGAACATCG	Región intergénica <i>orf25/orf26</i>	430 pb
rt-Zaldeh_5'	TCGCGTCGCTCGGATTGACC	(21)*	

(*)El número se corresponde con la reacción de RT-PCR indicado en la figura 60 del Capítulo III de Resultados.

Tabla 4B. Oligonucleótidos sintéticos utilizados en este trabajo para la amplificación de productos por RT-PCR a partir de ARN de *A. anaerobius*

Cebador	Secuencia 5' a 3'	Localización relativa (utilización)	Tamaño esperado
Reg4 ups	ATTGATCGCCGCTTCCTTTGC	Región intergénica <i>orf4/orf5</i>	589 pb
Cuatroend	CTGGTGGCAAAGGGTACGAAC	(A)*	
Cuatroaups	CCGACTATCCGAACCTCTC	Región intergénica <i>orf5/orf6</i>	333 pb
GSTend	GCCGACTATCCGAACCTCTC	(B)*	
GSTups	TGCCATACACCCGATTCAGG	Región intergénica <i>orf6/rhS</i>	316 pb
bethaend	CACATCGTCGGGCGGTAGGC	(C)*	
Bethaups	CACATCGTCGGGCGGTAGGC	Región intergénica <i>rhS/rhL</i>	420 pb
Alphaend	GCAACAGCAAGGCACCGAGG	(D)*	
Pyrend	TGCTAACCGACGAGATCCAG	Región intergénica	317 pb
Acups	CCGTCTTCTTGAGCCAGCG	<i>bqdhL/bqdhS</i> (E)*	
Acend	ATCCTGGCGGTCCGGCACGG	Región intergénica	338 pb
PDHups	GATGCAGCCCCAGTTGAGG	<i>bqdhS/bqdhM</i> (F)*	
PDHend	CCGTGTTCCCGCATCCGAC	Región intergénica	368 pb
AcoR1ups	CCAGGATGAAGCCCGTGCC	<i>bqdhM/redR1</i> (G)*	

THlups	CACATTGGGTGCGCCGAAGTAG	Región intergénica <i>orf8/orf9</i>	257 pb
13end	CCATTTGCGCCGCTGCTTTTCG	(H)*	
13ups	GGAACAGGGGTGGCAGGAC	Región intergénica <i>orf9/orf10</i>	312 pb
Cobend	CTCGTCCACAGCCTTTCATG	(I)*	
Cobups	GATCACGACGGTGCCCTTC	Región intergénica <i>orf10/orf11</i>	213 pb
15end	CATCGTGGCATTGGTCATCTAC	(J)*	
15ups	GCCGCCGCTCCATGATC	Región intergénica <i>orf11/orf12</i>	238 pb
Gabend	AAGGGTCGAAGTACGGCATC	(K)*	
Gabups	GTTGCGACTCACCGTTGTC	Región intergénica <i>orf12/btdhL</i>	230 pb
17end	CGCTCGCCGAGTGTCGC	(L)*	
BtdhL end	AGATTAGCGGCCATCGGCCGTACCC	Región intergénica	450 pb
BtdhS end	ATGGCGCAGTGCTGCTCCGCATC	<i>btdhL/btdhS</i> (M)*	
17ups	TGCCGTTGAGGTTCCACAGC	Región intergénica <i>btdhS/cup</i>	410 pb
18end	GCGGGCAGTCCCTAAAGATG	(N)*	
18ups	GCCGCCGGGATGGATTTTC	Región intergénica <i>cup/orf13</i>	254 pb
Pepend	AGGAGGAGGTGGTGGTGAC	(O)*	
Pepups	CCGCGCTCCCAGTCCTTG	Región intergénica <i>orf13/orf14</i>	199 pb
20end	GCCGAAGCCCAGTATCCC	(P)*	
20x	GAGATGTACTGGCACATCGG	Región intergénica	404 pb
AcoR2end	GGAGTTCAATGGCAATGTGC	<i>orf14/redR2</i> (Q)*	

(*)La letra se corresponde con la reacción de RT-PCR indicada en la figura 21 del Capítulo I de Resultados.

6.12 Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente a tiempo real (PCR a tiempo real)

La variación en la expresión de algunos genes estudiados en distintas condiciones se determinó mediante la cuantificación del ARN mensajero (ARNm) por PCR a tiempo real. Este sistema permite seguir la síntesis de doble cadena de ADN mediante un lector óptico que mide la fluorescencia de compuestos, como el SYBR⁶ Green, presentes en la mezcla de reacción. La intensidad de fluorescencia de este compuesto es hasta 100 veces superior cuando se une a ácidos nucleicos de doble cadena. La reacción de amplificación puede ser representada, por tanto, como una curva de intensidad de emisión del fluoróforo con respecto a los ciclos de amplificación. Dicha curva tiene una tendencia exponencial, de manera que el ciclo en que el aumento en intensidad de luz entra en fase exponencial depende de la cantidad de ADN inicial (a este ciclo se denomina “ciclo de transferencia, C_t”). Así, a menor cantidad de ADN molde inicial, mayor es el número de ciclos necesarios para entrar en dicha fase exponencial.

6.12.1 Síntesis de ADNc

En primer lugar para confirmar la especificidad de los cebadores a emplear en el análisis se llevó a cabo una RT-PCR (apartado 6.11) con las muestras de ARN a utilizar, en la que se obtuvo una única banda de amplificación. Paralelamente, se comprobó que las muestras de ARN no contenían contaminaciones de ADN mediante PCR (apartado 6.8).

Para la síntesis de ADN complementario a partir de ARN total, extraído como se describe en el apartado 6.10, se empleó *SuperScript II Reverse Transcriptase* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de ensayo contenía: de 1 ng a 5 µg de ARN total, 250 ng de cebadores aleatorios (*random primers*) y 1 µl de dNTPs Mix (10 mM de cada dNTP). El volumen se completó hasta 12 µl con agua destilada. Se calentó la mezcla a 65°C durante 5 minutos y se enfrió en hielo. Se añadió 4 µl de tampón de *SSII RT* concentrado 5 veces (Tris-HCl 250 mM, pH 8,3; KCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM), 2 µl de DTT (0,1M) ,1 µl de *RNaseOUT* 40 U/µl (Roche) y se incubó a 25°C durante 2 minutos. Finalmente se añadió 1µl de *SuperScript II RT* y se incubó a 25°C durante 10 minutos. La reacción de transcripción reversa tuvo lugar a 42°C durante 50 minutos y se inactivó por calentamiento a 70°C durante 15 minutos. El ADNc obtenido de este modo se usó como molde para la reacción de amplificación a tiempo real.

6.12.2 Cálculo de la eficiencia de la PCR a tiempo real

Un requisito previo a la PCR a tiempo real es que la eficiencia de la reacción de PCR sea del 100% ($e=1$), lo cual nos indica que la reacción ha ocurrido correctamente y en óptimas condiciones. Por tanto, antes de empezar la PCR a tiempo real es necesario calcular la eficiencia de la reacción, que puede calcularse a partir de la regresión del C_t (ciclo umbral) frente al logaritmo de la cantidad inicial de ADN. Esta regresión lineal e inversa viene definida por la siguiente ecuación:

$$ct = a \cdot \log DNA_i + b$$

Y la eficiencia de la reacción viene definida por la siguiente fórmula:

$$e = 10^{-1/a} - 1$$

En el caso de que esta cantidad inicial sea desconocida, puede hacerse la regresión frente a una serie de diluciones de una muestra determinada. Si no es así, hay que ajustar el protocolo de reacción y diluciones del ADNc hasta conseguir eficiencias en torno al 100%. Hay que comprobar igualmente que todas las parejas de cebadores que se van a emplear para comparar expresión génica tengan eficiencias similares.

6.12.3 Cuantificación de ADNc en PCR a tiempo real

Se puede comparar la diferencia de expresión de un gen en distintas condiciones comparando el número de ciclos requeridos para llegar al C_t de las muestras de ADNc obtenidas en cada una de las condiciones a comparar. Para normalizar los resultados, se usa como control interno la amplificación del ADNc de un gen cuya expresión sea constitutiva, como por ejemplo el ARN ribosómico 16S, usado en esta tesis doctoral.

La mezcla de reacción de la PCR incluía: 5 μ l de tampón PCR (Tris-HCl (pH 8,4) 200 mM; KCl 500 mM), 1,5 μ l de MgCl 50 mM, 1 μ l de dNTPs 10 mM, 1 μ l de cada uno de los cebadores (Tabla 5), 2 U de *Taq* (*Platinum^R*, *Invitrogen*), 2 μ l de la dilución de ADNc y agua destilada hasta completar 50 μ l.

Tabla 5: Oligonucleótidos complementarios a secuencias de *A. anaerobius* utilizados en la PCR a tiempo real.

Cebador	Secuencia 5' a 3'	Localización relativa	Tamaño esperado
2q_rhLF 2q_rhLR	ATACCAGCGCATCGAGAC AAGTTGCGCCGACATCATC	Región génica de <i>rhL</i>	375 pb
q_bqdhLF q_bqdhLR	ACGCCTGGTCGAAGGTGAA CACGGCATCGACGAACCTTTAC	Región génica de <i>bqdhL</i>	175 pb
q_orf14F q_orf14R	AATGTAGTCGCACCCGAGTT TACTGACGAATACGGCGGCA	Región génica de <i>orf14</i>	199 pb
F357 530R	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG CCGCGGCTGCTGGCAC	Región génica de ADNr16S	193 pb

Para la PCR a tiempo real se usó el sistema “*iCycler iQ real-time PCR detection system*” (Bio-Rad). Para la reacción se usó la mezcla comercial *iQ β SYBR[®] Green Supermix* (Bio-Rad), que contiene el fluoróforo así como la polimerasa de ADN. Las reacciones se realizaron en placas de 96 pocillos donde se colocaron las muestras por duplicado o triplicado, incluyendo además diluciones de cada muestra de ADNc para optimizar la medida. En el caso del ARN 16S, se emplearon diluciones mayores

(hasta 1/1000) del ADNc. Se añadieron además controles de mezcla de reactivo sin ADNc. El programa de amplificación fue: 5 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de 10 s a 95°C, 30 s a 55°C y 30s a 72°C. Se analizó la curva de disgregación para comprobar que no se produjeron amplificaciones inespecíficas durante la reacción. Las cuantificaciones de diferencia de expresión se determinaron estadísticamente según el método 2(-Delta Delta C(T)) (Livak and Schmittgen, 2001).

7. EXTENSIÓN REVERSA A PARTIR DE CEBADOR

Esta técnica se utilizó para identificar el punto de inicio de la transcripción de distintos genes, y para determinar su nivel de expresión en distintas condiciones.

7.1 Marcaje de cebadores

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores se marcaron por fosforilación en su extremo 5' con [γ -³²P] ATP. Cada reacción contenía en un volumen final de 10 μ l: 1 μ l del tampón de la enzima polinucleótido quinasa concentrado 10 veces (Tris 0,5 M pH 7,6; MgCl₂ 0,1M; DTT 50 mM; espermidina 1 mM; EDTA 1 mM), 10 pmol de oligonucleótido (Tabla 6), 1 μ l de [γ -³²P] ATP (6000 mCi/mmol) y 1 U de la enzima polinucleótido quinasa del fago T4. Las mezclas de reacción se incubaron durante una hora a 37°C y 10 minutos a 70°C para la inactivación de la quinasa. El exceso de [γ -³²P] ATP se eliminó por filtración a través de una columna comercial con gel de poliacrilamida en Tris 10 mM pH 7,4 ("Micro Bio-Spin 6 Column Tris", BIO-RAD) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 6. Oligonucleótidos empleados para la extensión a partir de cebador

Cebador	Secuencia 5' a 3'	Localización relativa	Distancia hasta la +1
priAlfa90	CATCATTTCTGATTTGGTC	Región 5' de <i>rhL</i> de <i>A. anaerobius</i>	93/72 nt
priextAlfa	ACAGTTGCGCCGCTTCATCT	Región 5' de <i>rhL</i> de <i>A. anaerobius</i>	224/203 nt
priPyr90	AATCCTTGGCCTCCTCG	Región 5' de <i>bqdhL</i> de <i>A. anaerobius</i>	94 nt
priextPyr	CACGCGCAGCAGTTCTGTCT	Región 5' de <i>bqdhL</i> de <i>A. anaerobius</i>	184 nt
pri20(90)	CCACGAAGTTTCGATGG	Región 5' de <i>orf14</i> de <i>A. anaerobius</i>	102 nt
20X	GAGATGTACTGGCACATCGG	Región 5' de <i>orf14</i> de <i>A. anaerobius</i>	153 nt
primob	AACAGCTTGATTCATCGC	Región 5' de <i>orf18</i> de <i>T. aromatica</i> AR-1	94 nt
rt-rhL5'	TGTCGTCGAACCTCGATCGGC	Región 5' de <i>dbhL</i> de <i>T. aromatica</i> AR-1	189 nt
rt-suc5'	AGGTCGGGATCGGTCAATTC	Región 5' de <i>orf20</i> de <i>T. aromatica</i> AR-1	119 nt

7.2 Reacción de extensión

Los cebadores complementarios a las cadenas de ARN utilizados hibridan con secuencias próximas al extremo 5' de los ARNm de los genes de estudio, generalmente dentro de la región codificante (Tabla 6). Para la hibridación de los oligonucleótidos marcados con las cadenas de ARN se mezclaron 4 µl de tampón de hibridación (NaCl, 2 M y piperacina-N-N'-bis (2-etanosulfonato) (PIPES) 50 mM; pH 7), 1,5 µl del oligonucleótido marcado y 10-30 µg de ARN total en un volumen final de 20 µl. La mezcla se incubó a 85°C durante 5 min en termobloque y se dejó enfriar hasta 42°C. La reacción de extensión se realizó añadiendo 30 µl de una reacción que contenía 10µl de tampón de transcriptasa reversa concentrado 5 veces (Tris-HCl 250 mM pH 8,5; MgCl₂ 40 mM; KCl 150 mM; ditiotreititol 5 mM), 1 mM de cada uno de los cuatro desoxinucleótidos, 20 U de RNasa-OUT (Roche) y 7 U de transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis de ave (AMV) (Roche). La mezcla se incubó a 42°C durante 1 h. Para la eliminación del ARN después de la reacción de extensión se incubó la mezcla con 1 µl de RNasa DNasa free (500 µg/ml) (Roche) durante 15 min a 60°C. La reacción se detuvo mediante la adición de 5 µl de acetato sodico 3 M, pH 4,8 y 150 µl de etanol.

7.3 Separación de las cadenas extendidas de ADNc mediante electroforesis en gel desnaturizante

Los productos de las reacciones obtenidas en el apartado 7.2 se precipitaron por centrifugación a 12000 x g durante 15 min, se lavaron con etanol 70% y se resuspendieron en 4 µl de Tris-EDTA (TE) (Tris-HCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM) y 2 µl de tampón de carga con formamida (98%). Las muestras se desnaturalizaron a 90°C durante 4 minutos y se enfriaron en hielo antes de su separación por electroforesis.

La separación de las cadenas de ADNc de distinta longitud se llevó a cabo mediante electroforesis desnaturizante (42% de urea) en geles de poliacrilamida al 6,5% (p/v) en TBE (Tris-base 89 mM pH 8; ácido bórico 89 mM; EDTA-Na₂ 2 mM). Para catalizar la polimerización de la acrilamida se añadieron a una solución de 50 ml de poliacrilamida 6,5%, 250 µl de persulfato de amonio (APS) 10% (p/v) y 75 µl de tetrametiletilendiamina (TEMED). La electroforesis se realizó a potencia fija entre 30 y 40 W con un voltaje variable entre 1500 y 2000 V. Una vez finalizada la separación, el gel se transfirió a un papel de filtro Whatman 3 MM, se cubrió con papel de plástico transparente y se secó al vacío en un secador Bio-Rad a 80°C durante 30 minutos. La

radiactividad acumulada en el gel se cuantificó con un Molecular Imager model GS-525 (Bio-Rad).

8. CONSTRUCCIÓN DE GENOTECA EN CÓSMIDO DE *Thauera aromatica* AR-1

8.1 Restricciones parciales de ADN y ligación

El ADN cromosómico de *T. aromatica* AR-1 obtenido como se indica en el apartado 4.2 se digirió parcialmente con la enzima *Pst*I en las condiciones óptimas para obtener una mayoría de fragmentos de 20-25 Kb. Para ello, 11 µg de ADN cromosómico se digirieron con 0,9 U de *Pst*I en un volumen final de 200 µl. Las condiciones de digestión fueron de 30 minutos a 37°C, la reacción se detuvo calentando 20 minutos a 80°C. Posteriormente se precipitó el ADN total con etanol en presencia de sales y se resuspendió en 15 µl de agua MilliQ para obtener una concentración final de 733 ng/µl. Una fracción alícuota de 1,5 µg de este ADN se ligó con 660 ng de cósmido pLAFR3 linearizado con *Pst*I y defosforilado, con 1 U de T4 ligasa (Roche), en un volumen final de 6 µl.

8.2 Empaquetamiento de cósmidos

El resultante de esta ligación fue el sustrato utilizado en la reacción que se llevó a cabo con el extracto de empaquetamiento de Stratagene (Gigapack III XL *packaging extract*, Stratagene). El ADN recombinante se empaquetó siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante. El vial de partículas del fago se descongeló, se le añadieron 3 µl de la mezcla de ligación y se incubó 3 horas a temperatura ambiente (22°C), tras lo cual se le añadieron 500 µl de tampón de dilución de fagos SM (580 mg de NaCl; 200 mg de MgSO₄·7H₂O; 5 ml de TrisHCl 1 M, pH 7,5; 500 µl de gelatina 2% (p/v), se completa hasta 100 ml con H₂O destilada y se esteriliza en el autoclave), 20 µl de cloroformo, se mezcló varias veces y se centrifugó 10 segundos a velocidad máxima para eliminar desechos. El sobrenadante se pasó a un tubo limpio, que se guardó a 4°C hasta su utilización.

8.3 Preparación de células transfectantes de *E. coli* HB101 y su transfección

Un volumen de 25 ml de medio TB (Pipes 10 mM pH 6,7; CaCl₂ 45 mM; KCl 250 mM; MnCl₂ 55 mM), suplementado con MgSO₄ 10 mM y con maltosa al 0,2% (p/v) se inoculó con *E. coli* HB101 y se incubó durante unas 14 horas a 37°C en

agitación. Las células se recogieron por centrifugación a 4°C, 1500 x g durante 15 min y se resuspendieron en 12,5 ml de MgSO₄ 10 mM estéril. La suspensión celular se diluyó en la misma solución hasta una DO_{600nm} de 0,5 y se conservó a 4°C hasta su utilización.

En primer lugar se tituló la reacción de empaquetamiento. Para ello, se prepararon 4 tubos con 200 µl de células (DO_{600nm} de 0,5), se añadieron distintos volúmenes del empaquetamiento (0, 0,5, 1 y 5 µl) y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadió a cada tubo 1 ml de LB y se incubó 1 h a 37°C. Después, se sembró todo en placas de LB con Tc y se incubó 12 horas a 37°C. Al día siguiente se procedió al recuento y se obtuvo un rendimiento de 25 colonias por 1µl de empaquetamiento.

Para obtener la genoteca, a 4,5 ml de la suspensión celular inicial en MgSO₄ 10 mM se añadió el volumen completo de la reacción de empaquetamiento (500 µl) descrito en la sección anterior y se incubó 30 min a temperatura ambiente. Tras completar el volumen hasta 25 ml con LB e incubar 1 hora a 37°C, las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 2 ml de LB. Para la selección de células transfectantes se sembraron volúmenes de 100 µl en un total de 20 placas de LB sólido con tetraciclina. El número de células portadoras de plásmidos recombinantes fue de aproximadamente 2700, lo que nos da una cobertura de más de 10 equivalentes de genoma de *T. aromatica* AR-1 y una probabilidad de encontrar un gen determinado de más del 99%. Se conservó, cada uno de los clones individuales en LB con 40% (p/v) de glicerol en placas multipocillos a -80°C. También se conservó en masa mediante la recogida de todos los clones del medio sólido con 2 ml de LB, que se centrifugó a 3500 x g durante 15 minutos y finalmente se resuspendió en 16 ml de LB con glicerol 40% (p/v). La genoteca así obtenida se conservó a -80°C en alícuotas de 2 ml.

9. TRANSFERENCIA DE ADN A MEMBRANA POR EL MÉTODO DE “SOUTHERN BLOT” E HIBRIDACIÓN

9.1 Transferencia de ADN

9.1.1 Transferencia de ADN por capilaridad

Las muestras de ADN cromosómico y plasmídico digeridas con enzimas de restricción (apartado 6.2) se separaron en geles de agarosa (apartado 6.5) y se

transfirieron a membranas de nailon de 0,45 μm de diámetro de poro cargadas positivamente (Roche), siguiendo el protocolo de transferencia alcalina (Reed and Mann, 1985).

Después de la electroforesis (apartado 6,5), el gel se sumergió en una solución 0,25 N de HCl durante 15 minutos hasta que se produjo el viraje del frente de azul de bromofenol de azul a amarillo. Este tratamiento ácido permite fragmentar el ADN y depurarlo, lo que facilita la transferencia. Posteriormente el ADN se desnaturalizó introduciendo el gel en una solución de NaOH 0,5 M, hasta que se observó de nuevo el viraje del indicador de amarillo a azul.

Sobre un cristal, se colocó una tira de papel Whatman 3 MM, del mismo ancho que el gel, de manera que los extremos quedasen sumergidos en la solución de transferencia (NaOH 0,5 M), colocada en un reservorio inferior. Sobre el papel se colocó el gel en posición invertida y sobre éste la membrana, sobre la cual se depositaron tres tiras de papel Whatman 3 MM, abundante papel absorbente y un peso de aproximadamente 0,5 Kg. La transferencia total del ADN del gel a la membrana se llevó a cabo durante 12 a 16 h.

Para la fijación del ADN a la membrana de nailon, esta se expuso a luz UV durante 3 minutos y se conservó seca a temperatura ambiente y sellada en bolsas de plástico hasta su utilización.

9.1.2 Transferencia de ADN para hibridación en colonias

Se empleó esta técnica para la detección de los clones positivos en los sucesivos rastreos de la genoteca de *T. aromatica* AR-1. Para ello, se puso una membrana de nitrocelulosa sobre cada placa de medio sólido LB y sobre ésta se picaron las colonias de los distintos clones de la genoteca. Después de incubar 12 horas a 37°C, se lavaron las membranas durante 3 minutos en SDS 10% (p/v) para lisar las colonias, se sumergieron en una solución de NaOH 0,5 N y NaCl 1,5 M durante 5 minutos para la desnaturalización del ADN, luego se pasaron a una solución de TrisHCl 0,5 M pH 7,5 y NaCl 1,5 M durante 5 minutos para la neutralización y finalmente se pasaron por una solución de 2XSSC (NaCl 300 mM; Na-citrato 30 mM; pH 7) durante 5 minutos para equilibrarlas. Posteriormente se secó la membrana y se fijó el ADN exponiéndola a luz UV durante 3 minutos. La membrana seca se conservó a temperatura ambiente hasta su hibridación.

9.2 Marcaje no radiactivo de ADN lineal

El marcaje de las sondas se hizo por PCR utilizando “digoxigenina-11dUTP” (Roche), que provoca una incorporación múltiple de dUTP marcado que puede ser usado como sustrato por la Taq polimerasa, reemplazando al dTTP durante la reacción en cadena de la polimerasa. La mezcla de reacción contenía: ADN molde, 0,05-1 µg; cebador 25 pmoles; tampón Taq ADN-polimerasa (KCl 50 mM; MgCl₂ 1,5 mM; Tris-HCl 10 mM, pH 9) 5 µl; dNTPs: 0,2 mM de dATP, dCTP y dGTP; 0,18 mM de dTTP y 0,02 mM de dig-dUTP; Taq ADN-polimerasa 1,2 U y agua hasta 50 µl.

9.3 Prehibridación e hibridación

La membrana obtenida en el apartado 9.1 se introdujo en un tubo de hibridación y se incubó en un horno de hibridación con 10 ml de solución de hibridación (0,25 g de agente bloqueante; 12,5 ml de 20xSSC (NaCl, 3M; Na-citrato, 0,3M, pH 7); 1 ml de N-lauroylsarcosine (5%); 100 µl de SDS (10%) y agua hasta 50 ml) durante 1 ó 2 horas a 65°C. Posteriormente se eliminaron los 10 ml de solución de hibridación y se añadieron 5 ml de solución de hibridación fresca conteniendo la sonda marcada obtenida en el apartado 9.2 y desnaturalizada previamente a 95°C durante 5 minutos. La membrana se incubó en esta solución a 65°C durante 12 a 16 horas en horno de hibridación.

El lavado de las membranas se realizó en las siguientes condiciones de fuerza iónica y temperatura: dos lavados de 5 minutos a temperatura ambiente en 2xSSC seguidos de otros dos lavados de 15 minutos a 65°C en 0,1xSSC. Para las hibridaciones con sondas heterólogas se emplearon condiciones de hibridación relajadas, disminuyendo la concentración de SSC y la temperatura. En este caso, se hicieron dos lavados de 15 minutos a temperatura ambiente, uno en 1xSSC y otro en 0,2xSSC.

9.4 Detección

La detección se realizó utilizando los reactivos de Roche, siguiendo las indicaciones del fabricante. Después de la hibridación, todos los lavados se hicieron a temperatura ambiente. Se lavó la membrana durante 1 minuto con Tampón 1 (Tris HCl 100 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM) y posteriormente se incubó 30 minutos con unos 100 ml de Tampón 2 (solución bloqueante 0,5% (p/v) en tampón 1), seguido de un lavado

de un minuto con Tampón 1. Luego se incubó con la solución colorante (anticuerpo anti-digoxigenina-fostatasa alcalina conjugado, preparado en 20 ml de tampón-1 a concentración final de 150 mU/ml) durante 30 minutos. Posteriormente, se realizaron dos lavados de 15 minutos con 100 ml de tampón 1 para eliminar el anticuerpo no unido. A continuación, la membrana se equilibró con 20 ml de solución tampón 3 (Tris HCl, 100 mM; NaCl, 100 mM; pH 9,5) durante 2 minutos y finalmente se incubó con 10 ml de la solución colorante (45 µl de solución de azul de nitrotetrazolio (NBT), 35 µl de solución de 5-bromo-4-cloro-3-indolifosfato y tampón 3 hasta 10 ml) durante 1 a 20 horas en oscuridad. La reacción se detuvo lavando con 50 ml de TE durante 5 minutos.

9.5 Reutilización de las membranas

En la mayoría de los casos, las membranas se reutilizaron varias veces para hibridar con varias sondas. En estos casos, era imprescindible la eliminación de la tinción y de la sonda. Para ello, se siguieron los siguientes pasos: en primer lugar se incubó la membrana en dimetilformamida precalentada a 50-60°C hasta que desapareció el colorante, por lo que fue necesario realizar varios lavados con dimetilformamida caliente. Posteriormente se lavó con agua destilada, seguido de dos lavados de 20 minutos a 37°C con NaOH 0,2 M, SDS 0,1% (p/v) para eliminar la sonda unida a la membrana. Finalmente se lavó con 2XSSC y se dejó secar al aire.

10. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES

10.1 Mutagénesis dirigida utilizando pCHESIΩkM

Para la construcción de mutantes se utilizó el plásmido pCHESIΩkM (Tabla 2) y el método descrito por Llamas y colaboradores (2003). Mediante PCR (apartado 6.8) se amplificó un fragmento interno del gen a mutar utilizando la pareja adecuada de cebadores (Tabla 3), preferiblemente mayor de 500 pb, que se clonó en el vector pMBLT (Tabla 2). Mediante restricción con las enzimas *EcoRI* y *SacI* se escindió el fragmento clonado que se clonó posteriormente en pCHESIΩkM cortado con las mismas enzimas (según se describe en el apartado 6). Este plásmido se transfirió a la cepa *E. coli* CC118 λpir y desde aquí, mediante conjugación triparental se transfirió a la cepa receptora *T. aromatica* AR-1 (apartado 5.1). Los transconjugantes se seleccionaron en medio selectivo para la cepa *T. aromatica* AR-1, medio mínimo widdel con succinato 5 mM como fuente de carbono y kanamicina. Puesto que

pCHESIΩKm no puede replicar en *Thauera*, los transconjugantes resistentes a Km aparecían cuando se producía una recombinación homóloga entre el gen a mutar en el cromosoma y el fragmento portado por el plásmido, lo que conduce a la formación de un cointegrado. Este cointegrado posee dos copias truncadas del gen deseado, y por tanto es un clon mutante en este gen. Los clones obtenidos se analizaron mediante PCR y posterior hibridación de ADN.

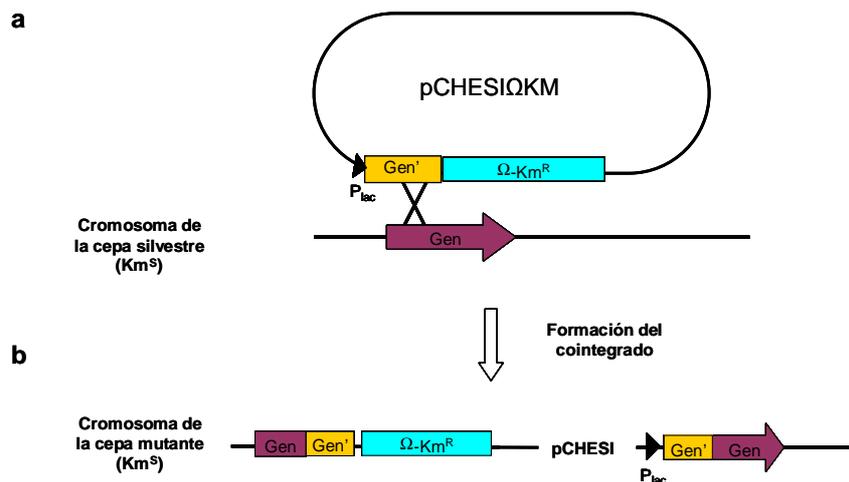


Figura 20. Esquema representativo de mutagénesis por inserción mediante el plásmido pCHESIΩKm. Un fragmento interno del gen que se ha clonado en el plásmido y se transfiere a *T. aromatica* AR-1 donde se produce el fenómeno de recombinación homóloga (a). El cointegrado resultante posee el gen interrumpido por el plásmido y por tanto es mutante en ese gen (b) (Llamas et al., 2003).

10.2 Mutagénesis al azar utilizando pUT-Km

Para la construcción de mutantes en el cósmido R+ de *A. anaerobius* se utilizó la técnica de mutagénesis al azar empleando el plásmido pUT-Km (de Lorenzo et al., 1990) en dos rondas de conjugación. En la 1ª se utilizó la cepa receptora *E. coli* HB101 portadora del cósmido R+ (Tc^R) como cepa receptora, como cepa colaboradora *E. coli* HB101 (pRK600) y *E. coli* CC118λ (pUT-Km) como cepa donadora. Después de 4 h de conjugación, los transconjugantes se seleccionaron en medio LB Tc^R y Km^R. De esta forma se seleccionaron los transconjugantes portadores del minitransposón insertado en el cromosoma de la cepa receptora o en el cósmido R+. Para poder seleccionar los cósmidos mutantes se realizó una 2ª ronda de conjugación en la que se empleó como cepa receptora *Azoarcus* sp. CIB, la cepa colaboradora *E. coli* HB101 (pRK600) y como donador se empleó el conjunto de los transconjugantes seleccionados en la primera ronda. La selección de los transconjugantes se hizo en medio mínimo con succinato más Tc y Km; de esta forma se seleccionaron cepas de

Azoarcus sp. CIB portadoras del cósmido R+ (Tc^R) que habían incorporado en mini-Tn5 (Km^R). El sitio de inserción del transposón en cada mutante se identificó primero por análisis de restricción y Southern blot, y posteriormente se amplificó la región mutada para secuenciar el punto de inserción del mini Tn5.

11. ENSAYOS ENZIMÁTICOS

11.1 Preparación de extracto celular de *T. aromatica* AR-1

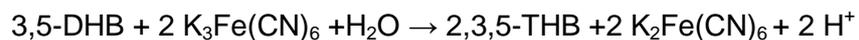
Todos los pasos para la preparación del extracto celular se llevaron a cabo manteniendo condiciones anaeróbicas. Los cultivos se manipularon en campana de anaerobiosis y se mantuvieron, tanto los cultivos como las soluciones, en recipientes herméticos que mantenían esta condición fuera de la campana. Se inocularon en anaerobiosis botellas de 500 ml de *T. aromatica* AR-1 o sus mutantes, con 3,5-DHB 1 mM y succinato 2 mM como fuentes de carbono. Se recogieron las células en distintas fases de la curva de crecimiento y se lavaron bajo condiciones anaeróbicas con 100 ml de tampón fosfato potásico 50 mM (pH 7,0). Inmediatamente, el sedimento de células se congeló en N₂ líquido y se guardó a -20°C. Para la preparación del extracto celular, las células se resuspendieron en tampón fosfato potásico 50 mM (pH 7,0), se pasó a través de la prensa de French a una presión de 100 MPa. El extracto crudo se separó de los desechos celulares por centrifugación a 27000 x g durante 20 minutos a 4°C. Finalmente se determinó la cantidad de proteínas siguiendo el método de Bradford (Bradford, 1976).

11.2 Determinación de la actividad enzimática 3,5-DHB hidroxilasa

Todas las medidas de actividad enzimática se llevaron a cabo bajo condiciones estrictas de anaerobiosis a 30°C en tubos *Hungate* de 5 ml o cubetas de 1,5 ml cerradas con tapones y utilizando soluciones anaerobias. Tanto tubos como cubetas fueron gaseados con N₂ y cerrados inmediatamente con tapones de butilo. La adición de las muestras se hizo con jeringas “*gas-tight Unimatrix microliter*” (Machery-Nagel, Düren, Germany). En todos los ensayos se comprobó la correlación lineal entre la cantidad de proteína y la actividad enzimática.

La actividad dihidroxibenzoato hidroxilasa cataliza la hidroxilación de 3,5-dihidroxibenzoato hasta 2,3,5-trihidroxibenzoato y está localizada en la fracción de

membrana de *T. aromatica* AR-1 (Gallus y Schink, 1998). Esta actividad se midió empleando $K_3Fe(CN)_6$ como aceptor de electrones en ensayos fotométricos siguiendo la reducción de $K_3Fe(CN)_6$ a 420 nm (ϵ_{420nm} de $K_3Fe(CN)_6=0,9 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La mezcla de reacción contenía TrisHCl (50 mM, pH 8,0), extracto celular (1 mg de proteína) y $K_3Fe(CN)_6$ (1mM) y se inició con la adición de 1 mM de 3,5-DHB. La reacción produce 2,3,5-trihidroxibenzoato (2,3,5-THB) que es descarboxilado hasta hidroxihidroquinona (HHQ) por enzimas solubles presentes en el extracto (Gallus y Schink, 1998). Por tanto, el 3,5-DHB se convierte hasta HHQ sin acumulación de trihidroxibenzoato cuando se emplea como extracto la fracción libre de células. La tasa de oxidación de 3,5-DHB se calculó a partir de la tasa de reducción de $K_3Fe(CN)_6$ teniendo en cuenta que la relación estequiométrica entre aceptor y donador de electrones es 2:1 como podemos observar en la siguiente fórmula:



12. TÉCNICAS ANALÍTICAS

12.1 Determinación de 3,5-dihidroxibenzoato (3,5-DHB)

Se hizo mediante HPLC (System Gold, Beckman Instruments) según fue descrito por Philipp y Schink (1998). Se empleó una columna de fase reversa C_{18} (Grom, Herrenberg, Germany) y un detector UV (Beckman 166 ó 167) y carga automática de muestras (Beckman 502). Se utilizó como eluyente una mezcla de 50% de acetato amónico (100 mM, pH 2,6) y 50% de metanol. La concentración de 3,5-DHB se calculó siempre respecto a un patrón estándar.

12.2 Determinación de succinato y otros metabolitos

Se analizó mediante HPLC con una columna de intercambio iónico (Aminex HPX-87H; Bio-Rad, Munich, Alemania) utilizando un flujo de $0,6 \text{ ml min}^{-1}$ a 40°C con una solución de ácido sulfúrico 5 mM como fase móvil. El ácido succínico eluyó después de 13 minutos. Para calcular la concentración exacta se comparó con una curva patrón (Darley et al., 2007).

12.3 Determinación de nitrato y nitrito

La concentración de nitrato y nitrito en el medio se determinó mediante HPLC, aunque en algunos casos, se utilizó el método alternativo de diazotación de Snell y Snell (1949).

12.3.1 Mediante HPLC

La concentración de nitrato y nitrito en el medio se determinó mediante un sistema de HPLC con una columna A06 de intercambio aniónico (de 3 x 120 mm; Sykam, Freising, Alemania) utilizando una elución isocrática con 40 mM de NaCl a una tasa de flujo de 1 ml min⁻¹. El tiempo de retención del nitrato fue de 5,6 minutos y el del nitrito de 3,1 minutos. Ambos compuestos se detectaron a 210 nm y se cuantificaron frente a un estándar externo (Darley et al., 2007).

12.3.2 Mediante el método de diazotación de Snell y Snell, 1949

El método requirió el uso de soluciones de sulfanilamida (10 g/l) preparada en HCl 2,4 N y N-(1-naftil)-etilendiamina dicloruro (N-NEDA, 200 mg/l). Las determinaciones se hicieron en placa multipocillo para facilitar el tratamiento y lectura de las muestras. A 0,1 ml de muestra (en la mayoría de los casos, para una mejor lectura de la placa se hizo una dilución 1/10 ó 1/100 de la muestra del cultivo) se adicionaron volúmenes iguales de las soluciones de sulfanilamida y NNEDA. Las muestras se agitaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos y se determinó la absorbancia a 540 nm. Paralelamente se llevó a cabo la misma reacción con soluciones patrones con nitrito sódico entre valores de 1 y 200 µM, además de un control negativo. Esto nos permitió obtener la concentración de nitrito de nuestra muestra por interpolación gráfica de la representación de A_{540} frente a las concentraciones de las soluciones patrón (Snell and Snell, 1949).

13. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS

Para el tratamiento y análisis de secuencias de nucleótidos y aminoácidos (determinación de las fases de lectura abiertas, sitios de restricción, composición de aminoácidos, etc) se empleó el programa informático *Clone Manager Professional Suite* (Sci Ed Central).

La comparación de nuevas secuencias (de nucleótidos y aminoácidos) con las distintas bases de datos, se realizó con la ayuda de los programas BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) disponible en el servidor de Internet del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) y ExPASy (<http://www.expasy.ch/>). El alineamiento de secuencias se realizó con el programa Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

Para el análisis de las secuencias de proteínas se utilizaron las siguientes herramientas bioinformáticas.

3D-JIGSAW (2.0): Este servidor construye modelos tridimensionales de proteínas basándose en proteínas homólogas de estructura conocida (Bates et al., 2001) <http://bmm.cancerresearchuk.org/~3djigsaw/>

"DAS" - *Transmembrane Prediction server*. Predice regiones transmembrana en una proteína problema (Cserzo et al., 1997) <http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>

TMMOD: Permite identificar y predecir la topología de proteínas transmembrana (Kahsay et al., 2005)

<http://liao.cis.udel.edu/website/servers/TMMOD/scripts/frame.php?p=submit>

BOXSHADE (3.21): Permite representar alineamientos múltiples http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html

Phyre2 Protein Fold Recognition Server. A partir de una secuencia de proteína, este servidor permite buscar homología estructural con otras proteínas y permite hacer predicciones de la estructura secundaria de la proteína problema. Igualmente detecta la presencia de posibles dominios transmembrana (Bennett-Lovsey et al., 2008; Kelley and Sternberg, 2009) (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>).

Para la construcción de los árboles filogenéticos se empleó el programa **MEGA** 5.05 que permite un alineamiento múltiple de secuencias mediante ClustalW y tras el alineamiento, la construcción de árboles filogenéticos empleando el “método del vecino más próximo” (*neighbour-joining*) (Tamura et al., 2011).

Blast2GO[®] es una herramienta integrada para la anotación funcional de nuevas secuencias y para el análisis de los datos de la anotación. La anotación funcional se realiza en tres pasos: un análisis en blast para encontrar secuencias homólogas, un mapero para extraer términos de GO (gene ontology) y una anotación propiamente dicha que selecciona funciones fiables. (Conesa et al., 2005) <http://www.blast2go.com/b2glaunch>

SWISS-MODEL es un servidor para el modelado automático de proteínas homólogas accesible a través del portal ExPASy (Arnold et al., 2006; Kiefer et al., 2009) <http://swissmodel.expasy.org/>

Geno3D es un servidor para la modelización automática de proteínas que genera modelos tridimensionales de proteínas (Combet et al., 2002) . http://geno3d-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/geno3d_automat.pl?page=/GENO3D/geno3d_home.html

PredictProtein es un servidor para el análisis de secuencias y la predicción de estructura y función de proteínas. Para una secuencia determinada, el programa devuelve alineamientos múltiples, e identifica posibles motivos estructurales y/o funcionales (Rost et al., 2004) <http://www.predictprotein.org/>

TMpred es un servidor para obtener una predicción de regiones transmembrana y su orientación. El algoritmo se basa en un análisis estadístico de la base de datos TMbase de proteínas transmembrana naturales. (Hofmann and Stoffel, 1993). http://www.ch.embnnet.org/software/TMPRED_form.html

SignalP 4.0 es un servidor para predecir la presencia y localización de puntos de corte péptidos señal en secuencias de aminoácido de distinto origen (Petersen et al., 2011). <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>

SLEP (*Surface Localization Extracellular Protein*) es una herramienta integrada para predecir la localización intracelular de proteínas bacterianas a partir de su secuencia. Combina resultados de varias herramientas: Glimmer, TMHMM, PRODIV-TMHMM, LipoP, PSortB. http://bl210.caspur.it/slep/slep_newJob.php

MEROPS es una base de datos de peptidasas (proteasas, proteinasas y enzimas proteolíticos) y de las proteínas que las inhiben (Rawlings et al., 2010). <http://merops.sanger.ac.uk/>

ESTHER (ESTerases and α/β Hydrolase Enzymes and Relatives) es un servidor dedicado al análisis de secuencias de proteínas pertenecientes a la superfamilia de α/β hidrolasas homólogas a colinesterasas (Hotelier et al., 2004). <http://bioweb.ensam.inra.fr/ESTHER/general?what=index>

Para la visualización tridimensional de las estructuras y los modelos estructurales de las proteínas se utilizó la aplicación **WebLab Viewer Lite 4.2**. http://www.marcsaric.de/index.php/WebLab_Viewer_Lite

RESULTADOS

**CAPÍTULO I. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA RUTA DE DEGRADACIÓN
DE RESORCINOL (1,3-DIHIDROXIBENCENO) EN *Azoarcus anaerobius***

CAPÍTULO I. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA RUTA DE DEGRADACIÓN DE RESORCINOL (1,3-DIHIIDROXIBENCENO) EN *Azoarcus anaerobius*

Azoarcus anaerobius es una bacteria desnitrificante anaerobia estricta capaz de crecer con resorcinol (1,3-dihidroxibenceno) como única fuente de carbono y energía, degradando este compuesto hasta CO₂ y agua (Philipp and Schink, 1998; Springer et al., 1998). En trabajos anteriores, en colaboración con el grupo del Profesor Schink de la Universidad de Konstanz, se identificó en una genoteca genómica de la cepa un cósmido de 29,88 kb, que era capaz de conferir la capacidad de crecer anaeróticamente en resorcinol a otras cepas de los géneros *Azoarcus* o *Thauera* que inicialmente carecían de esta propiedad. Este cósmido se denominó R⁺ (crecimiento en resorcinol) y se caracterizó genética y bioquímicamente (Darley et al., 2007) (depositado en la base de datos de nucleótidos del NCBI (GenBank) con el número de acceso EF078692) (Figura 13). Con posterioridad, y como consecuencia del trabajo de esta tesis, se han detectado algunos errores en la anotación inicial de los genes, cuya corrección proponemos (tabla 7), al igual que cambiamos el nombre de algunos de ellos, que no cumplen con la nomenclatura estándar recomendada por el *Genetics and Genomics Committee* de la ASM. Los cambios se recogen en la tabla 7. Hasta la inclusión de los cambios en la base de datos, decidimos seguir con la nomenclatura original propuesta por Darley y colaboradores (2007) para no crear confusión.

Tabla 7. Cambios en la anotación del cluster de degradación de resorcinol de *A. anaerobius*

I.- Cambios de nomenclatura	
Nomenclatura original	Nueva nomenclatura
<i>rhL</i>	<i>rehL</i>
<i>rhS</i>	<i>rehS</i>
<i>bqdhL</i>	<i>bqdL</i>
<i>bqdhM</i>	<i>bqdM</i>
<i>bqdhS</i>	<i>bqdS</i>
<i>btdhS</i>	<i>btdS</i>
<i>btdhL</i>	<i>btdL</i>
<i>orf7</i>	<i>redR1</i>
<i>orf15</i>	<i>redR2</i>
II.- Cambios en la anotación	
Anotación original	Cambio
<i>rhL</i> (desde 10455 hasta 7708)	<i>rehL</i> (desde 10761 hasta 7708; ORF más larga en 5')
<i>btdhL</i> (desde 24337 hasta 23426)	<i>btdL</i> (desde 24355 hasta 23426; ORF más larga en 5')
<i>btdhS</i> (desde 24957 hasta 24352)	<i>btdS</i> (desde 24759 hasta 24352; ORF más corta en 5')
región intergénica <i>orf13-btdhS</i>	<i>cup</i> (desde 25172 hasta 24807; nueva ORF identificada entre <i>btdhS</i> y <i>orf13</i>)
<i>orf7</i> (16461 hasta 18287)	<i>redR1</i> (de 16308 a 18287; orf más larga en 5')

1. ORGANIZACIÓN TRANSCRIPCIONAL Y EXPRESIÓN DE LOS OPERONES PARA LA DEGRADACIÓN DE RESORCINOL.

1.1 Organización transcripcional de los genes de la ruta de degradación de resorcinol

Estudios anteriores habían puesto de manifiesto que células cultivadas con benzoato como fuente de carbono mostraban una fase lag de varios días cuando se transferían a medio de cultivo con resorcinol como única fuente de carbono. Por otro lado, un extracto celular de células cultivadas con benzoato mostraba una baja actividad resorcinol hidroxilasa e HHQ deshidrogenasa, las dos primeras enzimas de la ruta de degradación de resorcinol, mientras que si el extracto provenía de células cultivadas con resorcinol el nivel de ambas enzimas era alto, lo que permitió proponer que la ruta era inducible por resorcinol (Philipp and Schink, 1998). El análisis de la secuencia del cluster de genes presente en R+ reveló la presencia de dos genes reguladores pertenecientes a la familia NtrC de reguladores transcripcionales, que a su vez pertenecen a la familia extendida AAA+ (*ATPases Associated with various cellular Activities*) (Neuwald et al., 1999; Lupas and Martin, 2002), y que se caracterizan por activar promotores que dependen de la subunidad σ^{54} de la ARN polimerasa. Era por tanto esperable que los genes de la ruta estuvieran regulados por la presencia del sustrato y fueran dependientes de σ^{54} .

Para analizar la expresión de los enzimas de la ruta a nivel genético, nos propusimos en primer lugar analizar la organización transcripcional de los genes de la agrupación, y posteriormente caracterizar la regulación de su expresión. Basándose en la organización de los genes y la distancia entre ellos, Darley y colaboradores (2007) propusieron tres operones en el cluster de degradación de resorcinol: el operón I, encabezado por los genes que codifican el primer paso de la ruta (*rhLS*) y que incluía *orf6* y *orf5*, el operón II, con los genes que codifican para la HBQ deshidrogenasa (*bqdhLMS*) y el operón III formado por los genes para la HHQ deshidrogenasa (*btdhLS*) que incluía además las *orf13* y *orf14*, dos genes esenciales para la degradación de resorcinol. Sin embargo, no existía ninguna evidencia experimental de que efectivamente las regiones propuestas constituyeran unidades transcripcionales activas.

Para determinar la organización transcripcional de los genes de la agrupación, nos propusimos definir de forma experimental los operones funcionales en la expresión de la ruta. Para ello realizamos ensayos de RT-PCR con ARN extraído de A.

anaerobius cultivada en condiciones desnitrificantes utilizando resorcinol (2 mM) o succinato (5 mM) como únicas fuentes de carbono, y los productos de amplificación de la reacción de RT-PCR utilizando los cebadores indicados en la Tabla 4B se analizaron en geles de agarosa. Como se puede observar en la figura 21, la primera unidad transcripcional inducida por resorcinol (Operón I) abarcaba desde *rhL* hasta *orf4* (reacciones A, B, C y D), apreciándose además expresión basal de un posible transcrito constituido por *orf5* y *orf6* (reacción B). La siguiente unidad transcripcional (Operón II) se inducía por resorcinol e incluía los genes comprendidos entre *bqdhL* y *redR1* (reacciones E, F y G). La tercera unidad transcripcional inducida por resorcinol (Operón III) estaba formada por los genes *orf8*, *orf9* y *orf10* (reacciones H, I y J). Además se observó el producto de amplificación en presencia de succinato en la región intergénica entre *orf11* y *orf12* (reacción K). La siguiente unidad transcripcional inducida por resorcinol (Operón IV) incluía los genes comprendidos entre *orf14* y *orf12* (reacciones L, M, N, O, P). También se observó en presencia de resorcinol cotranscripción de *orf14* con el gen regulador *redR2* situado aguas arriba (reacción Q). Sin embargo, como veremos más adelante, se ha identificado un promotor delante de *orf14*, por lo que el operón se iniciaría en este gen. Las reacciones de extensión con ARN de células cultivadas en succinato revelan además la existencia de un transcrito constitutivo que incluiría los genes *cup*, *orf13* y *orf14* (reacciones O y P).

El conjunto de resultados obtenidos pone de manifiesto una organización transcripcional diferente a la propuesta inicialmente ((Darley et al., 2007); Figura 13). Los genes de la ruta se transcribirían en cuatro operones inducibles por resorcinol:

Operón I. Comprende cinco genes, desde *rhL* hasta *orf4*, incluyendo los genes *rhLS* que codifican el primer paso de la ruta, la resorcinol hidroxilasa (RhLS).

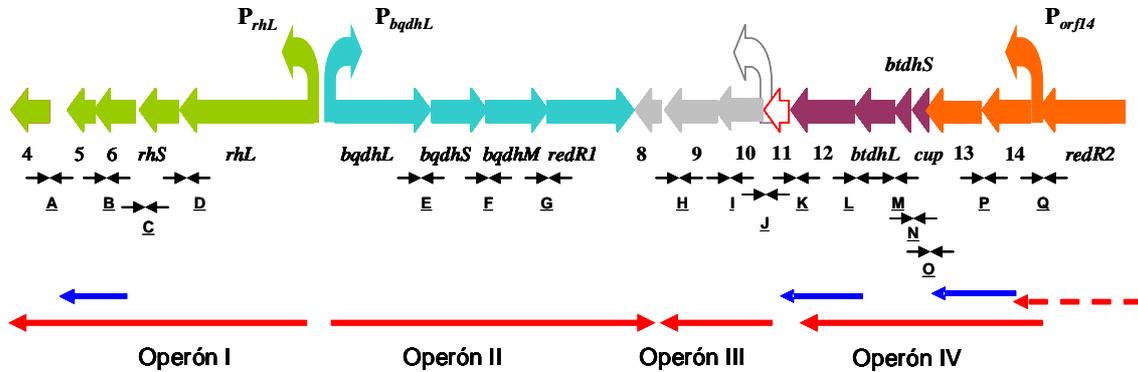
Operón II. Se transcribe de forma divergente al anterior y está formado por los genes *bqdhMLS*, que codifican el tercer paso de la ruta, la HBQ deshidrogenasa (BqdhMLS). Además incluye el gen regulador *redR1*.

Operón III. Incluye tres genes y se transcribe de forma convergente con el anterior. Se iniciaría en *orf10*, extendiéndose hasta *orf8*.

Operón IV. Está formado por seis genes, el primero de los cuales es *orf14*, seguido de *orf13*, ambos esenciales para la degradación de resorcinol. La siguiente *orf*, denominada aquí como *cup* (reanotada en esta Tesis Doctoral, Tabla 7), codifica una proteína de tipo cupina de función desconocida, que no había sido anotada por Darley y colaboradores (2007). También incluye los genes *btdhL* y *btdhS* que codifican el

segundo paso de la ruta, la HHQ deshidrogenasa (BtdhLS). El último gen de este operón es la *orf12*.

A



B

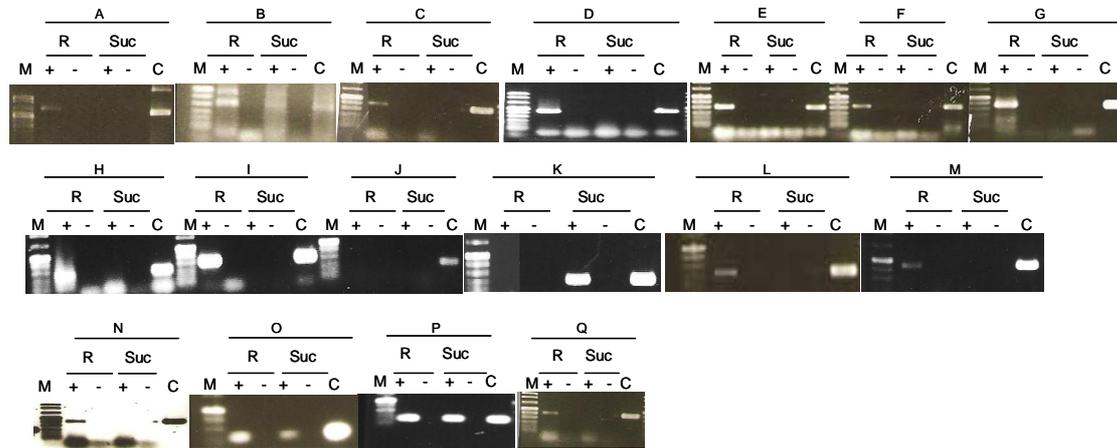


Figura 21. Organización transcripcional del cluster de genes de degradación de resorcinol de *A. anaerobius* entre la *orf4* y *redR2*. **A)** Representación esquemática del cluster de genes de *A. anaerobius* donde los diferentes marcos abiertos de lectura se representan con flechas anchas y las unidades transcripcionales con flechas rojas (inducibles) y azules (constitutivas). Los promotores que se asocian a cada unidad transcripcional se representan con flechas curvas. El promotor hipotético que no ha sido demostrado experimentalmente se muestra en blanco (ver más adelante). Las flechas negras convergentes y las letras de **A** hasta **Q** muestran la región amplificada por RT-PCR empleando los oligonucleótidos que se detallan en la Tabla 4B de Materiales y Métodos. **B)** Electroforesis en geles de agarosa de los productos de RT-PCR (+) de ARN extraído de *A. anaerobius* crecida hasta una $DO_{600} = 0,25$ en condiciones desnitrificantes con resorcinol (2 mM) (R) o succinato (5 mM) (Suc) como única fuente de carbono (ver apartado. 6.11 y 6.12 de Materiales y Métodos). Como control negativo de la RT-PCR se hicieron las mismas reacciones, pero omitiendo la transcriptasa reversa (-). Los controles positivos (C) se realizaron empleando ADN genómico de *A. anaerobius*. La calle M representa el marcador VIII de peso molecular de Roche.

Además de estos operones inducibles, de los resultados de RT-PCR podemos predecir la presencia de tres transcritos de expresión constitutiva. Por un lado uno que incluiría *orf5* y *orf6* y solaparía parcialmente con el operón I, por otro un operón

conteniendo *orf11* y *orf12*, y parcialmente solapante con el operón IV. Finalmente un último transcrito incluyendo los genes *cup*, *orf13* y *orf14* solaparía también con el operón IV.

1.2 Expresión de los operones I, II y IV

Mediante PCR a tiempo real se cuantificó la expresión del primer gen de cada operón: *rhL* para el operón I, *bqdhL* para el operón II, y *orf14* para el operón IV, y se comparó entre células cultivadas con succinato, resorcinol y succinato más resorcinol como fuentes de carbono. Para ello, se aisló ARN total de *A. anaerobius* crecido con succinato (5 mM), resorcinol (2 mM) y resorcinol/succinato (2 mM/5 mM) hasta fase exponencial (DO_{600nm} 0,2). La expresión de los genes se midió mediante PCR a tiempo real según se detalla en el apartado 6.13 de Materiales y Métodos. Se ha utilizando la expresión del gen ARNr 16S como gen de referencia para normalizar los datos y se emplearon los oligonucleótidos 2q_rhLF/2q_rhLR para la región intragénica de *rhL* (375 pb), q_bqdhLF/q_bqdhLR para *bqdhL* (175 pb), q_orf14F/q_orf14R para *orf14* (199 pb) y F357/530R para el gen ARNr 16S (Tabla 5 de Materiales y Métodos).

Como se puede observar en la tabla 8 los genes *rhL*, *bqdhL* y *orf14* se induce hasta niveles 523, 780 y 310 veces superiores en presencia de resorcinol que en células cultivadas en succinato. Esto corrobora los resultados obtenidos por RT-PCR, y confirma que los tres operones se inducen cuando las células se cultivan con resorcinol como única fuente de carbono.

Por otro lado, pretendíamos determinar si la presencia de fuentes de carbono alternativas afectaba a la expresión de la ruta de degradación de resorcinol; para ello se midió la expresión de los genes *rhL*, *bqdhL* y *orf14* en cultivos anaerobios cultivados con succinato (5 mM), o una mezcla de ambos compuestos como fuente de carbono (succinato más resorcinol; 5 y 2 mM). Como se muestra en la tabla 8 se observó una reducción en la expresión de estos genes cuando además de resorcinol se le añade succinato al medio. La adición de una fuente adicional de carbono como succinato reprime drásticamente la expresión de los tres operones, quedando reducida a un 6% la expresión del gen *rhL*, a un 9% la expresión de *bqdhL* y un 29% la expresión de *orf14*.

Tabla 8. Niveles de inducción de los principales operones implicados en la degradación de resorcinol en *A. anaerobius*

Gen	Inducción resorcinol	Inducción resorcinol+succinato	% actividad remanente
<i>rhL</i>	522,91±0,17	33,75±0,31	6,45
<i>bqdhL</i>	779,80±0,55	76,04±0,10	9,5
<i>orf14</i>	310,53±0,43	90,24±0,22	29,1

Estos resultados ponen de manifiesto la existencia de represión catabólica por la presencia de una fuente adicional de carbono como succinato, igual que ocurría en presencia de benzoato, donde las principales actividades enzimáticas de la ruta, resorcinol hidroxilasa e HHQ deshidrogenasa veían disminuida su actividad drásticamente (Philipp and Schink, 1998)

2. ANÁLISIS DE LOS PROMOTORES QUE CONTROLAN LA EXPRESIÓN DE LA RUTA DE DEGRADACIÓN DE RESORCINOL

2.1 Caracterización de la región promotora del operón I.

En el cluster de genes de degradación de resorcinol presente en el cósmido R+ se encuentran dos genes con una alta homología con reguladores de la familia NtrC. Dado que estos reguladores se caracterizan por regular promotores dependientes de la subunidad sigma alternativa σ^{54} , cabía esperar que la regulación de la ruta dependiera de este factor sigma y que los promotores diana conservaran la estructura típica de promotores dependientes de esta ARN polimerasa.

Nos propusimos determinar el sitio de inicio de la transcripción de los tres operones involucrados en la degradación de resorcinol con el fin de poder analizar en detalle la secuencia de cada promotor. Para determinar el punto de inicio de la transcripción del primer gen del operón I se extrajo ARN total de *A. anaerobius* cultivado con resorcinol o con succinato como fuente de carbono y se analizó mediante extensión a partir de cebador (*primer extension*) como se indica en el apartado 7 de materiales y métodos.

La figura 22A muestra los resultados obtenidos. Tanto en ausencia como en presencia de resorcinol, se observó un producto de extensión de 72 nucleótidos que

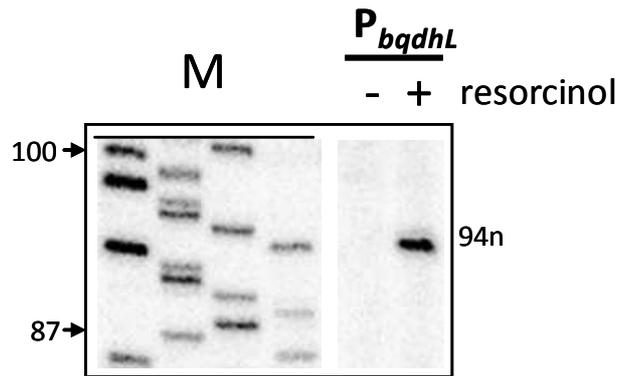
Para este promotor constitutivo, que denominamos P_{rhL2} , identificamos dos cajas centradas en posición -10 y -35 con respecto al inicio de la transcripción, con homología (3/6 y 4/6 respectivamente) con las secuencias consenso de unión de la subunidad σ^{70} de la ARN polimerasa. Además de esta banda, en la muestra procedente de células cultivadas en presencia de resorcinol se observó una segunda banda de extensión de 93 nt que situaba el punto de inicio de la transcripción 116 pb aguas arriba del primer codón de *rhL* (Figura 22). En la secuencia del promotor se localizaron en posición -14 y -26 con respecto de este punto las cajas conservadas de unión del factor σ^{54} de la ARN polimerasa (las llamadas cajas -12/-24, cuya secuencia consenso es TTGC (-12) y NTGGCA (-24), (Barrios et al., 1999) (Figura 22B). De esta forma, habría un solapamiento entre los sitios de unión de las dos polimerasas para iniciar la transcripción desde los dos promotores.

Aproximadamente 20 pb por encima del sitio de unión de σ^{54} se localizó una región de 28 pb rica en A/T que se extendía entre las posiciones -73 y -46, y que conservaba 8 de las 10 posiciones del consenso que caracteriza el núcleo de unión de la proteína IHF (*integration host factor*). Esta nucleoproteína se caracteriza porque es capaz de doblar el ADN, y participa en la regulación de la transcripción de la mayoría de los promotores dependientes de σ^{54} , donde su función suele ser poner en contacto el regulador y la ARN polimerasa unidos a secuencias de ADN muy distantes entre sí (Goosen and van de Putte, 1995). Por tanto proponemos esta región como sitio de reconocimiento de IHF. Delante del codón de inicio de la traducción se encontró la secuencia *Shine-Dalgarno* o sitio de unión del ribosoma, RBS (*Ribosome Binding Site*) que conserva la secuencia consenso AGGA complementaria al extremo 3' del ARN 16S de *A. anaerobius*.

2.2 Caracterización de la región promotora del operón II.

Para determinar el punto de inicio de la transcripción del primer gen del operón II y así poder definir su promotor, se extrajo ARN total de *A. anaerobius* cultivado con resorcinol o succinato como fuente de carbono y se analizó mediante extensión a partir de cebador. En la figura 23 se muestran los resultados obtenidos. En presencia de resorcinol se observó un producto de extensión de 94 nt (Figura 23A) que situaba el punto de inicio de la transcripción a 82 pb aguas arriba del primer codón de *bqdhL*. Delante del codón de inicio de la transcripción se encontró la secuencia *Shine-Dalgarno* que conservaba el consenso AGGA. Centradas en la posición -13 y -25 se localizaron las cajas conservadas -12 y -24 de unión de σ^{54} (Figura 23B).

A



B

CGGGTTTCAA**TTTGGG**ACGCGTGT**TCGCAA**GATAGACCTTGAAAACACCCGATCCGCATT

CGGTTTCATTGTTAATTC AATGCCTTGGATGACATTTTACTGAAT**GG**CATGGCTCTT**GCA**

IHF -24 -12

CTTCAAGGCTT**G**TTAATCCGGTGAGCGTCCGGATCGAGCAAGGATCCGGCGTACGGAAAA

+1

AGTCGCCACTGAACATCACCCCTG**AGGA**ACGAGG**ATG**

RBS bqdhL

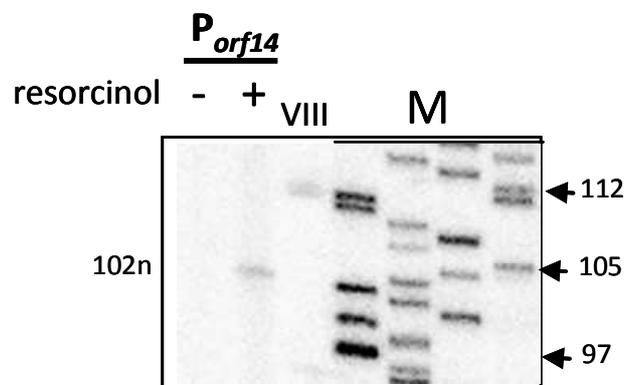
Figura 23. Promotor P_{bqdhL} de *A. anaerobius*. A) Determinación de los puntos de inicio de la transcripción del operon II (gen *bqdhL*). Se extrajo ARN total de células de *A. anaerobius* creciendo en succinato (-) o resorcinol (+) hasta alcanzar una OD_{600} de 0,3. Muestras de 12 μ g de ARN se analizaron mediante extensión a partir de cebador con el oligonucleótido priPyr90 complementario al gen *bqdhL* (Tabla 6). Para determinar el tamaño del producto de extensión obtenido se utilizó una reacción de secuenciación no relacionada como marcador de peso molecular. B) Secuencia de la región promotora del operon I. Se muestra el sitio de inicio de la transcripción (+1), el codón de inicio de la traducción (morado), el sitio de unión al ribosoma (RBS, azul cursiva), las cajas -12 y -24 (sombreado en rojo), un posible sitio de unión de IHF (subrayado en naranja, con letras naranjas la región que se ajusta al consenso) y dos secuencias repetidas invertidas (verde, flechas convergentes).

A 18 pb por encima del sitio de unión de σ^{54} se localizó una región de 28 pb rica en A/T que se extendía entre las posiciones -73 y -45, y que conservaba 9 de las 10 posiciones del consenso que caracteriza el núcleo de unión de la proteína IHF. A aproximadamente 27 pb del sitio de unión de IHF, centradas entre las posiciones -101 y -120 se han encontrado dos repeticiones invertidas que podrían estar involucradas en la unión del regulador.

2.3 Caracterización de la región promotora del operón IV.

Igual que en los casos anteriores, para determinar el punto de inicio de la transcripción del primer gen del operón IV (*orf14*) que nos permitiera definir el promotor, se extrajo ARN total de *A. anaerobius* cultivado con resorcinol o succinato como fuente de carbono y se analizó mediante extensión a partir de cebador. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 24. Sólo en presencia de resorcinol se observó un producto de extensión de 102 nt que situaba el punto de inicio de la transcripción a 64 pb del codón de inicio de la traducción de *orf14*.

A



B

CTCGTCGCACTTTGCGACAAGTGTGCGA AGTGTGAGACGGA TGTATCTCAGCCT TCCGTC

TCATCGC AAAAAAATACCAAGA AAATCAATTACGTG CATCCATGCAACGGCTT GG CACAG
IHF -24

GCCTT GC ATTGATGTACGTA A GAGACAATCCGGTCCCTTATCCGGATTAGATCGCATCTGA
-12 +1

ACGATTAAC AGGAG ATACCTGCG ATG
RBS orf14

Figura 24. Promotor P_{orf14} de *A. anaerobius*. A) Determinación del punto de inicio de la transcripción del operón IV (gen *orf14*). Se extrajo ARN total de células de *A. anaerobius* creciendo en succinato (-) o resorcinol (+) hasta alcanzar una OD_{600} de 0,3. Muestras de 12 μ g de ARN se analizaron mediante extensión a partir de cebador con el oligonucleótido 20X complementario al gen *orf14* (Tabla 6). Para determinar el tamaño del producto de extensión obtenido se utilizó una reacción de secuenciación no relacionada como marcador de peso molecular. B) **Secuencia de la región promotora del operón IV.** Se muestra el sitio de inicio de la transcripción (+1, subrayado), el codón de inicio de la traducción (morado), el sitio de unión al ribosoma (RBS, azul cursiva), las cajas -12 y -24 (sombreado en rojo), un posible sitio de unión de IHF (subrayado en naranja, con letras naranjas la región que se ajusta al consenso) y dos secuencias repetidas invertidas (verde, flechas convergentes).

Centrados en posición -13 y -25 se localizaron las cajas -12 (TTGCA) y -24 (TTGGNA) de unión de la subunidad σ^{54} , que conservaban muy bien el consenso. A unas 17 pb del sitio de unión de σ^{54} se situó el sitio de unión de IHF, centrado entre las posiciones -43 y -72, que guardaba 9 de las 10 posiciones del consenso. Aguas arriba y adyacentes encontramos dos repeticiones invertidas que podrían constituir el sitio de unión del regulador, entre la posición -72 y -111.

2.4. Elementos reguladores conservados en los promotores que controlan la degradación de resorcinol.

En el análisis de las tres secuencias promotoras dependientes de σ^{54} se observó que las secuencias reguladoras y su organización estaban muy conservadas en los tres casos. La figura 25 muestra la alineación de las cajas -12 y -24 de los tres promotores, con la secuencia consenso establecida para promotores dependientes de σ^{54} en eubacterias (Taylor et al., 1996; Burrows et al., 2003). Se puede apreciar en los tres promotores una conservación casi perfecta del consenso,

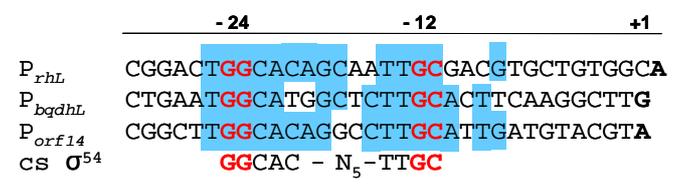


Figura 25. Alineamiento del sitio de unión de la ARN polimerasa de los promotores P_{rhL} , P_{bqdhL} y P_{orf14} . En rojo se destacan las cajas -12/-24 que caracterizan a los promotores dependientes de σ^{54} , y en azul se resaltan las bases conservadas en los tres promotores. El primer nucleótido del ARNm resultante se indica en negrita. En la última línea se muestra el consenso establecido en eubacterias (Burrows et al., 2003).

Igualmente, el sitio de unión de la proteína auxiliar IHF se situaba en los tres casos a aproximadamente 20 pb aguas arriba del sitio de unión de σ^{54} , y presentaba una secuencia conservada en los tres promotores, que coincidía con el consenso propuesto para otros promotores regulados por esta proteína (Friedman, 1988; Goodrich et al., 1990; Goosen and van de Putte, 1995; Arfin et al., 2000) (figura 26).

IHF _{<i>rhL</i>}	-62	TAAAAATCAGTAAAGTG	-46
IHF _{<i>bqdhL</i>}	-61	GTTAATTCAATGCCTTG	-45
IHF _{<i>orf14</i>}	-60	AGAAAATCAATTACGTG	-44
cs IHF		AAA TTTCAA-N4-TTG	

Figura 26. Alineamiento del sitio de reconocimiento de IHF en los promotores P_{*rhL*}, P_{*bqdhL*} y P_{*orf14*}. En negrita se indican las bases que se ajustan al consenso y en verde se resaltan las bases conservadas en los tres promotores. Los números al principio y final de cada secuencia indican su posición con respecto al punto de inicio de la transcripción. En la última línea se muestra el consenso establecido en eubacterias (Friedman, 1988)

Igualmente observamos que existía homología entre las secuencias repetidas invertidas encontradas aguas arriba de los genes *rhL*, *bqdhL* y *orf14*, lo que sugiere que podrían ser reconocidas por el mismo regulador (figura 27).

directa	GGTTTGAGACGTG	} <i>rhL</i>
invertida	GGCATGCGCGTCG	
directa	TTTGCGA	} <i>bqdhL</i>
invertida	TTTGCGA	
directa	AGTGTGAGACGGA	} <i>orf14</i>
invertida	GCGATGAGACGGA	
consenso	ggttTGAGAcg	

Figura 27. Alineamiento de las repeticiones invertidas encontradas aguas arriba de *rhL*, *bqdhL* y *orf14*. Las secuencias se presentan en dirección 5'-3', siendo la secuencia directa la más distante al punto de inicio de la transcripción. En verde oscuro se resaltan las bases conservadas en la mitad o más de las secuencias y en verde claro las bases conservadas en las repeticiones de cada promotor. En la secuencia consenso se muestran en mayúscula las bases conservadas en más del 75% de las secuencias y en minúsculas aquellas presentes en al menos el 50%.

3. ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS REGULADORAS *RedR1* Y *RedR2* PRESENTES EN LA AGRUPACIÓN GÉNICA DE DEGRADACIÓN DE RESORCINOL.

3.1 Análisis de la secuencia de las proteínas reguladoras *RedR1* y *RedR2*

En el cósmido R+ de *A. anaerobius* se encontraron las pautas abiertas de lectura *orf7* y *orf23*, que denominamos *redR1* y *redR2*, respectivamente, con una alta homología con reguladores transcripcionales pertenecientes a la familia NtrC de reguladores que controlan promotores dependientes de sigma 54 (Shingler, 1996; Schumacher et al., 2006; Darley et al., 2007). Los reguladores de este grupo pertenecen a la familia de proteínas AAA+, y se caracterizan porque sus sitios de

unión en el ADN (denominados UAS, *Upstream Activating Sequence*) se localizan a cierta distancia aguas arriba del promotor, de tal forma que se requiere la curvatura del ADN para que contacte con el complejo cerrado formado por la ARN polimerasa con σ^{54} . Por la similitud de este mecanismo con ciertos activadores eucariotas (*Enhancer Binding Proteins*), también se denominan EBPs (Rappas et al., 2007). RedR1 y RedR2 presentan un 97,4 % de identidad en sus secuencias de aminoácidos. La mayoría de las diferencias se localizan en el extremo N-terminal de la proteína (los ocho primeros residuos son diferentes) y en el dominio C-terminal, donde se han encontrado nueve cambios puntuales en la secuencia. En las proteínas de la familia, esta región se estructura como un dominio HTH (del residuo 610 a 650 en RedR1 y de 612 a 652 en RedR2) con función de unión al ADN, lo que sugiere que posiblemente reconocen secuencias de ADN diferentes (Figura 28).

La estructura primaria de las proteínas presenta además un típico dominio central (dominio activador, que comprende del residuo 344 al 511 en RedR1 y del 346 al 513 en RedR2), muy conservado en las proteínas de la familia, que incluye un sitio de unión de ATP (Walker domain) (figura 28). Los motivos Walker A y Walker B son esenciales para la unión e interacción con ATP y Mg^{2+} ; y para la hidrólisis del nucleótido, donde un dedo de arginina juega también un papel clave (Snider and Houry, 2008). Además las EBPs bacterianas se distinguen del resto de proteínas de la familia AAA+ por la presencia de una secuencia muy conservada, el motivo GAFTGA, situado entre los motivos Walter A y B, que constituye el punto de contacto principal con el factor σ^{54} (Gallegos et al., 1999; Bordes et al., 2003). Todos estos motivos están conservados en RedR1 y RedR2 (figura 28).

El extremo N-terminal es la secuencia menos conservada entre las proteínas de la familia, y constituye el dominio regulador, responsable de recibir las señales que desencadenan la respuesta. En este caso, en el dominio N-terminal se puede predecir entre los residuos 222 y 320 en RedR1 y 224 hasta 322 en RedR2 una región con homología con dominios PAS (llamados así porque se encontraron inicialmente en proteínas del Periodo circadiano; en la proteína ARNT y en las llamadas *Single-minded proteins*, (Ponting and Aravind, 1997). Esta región de la proteína conserva la estructura consenso de hoja beta con cinco láminas-beta antiparalelas combinada con varias alfa-hélices, típica de los dominios PAS (Figura 29; (Möglich et al., 2009)). Los dominios PAS están presentes en muchas proteínas, y se consideran módulos sensores versátiles relacionados con la transmisión de señales, bien a través de la unión de ligandos o actuando como sensores de estímulos físicos o químicos,

especialmente tensión de oxígeno, potencial redox y luz (Hefti et al., 2004; Möglich et al., 2009).

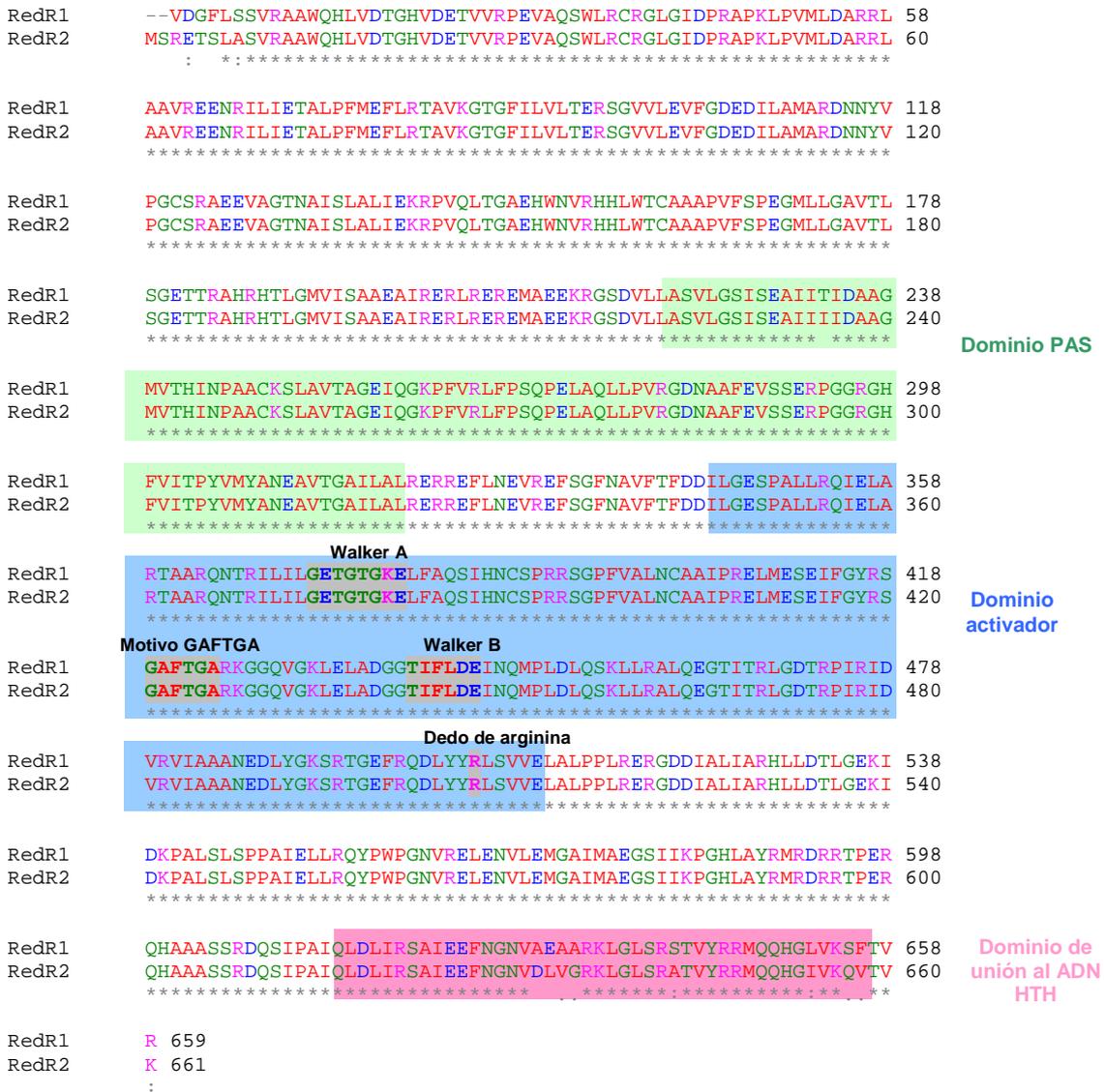


Figura 28. Alineamiento de la secuencia de las proteínas RedR1 y RedR2. Las secuencias se alinearon utilizando ClustalW (Thompson et al., 2002). La tercera línea marca el consenso entre las dos secuencias, donde “*” indica residuos idénticos, “:” sustituciones conservativas y “:” sustituciones semiconservativas. En color se resaltan los distintos dominios identificados: verde, dominio PAS; azul, dominio activador, y rosa dominio HTH de unión al ADN. Con un recuadro se señalan los motivos esenciales para la actividad de los reguladores (ver texto).

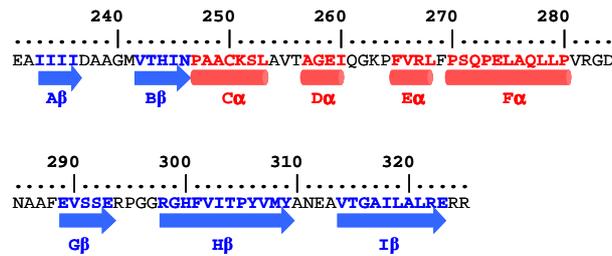


Figura 29. Estructura del dominio PAS de RedR2. Se muestra la región de la proteína entre los residuos 230 y 325. Las flechas azules indican las secuencias con estructura de hoja beta y los cilindros rojos las secuencias con estructura de hélice alfa. Cada estructura se nombra según la nomenclatura de Möglich *et al.*, 2009. Las estructuras secundarias se predijeron utilizando la aplicación web integrada PredictProtein (Rost and Liu, 2003) y el servidor de predicción de estructuras Phyre2 (Kelley and Sternberg, 2009).

3.2 Identificación del regulador de la ruta.

Para determinar si *redR1* y *redR2* participaban en la regulación de la transcripción de los operones de la ruta de degradación de resorcinol, en primer lugar nos propusimos determinar si eran esenciales para el crecimiento en este aromático. Para ello era necesario construir cepas carentes de uno y otro gen regulador. Dada la imposibilidad de cultivar la cepa *A. anaerobius* en medio sólido, todos los experimentos que requirieron manipulación de los genes de la ruta se llevaron a cabo sobre el cósmido R⁺ transferido a distintas cepas de *E. coli*. El análisis fisiológico de los mutantes se llevó a cabo con los distintos derivados del cósmido R⁺ obtenidos, expresados en el huésped heterólogo *Azoarcus* sp. CIB, que cuando porta el cósmido R⁺ es capaz de crecer con resorcinol como única fuente de carbono. Este sistema reproduce exactamente el patrón de regulación observado con la cepa silvestre *A. anaerobius* (datos no mostrados).

Para la construcción de mutantes en los genes reguladores se llevó a cabo una mutagénesis al azar del cósmido R⁺ con el mini-transposón de pUT-Km (de Lorenzo *et al.*, 1990) según se describe en el apartado 10.2 de Materiales y Métodos. De entre los mutantes obtenidos se seleccionaron tres: Mut_*redR1*, en el que el mini-transposón se había insertado en el gen *redR1*; Mut_*redR2*, con el mini-transposón insertado en el gen *redR2*; y Mut_*rhL*, con el transposón insertado en el gen *rhL*, que codifica para la subunidad grande de la resorcinol hidroxilasa, primer paso de la ruta, y que utilizamos como control de gen esencial

3.2.1 Crecimiento de los mutantes en los genes reguladores *redR1*, *redR2* y en el primer paso de la ruta, *rhL*.

El cósmido R⁺ silvestre y los cósmidos mutantes obtenidos se transfirieron por conjugación a *Azoarcus* sp. CIB y se cultivaron en condiciones desnitrificantes con succinato (5 mM) o resorcinol (2 mM) como fuente de carbono.

La figura 30 muestra que *Azoarcus* sp. CIB portadora del cósmido R⁺ alcanzó valores de DO_{600 nm} de 0,223 en 72 horas cuando era cultivada con resorcinol a 2 mM. La cepa portadora del cósmido mutante en la subunidad alfa de la resorcinol hidroxilasa (Mut_ *rhL*), gen esencial de la ruta (Darley et al., 2007) era incapaz de crecer con resorcinol como única fuente de carbono (figura 30). También podemos observar cómo *Azoarcus* sp. CIB con el cósmido R⁺ mutado en el regulador *redR2* (Mut_ *redR2*) era incapaz de crecer con resorcinol como única fuente de carbono (figura 30), mientras que *Azoarcus* sp. CIB portadora del cósmido R⁺ mutado en el primer regulador (Mut_ *redR1*), podía crecer con resorcinol como única fuente de carbono (figura 30), aunque el crecimiento se veía retardado con respecto a la cepa silvestre. Por tanto, podemos concluir que *redR2* es esencial para la degradación de resorcinol, y probablemente el regulador principal de la ruta.

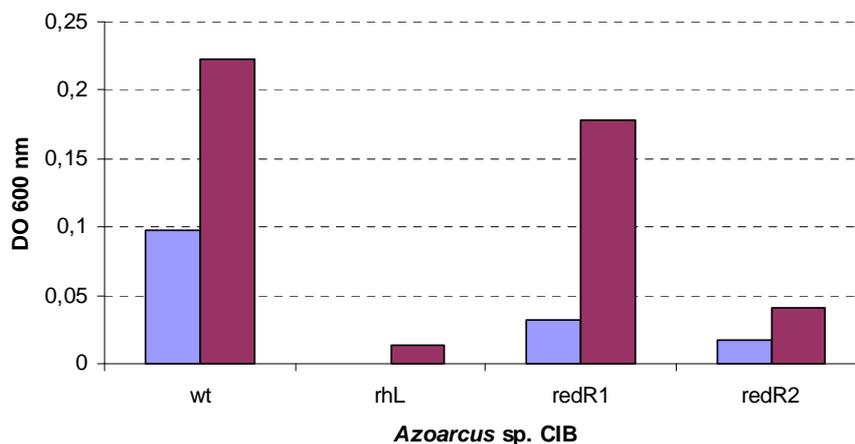


Figura 30. Efecto de la mutación de los genes reguladores *redR1*, *redR2* y *rhL* sobre la capacidad de utilizar resorcinol. Crecimiento de *Azoarcus* sp. CIB con el cósmido R⁺ silvestre (wt) y los cósmidos mutantes Mut_ *rhL* (rhL), Mut_ *redR1* (redR1) y Mut_ *redR2* (redR2) en medio Widdel con resorcinol (2 mM) como fuente de carbono a las 46 (azul) y 72 (ciruela) horas de cultivo. A los tiempos indicados, se tomaron muestras de los cultivos para determinar su turbidez (D.O._{600nm}).

3.2.2 Expresión de los operones I, II y IV en ausencia de los reguladores RedR1 y RedR2

Para determinar el papel de cada una de las proteínas en la expresión de los tres operones esenciales de la ruta, determinamos los niveles de transcripción de los genes *rhL*, *bqdhL* y *orf14* en *Azoarcus* sp. CIB portadora de R⁺ o de sus mutantes en los genes reguladores. Dado que la cepa *Azoarcus* sp. CIB con el cósmido mutante Mut_redR2 (figura 72A) era incapaz de crecer con resorcinol como fuente de carbono, los ensayos se realizaron en células cultivadas en succinato y suplementadas con resorcinol. Para seguir la actividad del promotor, se aisló ARN de las tres cepas creciendo en succinato (control) o en succinato suplementado con resorcinol (inducidas), y se analizó mediante extensión a partir de cebador (figuras 75-77).

La figura 31A muestra que al igual que en *A. anaerobius* (figura 31), en *Azoarcus* sp. CIB portadora del cósmido R⁺ silvestre, el gen *rhL* se expresaba desde dos promotores, uno constitutivo (P_{rhL2}) y otro inducible (P_{rhL1}). Así mismo, se observa que la presencia de succinato en el medio no afectaba a la activación del promotor P_{rhL1} en presencia de resorcinol. La mutación en el gen *redR1* no parecía afectar a la expresión del promotor (figura 31B), mientras que la mutación en *redR2* eliminaba completamente la actividad del promotor inducible P_{rhL1} , manteniéndose inalterado P_{rhL2} .

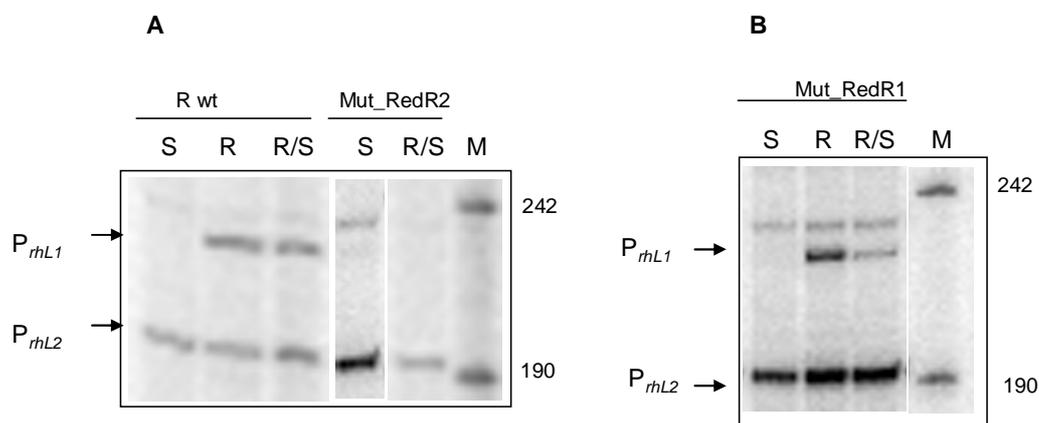


Figura 31. Efecto de la inactivación de los genes reguladores *redR1* y *redR2* sobre la expresión desde el promotor *PrhL*. **A)** Extensión a partir de cebador de ARN extraído de *Azoarcus* sp. CIB (R⁺) con succinato 5 mM (S), resorcinol 2mM (R) y succinato resorcinol más 2 y 5 mM (R/S); y de *Azoarcus* sp. CIB (Mut_ *redR2*) con succinato 5 mM (S) y resorcinol más succinato 2 y 5 mM (R/S); marcador VIII de peso molecular (M). **B)** Extensión a partir de cebador de ARN extraído de *Azoarcus* sp. CIB (Mut_ *redR1*) con succinato 5 mM (S), resorcinol 2 mM (R) y resorcinol más succinato 2 y 5 mM (R/S); marcador VIII (M). El oligonucleótido empleado para la reacción de extensión fue priextAlfa (Tabla 6) que dio lugar a dos productos de extensión, PrhL1 (224 n) y PrhL2 (203 n). A la derecha del marcador VIII se indican los tamaños de las bandas de 242 n y 190 n.

Cuando se analizó el promotor P_{bqdhL} del operón II se obtuvo un resultado semejante (figura 32). La cepa portadora del cósmido R+ silvestre presentaba el mismo patrón de inducción que *A. anaerobius*, la mutación en *redR1* no tenía efecto sobre la expresión del promotor, mientras que la mutación en *redR2* abolía totalmente la actividad del promotor.

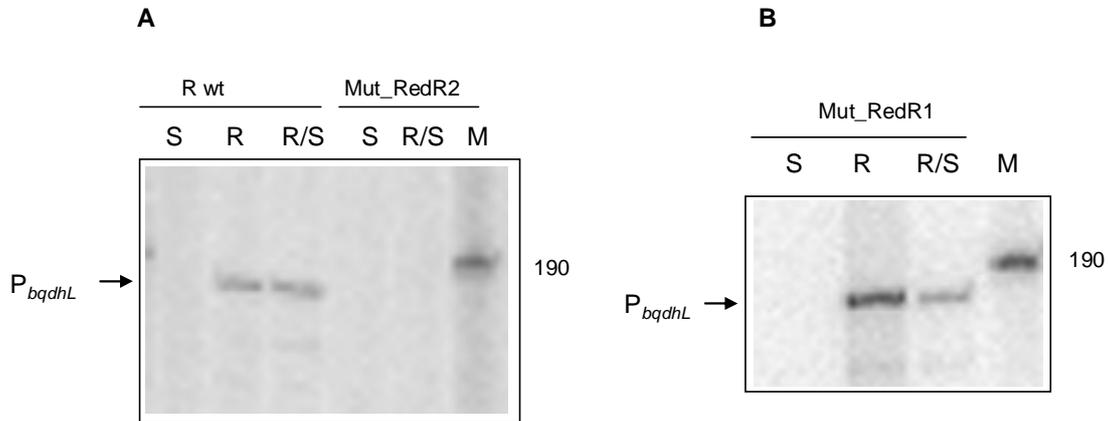


Figura 32. Efecto de la inactivación de los genes reguladores *redR1* y *redR2* sobre la expresión desde el promotor P_{bqdhL} . Extensión a partir de cebador de ARN extraído de A) *Azoarcus* sp. CIB (R+) con succinato 5 mM (S), resorcinol 2mM (R) y resorcinol más succinato 2 y 5 mM respectivamente (R/S); *Azoarcus* sp. CIB (*Mut_redR2*) con succinato 5 mM (S); con resorcinol más succinato 2 y 5 mM (R/S); marcador VIII de peso molecular (M). B) *Azoarcus* sp. CIB (*Mut_redR1*) con succinato 5 mM (S), resorcinol 2 mM (R) y resorcinol más succinato 2 y 5 mM (R/S); marcador VIII (M). A la derecha del marcador se muestra el tamaño en nucleótidos. El oligonucleótido empleado para la reacción de extensión fue priextPyr (Tabla 6) que dio lugar a un producto de extensión de 184 n

Del mismo modo, en el promotor para *orf14* en la cepa *Azoarcus* sp. CIB con el cósmido R+ silvestre o con el cósmido R+ mutante en *redR1* se observaban niveles semejantes de expresión en presencia de resorcinol. Sin embargo en la cepa con el cósmido R+ mutante en *redR2* no se detectaba expresión del promotor (figura 33).

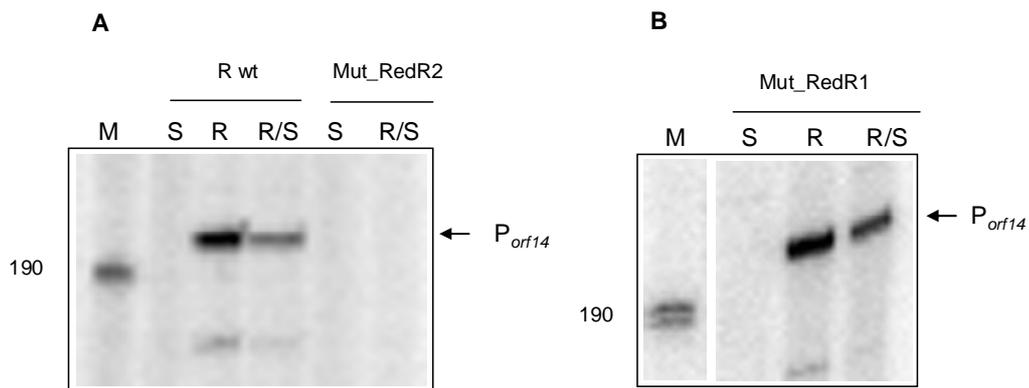


Figura 33. Efecto de la inactivación de los genes reguladores *redR1* y *redR2* sobre la expresión desde el promotor P_{orf14} . Extensión a partir de cebador de ARN extraído de A) *Azoarcus* sp. CIB (R+) con succinato 5 mM (S), resorcinol 2mM (R) y resorcinol más succinato 2 y 5 mM (R/S); *Azoarcus* sp. CIB (*Mut_redR2*) con succinato 5 mM (S); con resorcinol más succinato 2 y 5 mM (R/S); B) *Azoarcus* sp. CIB (*Mut_redR1*) con succinato 5 mM (S), resorcinol 2 mM (R) y resorcinol más succinato 2 y 5 mM (R/S); A la izquierda del marcador se muestra el tamaño de la banda en nucleótidos. El oligonucleótido empleado para la reacción de extensión fue 20X (Tabla 6) que dio lugar a un producto de extensión de 153 n. M indicada el marcador VIII de peso molecular de Roche.

Por tanto, podemos concluir que el regulador RedR2 es esencial para la inducción de los tres promotores, y que se activa por resorcinol o algún intermediario de su ruta de degradación. Por otra parte, y en estas condiciones de ensayo, el regulador RedR1 no parece jugar ningún papel en la inducción de los tres operones. Esto concuerda con el fenotipo de los mutantes (figura 30), ya que *redR2* era esencial para el crecimiento con resorcinol como fuente de carbono y una mutación en *redR1* no afectaba a esta propiedad.

4. BÚSQUEDA DE POSIBLES INDUCTORES ESPECÍFICOS DE LA RUTA DE DEGRADACIÓN DE RESORCINOL

Los resultados anteriores mostraron que sólo había expresión de los tres promotores cuando las cepas crecían con resorcinol como fuente de carbono, y que RedR2, una proteína de la familia de NtrC, era el regulador principal de su expresión. Dado que muchos de los reguladores de esta familia se activan en respuesta a la presencia de un compuesto efector, y que la entrada de resorcinol en la célula implica su transformación en los compuestos intermediarios de la ruta HHQ y HBQ, nuestro siguiente objetivo fue determinar cuál de los tres compuestos era el efector de RedR2 e inductor de la ruta.

4.1. Identificación del inductor de la ruta

Para ello nos propusimos analizar la transcripción de los tres promotores en la cepa *Azoarcus* sp. CIB portadora del cósmido R+ mutado en el primer, segundo o tercer paso de la ruta. En el laboratorio disponíamos de los mutantes necesarios: el mutante en el gen *rhL* del primer paso (Mut_rhL) se describió en el apartado 3.2, y los mutantes de inserción en *btdhS* (Mu_13) para el segundo paso y *bqdhS* (Mu_53) para el tercer paso de la ruta se obtuvieron anteriormente (Darley et al., 2007). Para analizar la expresión desde los promotores en los tres fondos mutantes, nos planteamos realizar ensayos de extensión a partir de cebador con los mutantes *rhL*, incapaz de transformar el resorcinol, *btdhS*, que acumularía HHQ, y *bqdhS*, en el que la ruta llegaría hasta la producción de HBQ (Figura 13).

Como se puede observar en la figura 78, en el mutante en el primer paso de la ruta (*rhL*) no había expresión desde ninguno de los tres promotores, lo que descartaba al resorcinol como inductor de la ruta e implicaba que el efector debía ser un compuesto resultante de su metabolización. Sin embargo, en el mutante en el segundo paso de la ruta (*btdhS*) se mantenía la actividad de los tres promotores en presencia

de resorcinol, lo que apuntaba a la HHQ como inductor directo del sistema. Sorprendentemente, pudimos observar que además de altos niveles de inducción en presencia de resorcinol, este mutante mostraba altos niveles de expresión desde los tres promotores en ausencia de inductor. Es decir, que el mutante en *btdhS* presentaba niveles elevados de expresión basal (constitutiva), que se inducían ligeramente en presencia de resorcinol. En el mutante en el tercer paso de la ruta (*bqdhS*) disminuía la expresión desde los tres promotores. En este mutante el resorcinol se transformaría en HHQ y está en HBQ, que se acumularía. Cabe esperar que en estas condiciones los niveles de HHQ sean inferiores a los del mutante en *btdhS*.

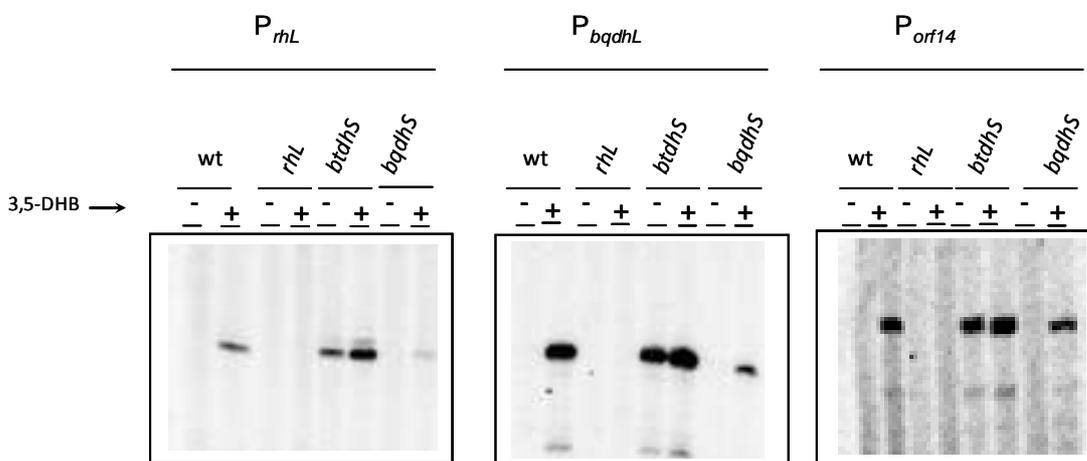


Figura 34. Efecto de mutaciones en los tres primeros pasos de la ruta sobre la inducción de los operones I, II y IV. Extensión a partir de cebador con ARN extraído de *Azoarcus* sp. CIB con el cósmido R+ silvestre (wt) y sus mutantes en el primer paso (*rhL*), segundo (*btdhS*) y tercer paso (*bqdhS*) de la ruta de degradación de resorcinol, cultivados con succinato 5 mM (-) o succinato (5 mM) más resorcinol (2 mM) (+). Los oligonucleótidos empleados fueron priextAlfa, priextPyr y 20X (Tabla 6) que dieron lugar a productos de amplificación de 224 n, 153 n y 184 n, respectivamente

El gen *btdhS* codifica una proteína de 135 aminoácidos en la que se predicen claramente cuatro segmentos transmembrana, lo que sugiere que es una proteína integral de membrana. Presenta homología con proteínas de la familia DoxX (Pfam07681) que no ha sido caracterizada, pero que presenta similitud de secuencia con proteínas de la superfamilia PF04173 que engloba proteínas de membrana poco caracterizadas. El representante mejor estudiado de esta familia, DoxD de la archaee *Acidianus ambivalens*, presenta actividad thiosulfato-quinona oxidorreductasa (Müller *et al.*, 2004; Purschke *et al.*, 1997).

Como podemos ver, parece existir un nivel superior de regulación que va a depender de más factores, además de la presencia del inductor. BtdhS en ausencia del sustrato resorcinol está reprimiendo, directa o indirectamente, la expresión de los promotores.

4.2. Análogos estructurales a la HHQ como posibles inductores de la ruta

La HHQ es un compuesto muy inestable que se oxida rápidamente en presencia de oxígeno. Por otra parte, la presencia de concentraciones menores de 1 mM de HHQ en el medio resultan tóxicas para el crecimiento tanto de *Azoarcus* sp. CIB como de *T. aromatica* AR-1. Efectivamente, estas cepas no pueden usar HHQ como fuente de carbono, ni pueden crecer en otros sustratos en presencia de HHQ. Por ese motivo, nos planteamos buscar análogos estructurales más estables que pudieran ser utilizados como inductores gratuitos de la ruta. La HHQ presenta tres grupos hidroxilo en posición 1,3 y 4. De entre las moléculas aromáticas disponibles en el laboratorio seleccionamos dos que presentaban cierta homología estructural: el catecol, con dos grupos hidroxilo adyacentes, y el protocatecuato (3,4-dihidroxibenzoato), con dos grupos hidroxilo en posición 3 y 4 con respecto al grupo carboxilo (Figura 66).

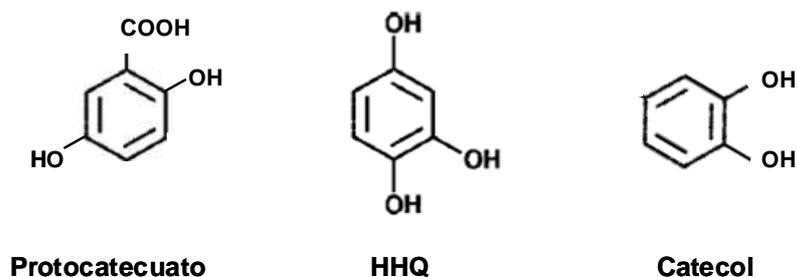


Figura 35. Estructura de las moléculas aromáticas protocatecuato, HHQ y catecol.

Para estudiar el posible efecto inductor de estos compuestos, se extrajo ARN de *Azoarcus* sp. CIB portador del cosmido R cultivado con succinato (5 mM), o succinato (5 mM) suplementado con resorcinol, protocatecuato o catecol (2 mM), y se midió la inducción de los tres promotores mediante extensión a partir de cebador (Figura 67). Como se observa en la figura 80 sólo hubo inducción del promotor cuando

estaba presente el resorcinol. Por tanto, ni protocatecuato ni catecol son capaces de inducir los tres promotores, lo que sugiere que dos hidroxilos adyacentes en el anillo aromático no son la estructura reconocida por el regulador.

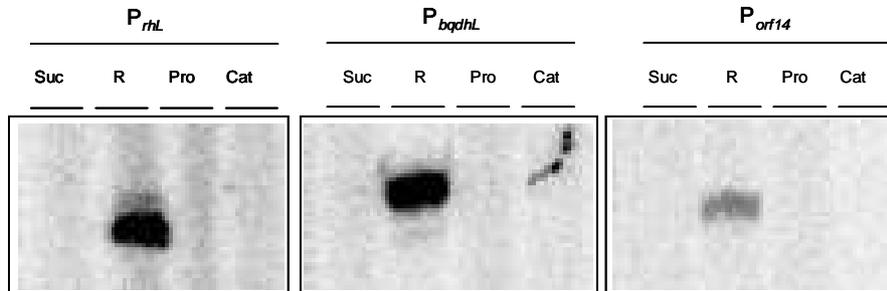


Figura 36. Efecto de la presencia de análogos estructurales a la HHQ sobre la inducción de los operones I, II y IV. Extensión a partir de cebador con ARN extraído de *Azoarcus* sp. CIB con el cósmido R+ crecido con succinato (5 mM) (Suc) y succinato (5 mM) suplementado con resorcinol (2 mM) (R), con protocatecuato (2 mM) (Pro) y con catecol (2 mM) (Cat). Los oligonucleótidos empleados fueron priextAlfa (para P_{rhL}), priextPyr (para P_{bqdhL}) y 20X (para P_{orf14}) (Tabla 6), que dieron lugar a productos de amplificación de 224 n, 153 n y 184 n, respectivamente.

**CAPÍTULO II: DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES INVOLUCRADOS
EN LA DEGRADACIÓN DE α -RESORCILATO (3,5-DIHIDROXIBENZOATO) EN
Thauera aromatica AR-1**

CAPÍTULO II: DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES INVOLUCRADOS EN LA DEGRADACIÓN DE α -RESORCILATO (3,5-DIHIIDROXIBENZOATO) EN *Thauera aromatica* AR-1

1. DETECCIÓN DE LOS GENES DE DEGRADACIÓN DE 3,5-DHB

La cepa *T. aromatica* AR-1 es capaz de crecer utilizando el compuesto aromático α -resorcilato (3,5-dihidroxi benzoato) como única fuente de carbono y energía. Las reacciones propuestas para la degradación de 3,5-DHB son similares a las descritas y caracterizadas para la degradación anaerobia de resorcinol (1,3-dihidroxi benzeno) en *A. anaerobius*. En esta cepa el primer paso de la ruta es una hidroxilación del anillo aromático hasta hidroxihidroquinona (HHQ), que es oxidada para dar hidroxibenzoquinona (HBQ) y posteriormente metabolizada hasta malato y acetato (Figura 12A, Introducción) (Philipp & Schink, 1998). De forma similar la degradación de 3,5-DHB en *T. aromatica* empieza con una hidroxilación para dar 2,3,5-trihidroxi benzoato, que es posteriormente descarboxilado hasta HHQ (Figura 13, Introducción). Dado que el primer paso de las dos rutas propuestas era similar, y que el compuesto intermedio formado (HHQ) era idéntico, nos propusimos utilizar esta homología para identificar en *T. aromatica* AR-1 los genes para la degradación de 3,5-DHB. Para ello, en primer lugar, se construyó una genoteca del ADN cromosómico de *T. aromatica* AR-1 en el cósmido pLAFR3 (ver apartado 8 de materiales y métodos) y se utilizaron dos estrategias para buscar los genes de interés: a) búsqueda por homología de secuencia (PCR y *Southern blot*); b) búsqueda por ganancia de función.

1.1 Búsqueda por homología con genes de la ruta de degradación de resorcinol de *Azoarcus anaerobius*

En primer lugar se buscó la presencia en el cromosoma de *T. aromatica* AR-1 de genes homólogos a los de degradación de resorcinol en *A. anaerobius*. Para ello se hicieron ensayos de *Southern blot* con ADN genómico de *T. aromatica* AR-1 usando como sonda fragmentos de ADN que contenían secuencias parciales de los genes para la degradación de resorcinol en *A. anaerobius*. Como controles positivo y negativo se usó ADN de *A. anaerobius* y *P. putida* KT2440, respectivamente. El ADN se digirió con las enzimas *Pst*I y *Eco*RI y se transfirió a una membrana de nylon. Se utilizaron sondas obtenidas a partir de los genes de *A. anaerobius*: *rhL*, para la subunidad mayor de la resorcinol hidroxilasa (sonda AT-H) y *bqdhL*, que forma parte

del complejo HBQ deshidrogenasa para la rotura del anillo aromático (sonda PyDHE2) (Figura 13B de la Introducción; Tabla 9).

Tabla 9. Sondas utilizadas para la búsqueda de genes por homología de secuencia

Sonda	Tamaño (pb)	Posición en la secuencia de <i>A. anaerobius</i>
20X	1540	Desde el codón 624 de <i>orf15</i> hasta el codón 22 de <i>orf13</i>
A-TH	389	Desde el codón 487 de <i>rhL</i>
PyDHE2	2750	Contiene <i>bqdhL</i> completo y <i>bqdhS</i> hasta el codón 21

Como se observa en la figura 37, con las sondas A-TH y PyDHE2 se detectó una señal positiva con el cromosoma de *A. anaerobius* (control positivo) y *T. aromatica* AR-1, pero no hubo hibridación con *P. putida* KT2440 (control negativo). Esto sugeriría que en *T. aromatica* AR-1 existían genes homólogos a algunos genes de la ruta de degradación de resorcinol en *A. anaerobius*.

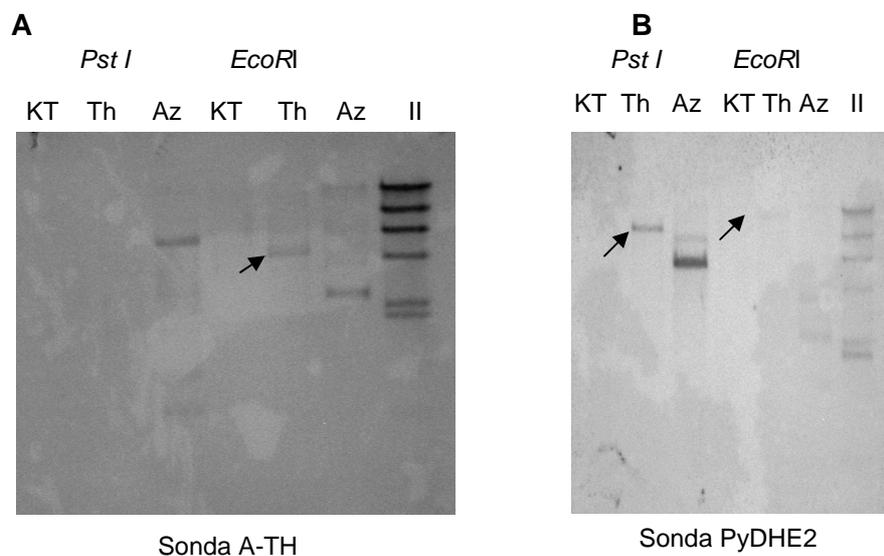


Figura 37. Hibridación *Southern* de ADN cromosómico de *Pseudomonas putida* KT2440 (KT), *Thauera aromatica* AR-1 (Th) y *Azoarcus anaerobius* (Az) digeridos con *PstI* o *EcoRI* e hibridado con las sondas A-TH (A) y PyDHE2 (B).

Paralelamente, se realizaron reacciones de PCR utilizando como molde ADN genómico de *T. aromatica* AR-1 y *A. anaerobius* (control positivo) y cebadores para amplificar los genes *rhL* (389 pb), *bqdhL* (2750 pb), *bqdhS* (1679 pb), *orf13* (1539 pb) y

orf14 (1540 pb) de *A. anaerobius* (Darley et al, 2007). No se obtuvo producto de amplificación en ningún caso (ver oligonucleótidos en Tabla 3 de Materiales y Métodos).

1.2 Identificación de cósmidos portadores de genes para la degradación de 3,5-DHB en la genoteca de *T. aromatica* AR-1

Una vez comprobada la presencia en *T. aromatica* AR-1 de dos regiones homólogas a los genes *rhL* y *bqdhL* para la degradación de resorcinol en *A. anaerobius*, nuestro siguiente objetivo era identificar en la genoteca de *T. aromatica* AR-1 un cósmido portador de los genes detectados en el cromosoma. Para ello, mediante hibridación en colonia con las sondas AT-H, PyDHE2 y 20X con homología al gen *orf14*, que codifica para una NADH-flavín oxidoreductasa, esencial para la degradación de resorcinol (Tabla 9) se seleccionaron una serie de clones positivos que hibridaban con una o varias de las sondas seleccionadas. Se extrajo ADN de cósmido de las colonias positivas seleccionadas, se digirió con distintas enzimas de restricción y se transfirió a membranas de nylon, y posteriormente se hibridó con las mismas sondas. La figura 38 muestra como ejemplo la restricción de algunos de los cósmidos seleccionados de la genoteca y su hibridación con la sonda 20X.

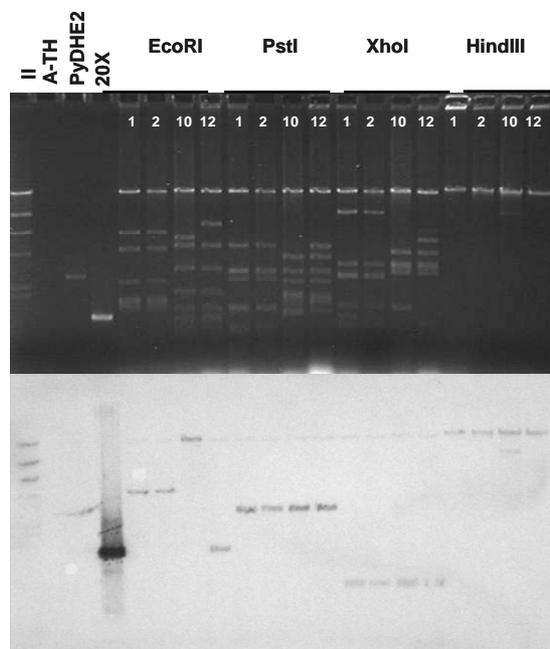


Figura 38. Restricción de cósmidos de la genoteca de *T. aromatica* AR-1. Restricción (arriba) e hibridación Southern con la sonda 20X (abajo) de los cósmidos 1, 2, 10 y 12 de la genoteca de *T. aromatica* AR-1. Como control positivo se utilizaron los fragmentos de ADN de los genes *rhL* (A-TH), *bqdhL* (PyDHE2) y *orf14* (20X). Como marcador de peso molecular se utilizó el marcador II de Roche, que contiene el fago lambda cortado con *HindIII*.

Siguiendo este procedimiento se preseleccionaron 20 cósmidos positivos. Finalmente se seleccionaron tres cósmidos porque hibridaban con dos de las sondas ensayadas (pCOS4 y pCOS12), o porque presentaban un tamaño mayor (pCOS1).

Para confirmar la presencia en los cósmidos de genes homólogos a los de la ruta de degradación de resorcinol, se subclonaron algunos fragmentos de cada cósmido en el plásmido pBlueScript SK. Los distintos clones obtenidos se secuenciaron con los oligonucleótidos universales U21 y R21 (tabla 3) y las secuencias obtenidas (entre 0,5 y 2 Kb) se compararon con secuencias depositadas en la base de datos empleando BLASTX. En las secuencias obtenidas se detectó una alta homología con varios genes para la degradación de resorcinol de *A. anaerobius* (Tabla 10), lo que parecía confirmar la presencia en *T. aromatica* AR1 de una ruta de degradación de 3,5-DHB homóloga a la ruta de *A. anaerobius*.

Tabla 10. Primeras secuencias detectadas con homología a genes para la degradación de resorcinol en *A. anaerobius*

Cósmido	Tamaño del fragmento clonado en pBSK (Kb)	Gen de <i>A. anaerobius</i>	Tamaño de secuencia enviado a blastx (pb)	% Identidad	% Similitud	E value ⁽¹⁾
pCOS1	4	<i>orf13</i>	1866	92	97	0.0
pCOS4	3	<i>rhS</i>	799	48	60	1e-38
pCOS4	5	<i>bqdhL</i>	925	83	92	5e-148
pCOS4	2	<i>bqdhS</i>	1006	68	86	3e-57
pCOS4	5	<i>bqdhM</i>	864	77	86	5e-20
pCOS4	2	<i>orf5</i>	897	74	85	5e-75
pCOS12	4	<i>rhL</i>	2251	63	78	0.0

⁽¹⁾Resultado del análisis con blastx usando la base de datos de proteínas no redundante (nr)

Paralelamente, y dado que los genes para la degradación de resorcinol de *A. anaerobius* se identificaron expresando una genoteca del genoma de la cepa en un huésped heterólogo y seleccionando la capacidad de crecer anaeróbicamente con resorcinol como fuente de carbono (Darley et al, 2007), ensayamos una estrategia similar con la genoteca de *T. aromatica* AR-1. Mediante conjugación triparental se transfirió la genoteca de *T. aromatica* AR-1 construida en la cepa *E. coli* HB101 a *Azoarcus* sp. CIB, que no es capaz de degradar 3,5-DHB, empleando *E. coli* pRK600 como cepa colaboradora (ver apartado 5.1 de Materiales y Métodos). La mezcla de

conjugación se incubó en condiciones desnitrificantes en medio líquido Widdel con succinato 5 mM como fuente de carbono, y posteriormente se transfirió a medio selectivo Widdel con 3,5-DHB como única fuente de carbono. El ensayo se repitió 3 veces, pero en ningún caso se obtuvo crecimiento tras siete días de incubación, posiblemente porque ningún cósmido de la genoteca contenga la ruta completa.

2. SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN CODIFICANTE DE LA RUTA DE DEGRADACIÓN DE 3,5-DHB DE *T. aromatica* AR-1

De los cósmidos seleccionados por hibridación con sondas específicas, el cósmido pCOS4 fue el que presentó un mayor número de secuencias con homología a genes para la degradación de resorcinol en *A. anaerobius* (Tabla 10), por lo que se eligió para su secuenciación completa. Ésta se llevó a cabo mediante “*Shotgun library construction*” en la empresa Macrogen Inc. (Seúl, Corea). Como resultado de la secuenciación se obtuvieron cuatro contigs: contig 1 (524 pb), contig 2 (475 pb), contig 5 (11503 pb) y contig 7 (11035 pb). Una primera comparación de las secuencias con las bases de datos utilizando BLASTX permitió definir varias pautas abiertas de lectura (ORF) con homología con genes bacterianos, y especialmente con los genes de la ruta de degradación de resorcinol en *A. anaerobius*. El contig 5 incluía una ORF con gran similitud con el gen de la subunidad pequeña de la resorcinol hidroxilasa y con la *orf13* de *A. anaerobius*, además de otras 10 ORFs con homología entre otras con una cupina, una proteína hipotética, deshidrogenasa y un transportador TRAP. Por otro lado, en el contig 7 se detectaron 2 ORFs con homología con *bqdhM* y *bqdhL* de *A. anaerobius* además de 4 ORFs completas y 2 ORFs truncadas. Finalmente, el contig 1 presentaba una ORF truncada con homología con un regulador de la familia de LysR y el contig 2 una ORF truncada con homología con una antitoxina de fago.

Las secuencias de los dos contigs de mayor tamaño se ensamblaron secuenciando el producto de PCR de 819 pb obtenido de amplificar ADN genómico de *T. aromatica* AR-1 con una pareja de oligonucleótidos del extremo de los contigs, resultando un único segmento de 23598 pb. Un análisis más detallado de la secuencia obtenida y la comparación con las bases de datos nos permitió identificar 20 ORFs (Figura 39).

Dado que la secuencia de pCOS4 incluía 11 dianas *Pst*I, enzima utilizada para las restricciones parciales en la construcción de la genoteca, se analizó especialmente la concordancia de la secuencia a ambos lados de cada diana *Pst*I con las secuencias homólogas en las bases de datos. La secuencia situada a ambos lados del sitio *Pst*I

en posición 4972 (marcado en azul en la figura 39), situado al principio de la ORF anotada como *dbhS* no conservaba la pauta de lectura ni el sentido, por lo que dedujimos que se había formado una quimera, uniéndose dos fragmentos *PstI* que no eran contiguos en el cromosoma. Por lo tanto, la región continua del cromosoma secuenciado en pCOS4 contenía 17 ORFs en un segmento de 18,6 Kb.

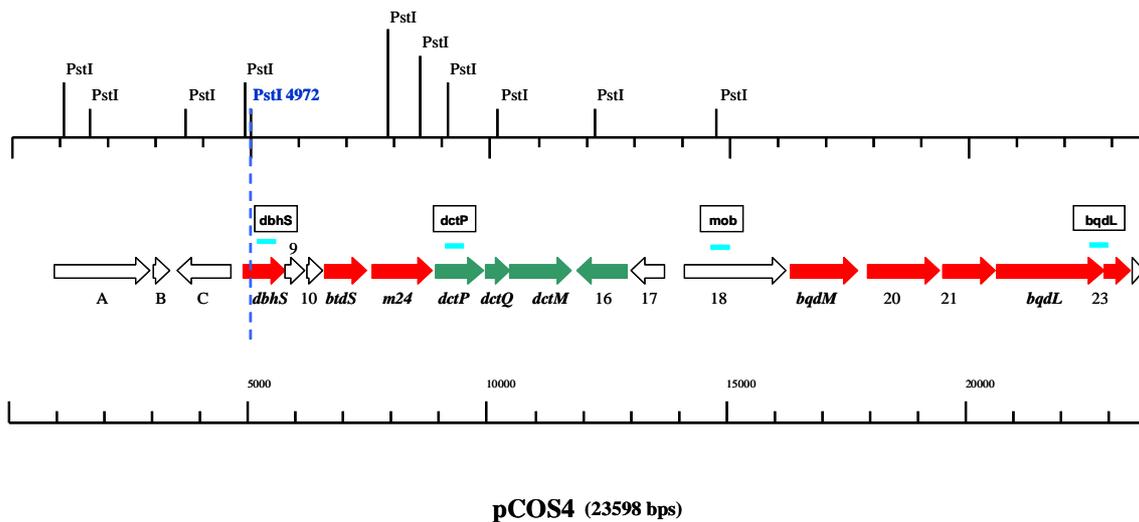


Figura 39. Mapa completo del cósmido pCOS4 dónde se indican los marcos abiertos de lectura y su anotación basada en la homología presentada al compararlos con la base de datos empleando BLASTX. En turquesa se muestra la posición relativa de las sondas *dbhS*, *dctP*, *mob* y *bqdL* empleadas en el segundo rastreo de la genoteca para buscar secuencias contiguas a la encontrada en pCOS4. En verde se resaltan las ORFs con homología a genes que forman parte de un transportador tipo TRAP. En rojo se resaltan las ORFs que presentaron homología con genes para la degradación de resorcinol en *A. anaerobius*

Teniendo en cuenta que pCOS4 no contenía todos los genes para la degradación de 3,5-DHB, decidimos realizar un segundo rastreo de la genoteca para seleccionar un conjunto de cósmidos que contuvieran la secuencia flanqueante a ambos lados del cósmido pCOS4. Para ello diseñamos sondas que hibridaban con la ORF anotada como *dbhS* (sonda *dbhS*) o con un fragmento comprendido entre la ORF anotada como *bqdL* y *orf23* (sonda *bqdL*) del otro extremo del cósmido (Figura 39). Se obtuvieron 29 nuevos clones positivos, que junto a los 20 clones seleccionados inicialmente se analizaron mediante hibridación en colonia con nuevas sondas homólogas a varios de los genes presentes en pCOS4 (Tabla 11). Este grupo de sondas incluía los extremos de pCOS4, el gen presente en pCOS12 con homología con *rhL* de *A. anaerobius* (Tabla 10) (sonda *dbhL*), contigua a *rhS* en esta cepa. También se empleó una sonda que hibridaba con una secuencia encontrada en el contig 1 con homología a reguladores de la familia LysR (sonda *lysR*) y que habíamos

visto que se encontraba en el otro extremo del cósmido pCOS4. Sondas que hibridaban con los genes anotados como *orf18* (sonda *mob*) y *dctP* (sonda *dctP*), situados en el centro del cósmido pCOS4 se utilizaron para descartar aquellos cósmidos que tuvieran demasiada secuencia solapante con pCOS4. Los resultados obtenidos nos permitieron seleccionar cuatro clones: dos que hibridaban con las sondas de uno de los extremos de pCOS4 (pCOS2B y pCOS6B), y otros dos que hibridaban con sondas del otro extremo (pCOS12 y pCOS19) (Tabla 12).

Tabla 11. Sondas utilizadas para la búsqueda de cósmidos solapantes a pCOS4

Sonda	Tamaño (pb)	Posición en la secuencia de <i>T. aromatica</i>
<i>dbhL</i>	411	Desde el codón 858 de <i>dbhL</i>
<i>dbhS</i>	584	Desde el codón 202 de <i>dbhS</i> hasta el codón 103 de <i>orf9</i>
<i>dctP</i>	650	Desde el codón 97 de <i>dctP</i>
<i>mob</i>	819	Desde el codón 329 de <i>orf18</i>
<i>bqdl</i>	400	Desde el codón 645 de <i>bqdl</i> hasta el codón 35 de <i>orf23</i>
<i>lysR</i>	320	Desde el codón 23 de <i>orf25</i>

Tabla 12. Hibridación de las sondas *dbhL*, *dbhS*, *dctP*, *mob*, *bqdl* y *lysR* con los cósmidos de la genoteca de *T. aromatica* AR-1. En esta tabla sólo se presentan los cósmidos que hibridaron con al menos una de las sondas. Sombreado en azul los cósmidos seleccionados para la pirosecuenciación

cósmido	sonda					
	<i>dbhL</i>	<i>dbhS</i>	<i>dctP</i>	<i>mob</i>	<i>bqdl</i>	<i>lysR</i>
pCOS1B		X	X	X	X	X
pCOS2B				X	X	X
pCOS4B			X	X	X	X
pCOS5B			X	X	X	X
pCOS6B				X	X	X
pCOS7B				X	X	X
pCOS9B			X	X	X	X
pCOS21B		X				
pCOS27B		X				
pCOS1		X	X			
pCOS2		X	X			
pCOS3			X	X	X	X
pCOS4		X	X	X	X	X
pCOS5		X				
pCOS6		X	X	X	X	X
pCOS7				X	X	X
pCOS8		X				
pCOS9		X	X			
pCOS10	X	X				
pCOS11			X			
pCOS12	X	X				
pCOS13		X	X	X	X	X
pCOS14				X	X	X
pCOS15		X	X	X	X	X
pCOS16			X	X	X	X
pCOS17						
pCOS18		X	X	X	X	X
pCOS19	X	X				

Estimando que el conjunto de los 4 cósmidos seleccionados cubrían una región del cromosoma no superior a 60 Kb, optamos por secuenciar los cuatro cósmidos como una única muestra utilizando pirosecuenciación con la tecnología Nextgen GSFLX titanium. Considerando un tamaño medio de 50 Kb por cósmido, y la recomendación de buscar una cobertura de 20X en la pirosecuenciación con el sistema de secuenciación 454, era necesario secuenciar un total de 4 Mb. Esto se llevó a cabo secuenciando los cuatro cósmidos sin etiquetar en un único “pool”, realizando una carrera mínima de 10 Mb, en la empresa GATC-Biotech (Konstanz, Alemania). Como resultado de la secuenciación masiva de los cuatro cósmidos se obtuvieron 49 contigs de distinta longitud. El más grande correspondía a la secuencia del vector pLAFR3 (20726pb), seguido de un contig de 13363 pb con homología con secuencias del genoma de la cepa *Thauera* sp. MZ1T relacionados con la respiración de nitrato (Kreft & Schink, 1994). En un contig de 8942 pb encontramos secuencia conocida de pCOS4, que incluía desde la *orf18* hasta *bqdB*. La secuencia corriente arriba de *dbhS* se localizó en un contig de 7233 pb, que pudimos ensamblar mediante PCR con un contig de 7029 pb, que definía uno de los extremos del *cluster* de genes de degradación de 3,5-DHB. El otro extremo del cluster se encontró en el ensamblaje de dos contigs de 1300 y 1200 pb, que incluían el regulador de la familia LysR. Como resultado final se generó una secuencia completa de 33905 pb.

3. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA: ANOTACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN LA DEGRADACIÓN ANAERÓBICA DE 3,5-DHB

3.1 Análisis de secuencia. Búsqueda de los marcos abiertos de lectura (ORFs)

Un análisis en detalle de la secuencia reveló la existencia de 25 marcos abiertos de lectura (ORFs) que se compararon con las secuencias de genes y proteínas depositados en la base de datos NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Figura 40). Este análisis reveló que muchas ORFs presentaban una gran similitud con proteínas para la degradación de resorcinol en *A. anaerobius*, lo que sugería que estos genes estaban involucrados en la degradación de 3,5-DHB en *T. aromatica* AR-1.



Figura 40. Esquema de la región completa resultante de la secuenciación de los cósmidos pCOS2B, 6B, 12, 19 y 4. El tamaño total es de 33905 pb, las flechas representan a escala los 24 marcos abiertos de lectura, con dos genes truncados a ambos extremos de la secuencia. En rojo se representan las ORFs con homología a genes para la degradación de resorcinol en *A. anaerobius*, en azul dos ORFs con homología a reguladores de la familia LysR, en morado *korAB* que codifica la enzima KGOR en *T. aromatica* y en verde las ORFs que codifican proteínas que forman parte de un transportador TRAP.

Para la anotación de la secuencia resultante se utilizaron varias aproximaciones bioinformáticas. Una de ellas fue la herramienta BLAST2GO de anotación funcional (<http://www.blast2go.org>) que permite la anotación funcional automática de un grupo de secuencias basándose en Gene Ontology (Conesa et al, 2005; Götz et al, 2008). Paralelamente, se hicieron búsquedas de cada ORF en BLAST utilizando la base de datos de proteínas no redundantes (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), análisis de homología estructural utilizando SwissModel (<http://swissmodel.expasy.org/>), Geno3D (<http://pbil.ibcp.fr/htm/index.php>) o Phyre2 (Kelley & Sternberg, 2009), y predicción de posibles segmentos transmembrana y señales de procesamiento utilizando DAS (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>), Predictprotein (<http://www.predictprotein.org/>), TMPred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) y SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

Tres de las 24 ORFs (8, 9 y 24) se traducen desde el codón de inicio alternativo GUG (valina), lo que supone un 8% del total de ORFs del cluster. Esto contrasta con el 1% de codones alternativos encontrados en la cepa *Thauera* sp. MZ1T y se asemeja al 12,5% del porcentaje medio de codones GUG en otras especies bacterianas (Starmer et al, 2006). Todas las ORFs excepto orf1, orf3, ORF7 y orf19 conservan una secuencia Shine-Dalgarno que se localiza a una distancia de entre 4 y 10 nucleótidos aguas arriba del codón de inicio de la traducción, siendo en la mayoría de los casos 7 nucleótidos. Esta secuencia presenta el consenso AGGAGG, complementario a la secuencia del extremo 3' del rRNA 16S de *T. aromatica*.

La tabla 13 resume el resultado del análisis y recoge las características de las ORFs indicadas, su similitud con otras proteínas de las bases de datos y la distancia entre ORFs adyacentes.

Además de las ORFs listadas en la tabla 13, al principio de la secuencia hay 1209 pb (403 aa) correspondientes a un gen truncado que presenta un 45 % de identidad con una serín treonín fosfatasa de *Desulfohalobium retbaense* DSM 5692. Igualmente, entre las *orf3* y *orf5* encontramos una secuencia de aproximadamente 1 kb que presenta homología (73% de identidad) con la subunidad periplásmica de los transportadores tipo TRAP. Sin embargo, no hemos identificado el codón de fin de traducción por lo que no lo anotamos como ORF.

Tabla 13. Propiedades de los genes y productos génicos de la secuencia parcial de *T. aromatica* AR-1

Propiedades					Productos génicos relacionados					
GEN	% GC	D ¹ (pb)	Tamaño (aa/kDa)	pI	% Sim ²	% ID ³	E value mínimo	Número de acceso	Función hipotética de la secuencia homóloga de proteína más próxima	Organismo
<i>orf1</i>	69	8	410/44,8	9.07	68	74	2e-148	ACK54553.1	Glicosiltransferasa	<i>Thauera sp. MZ1T</i>
<i>orf2</i>	65	626	260/29,8	7.38	74	83	5e-110	ACK54554.1	Metalofosfoesterasa	<i>Thauera sp. MZ1T</i>
<i>orf3</i>	67		308/33,2	9.59	53	56	1e-63	EED66667.1	Regulador familia LysR	<i>Comamonas testosteroni</i>
<i>orf5</i>	70	2	576/60,5	6.38	69	100	0.0	CAA12243.2	Subunidad α de la oxoglutarato ferredoxin oxidorreductasa	<i>Thauera aromatica</i>
<i>orf6</i>	70	376	307/32,6	6.70	79	97	4e-157	CAD27440.1	Subunidad β de la oxoglutarato ferredoxin oxidorreductasa	<i>Thauera aromatica</i>
<i>dbhL</i>	65	-	981/110,6	7.02	60	60	0.0	ABK58620.1	Subunidad α de la resorcinol hidroxilasa	<i>Azoarcus anaerobius</i>
<i>dbhS</i>	65	15	288/32,3	7.10	58	53	3e-79	ABK58619.1	Subunidad β de la resorcinol hidroxilasa	<i>Azoarcus anaerobius</i>
<i>orf9</i>	62	20	137/15,9	5.65	50	29	5e-06	EFW04169.1	Manosa-1-fosfato guanililtransferasa	<i>Coprobacillus sp. 29_1</i>
<i>orf10</i>	68	30	114/11,9	6.06	45	28	0.35	EEP26949.1	Desconocida	<i>Abiotrophia defectiva</i>
<i>btdL</i>	74	102	293/29,5	6.0	63	50	8e-69	ABM15958.1	6-fosfogluconato deshidrogenasa	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i>
<i>orf12</i>	67	98	417/46,5	5.50	68	93	0.0	ABK58632.1	Peptidasa familia M24	<i>Azoarcus anaerobius</i>
<i>dctP</i>	68	72	321/35,2	6.99	53	40	2e-56	CAL95041.1	Proteína periplásmica (transportador TRAP)	<i>Azoarcus sp. BH72</i>
<i>dctQ</i>	67	4	163/17,8	9.73	52	34	8e-07	CAL95042.1	Pequeña permeasa (transportador TRAP)	<i>Azoarcus sp. BH72</i>
<i>dctM</i>	64	123	423/44,4	5.21	64	50	6e-95	CAL95043.1	Permeasa (transportador TRAP)	<i>Azoarcus sp. BH72</i>
<i>orf16</i>	66	100	344/37,9	7.77	66	57	2e-108	ACB33601.1	receptor extracitoplásmico (transportador TRAP)	<i>Leptothrix cholodnii SP-6</i>
<i>orf17</i>	74	382	237/25,3	7.68	65	60	6e-72	EFI59106.1	Hidrolasa $\alpha\beta$	<i>Comamonas testosteroni</i>
<i>orf18</i>	67	64	716/80,0	6.16	60	53	0.0	CAJ71291.1	Molibdopterina oxidorreductasa	<i>Cand. Kuenenia stuttgartiensis</i>
<i>bqdM</i>	69	193	467/49,9	6.26	80	75	0.0	BAI72155.1	dihidrolipoamida deshidrogenasa	<i>Azospirillum sp. B510</i>
<i>orf20</i>	68	89	499/53,0	5.49	83	72	0.0	ACD96487.1	semialdehido succinico deshidrogenasa	<i>Geobacter lovleyi SZ</i>
<i>orf21</i>	70	71	354/38,5	6.21	59	46	2e-81	ABK58627.1	familia p47k	<i>Azoarcus anaerobius</i>
<i>bqdL</i>	70	12	735/78,7	5.64	75	74	0.0	ABK58621.1	Subunidad α de la benzoquinona deshidrogenasa	<i>Azoarcus anaerobius</i>
<i>orf23</i>	68		182/20,2	5.95	72	73	1e-74	ABK58617.1	glyoxalasa	<i>Azoarcus anaerobius</i>
<i>bqdS</i>	72	52	437/44,5	5.98	65	54	5e-121	CAM75497.1	componente E2 del complejo piruvato/ α -cetoglutarato deshidrogenasa	<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i>
<i>orf25</i>	68	134	317/34,5	7.20	52	33	1e-36	AAZ63058.1	Regulador familia LysR	<i>Ralstonia eutropha</i>

¹ Distancia a gen siguiente² % de similitud medio con proteínas homólogas de las bases de datos³ % de identidad con la proteína homóloga más próxima

Las cuatro primeras ORFs de la región secuenciada no parecen guardar relación con la degradación de 3,5-DHB. El producto de la *orf1* presenta una identidad del 74% con una glicosiltransferasa de grupo 1 de *Thauera* sp. MZ1T, enzima que cataliza la transferencia de un azúcar de una molécula donadora activada a una molécula aceptora específica. El producto de la *orf2*, con una identidad del 83% con una metalofosfoesterasa de *Thauera* sp. MZ1T, pertenece a la superfamilia de las metalofosfatasa (MPPs), que engloba a una gran diversidad de fosfoesterasas. Estas proteínas conservan un dominio activo consistente en dos iones metálicos, normalmente manganeso, hierro o zinc unidos a residuos de aspártico, histidina o asparragina.

El producto de la *orf3* presenta un 56% de identidad con un regulador transcripcional perteneciente a la familia LysR de *Camamonas testosteroni* KF-1. Cerca del extremo amino se puede identificar el típico dominio hélice-giro-hélice de unión al ADN.

Los productos de las *orf5* y *orf6* presentan homología con dos proteínas adyacentes en el cromosoma de *Thauera aromática* K172 (Breese et al, 1998) y de *Thauera* sp. MZ1T (NC_011662.2). El producto de *orf5* tiene un 100 % de identidad con la subunidad alfa de la 2-oxoglutarato ferredoxin-oxidoreductasa (KGOR, gen *korA*) de *T. aromática* K172, conserva en el extremo amino un dominio piruvato oxidoreductasa (POR) y un típico dominio de unión a tiamina pirofosfato (TPP) en la región central. El producto de *orf6* tiene un 97 % de identidad con la subunidad beta de la 2-oxoglutarato ferredoxin-oxidoreductasa (gen *korB*) de *T. aromática* K172, que incluye un dominio de unión a TPP. En esta cepa, *korAB* están situados junto al operón *bad* que codifica la ruta de degradación anaerobia de benzoato (Breese et al, 1998), y su expresión se induce entre diez y cincuenta veces en presencia de un sustrato aromático. Estudios bioquímicos y fisiológicos han podido demostrar que la función de esta proteína es regenerar la ferredoxina reducida necesaria para la reducción del benzoil-CoA por la benzoilCoA reductasa, enzima esencial en el metabolismo anaerobio de compuestos aromáticos (Dorner & Boll, 2002). En *T. aromática* AR1, la expresión de estos genes es independiente de la presencia de 3,5-DHB (ver más adelante).

El producto de la *ORF7* muestra una identidad del 53,7 % con el producto del gen *rhL* de *A. anaerobius*, que codifica la subunidad grande de la resorcinol hidroxilasa, primer paso de la ruta anaerobia de degradación de resorcinol (Darley et al, 2007). Presenta un dominio de unión a molibdopterina y pertenece a la superfamilia MopB (*molibdopterin binding proteins*), que engloba a una gran diversidad y heterogeneidad

Figura 41. Alineamiento múltiple entre el producto de *orf7* de *T. aromatica* AR-1, RhL de *A. anaerobius* y AthL de *P. acidigacilli*. En el extremo N-terminal se resalta en turquesa las argininas gemelas. En azul se marca el dominio molibdopterina oxidorreductasa y en verde el dominio de unión a molibdopterina. En amarillo se resaltan algunos residuos esenciales; como la Ser 175 de coordinación de molibdeno, la His 144 necesaria para la unión entre el sustrato y la molibdopterina y la Tir 560 que forma parte del centro activo crítico para la unión del sustrato. En el extremo N-termina, subrayadas en turquesa se representan las argininas gemelas (RR), motivo diana de chaperonas

El producto de la *orf8*, muestra una identidad del 53 % con el producto del gen *rhS* de *A. anaerobius*, que codifica la subunidad pequeña (beta) de la resorcinol hidroxilasa (Darley et al, 2007). Se puede clasificar dentro de la familia DMSO reductasas de tipo II, siendo esta la subunidad, portadora de centros sulfoférricos. En la pirogalol transhidroxilasa de *P. acidigallici*, con la que presenta una homología del 58%, esta subunidad (gen *bthL*) contiene 3 centros sulfoférricos del tipo [4Fe-4S] cuya función no está definida. El producto de *orf8* parece conservar dos de los tres centros sulfoférricos [4Fe-4S] de BthL de *P. acidigallici*, al igual que ocurre en RhS de *A. anaerobius* (Figura 42).

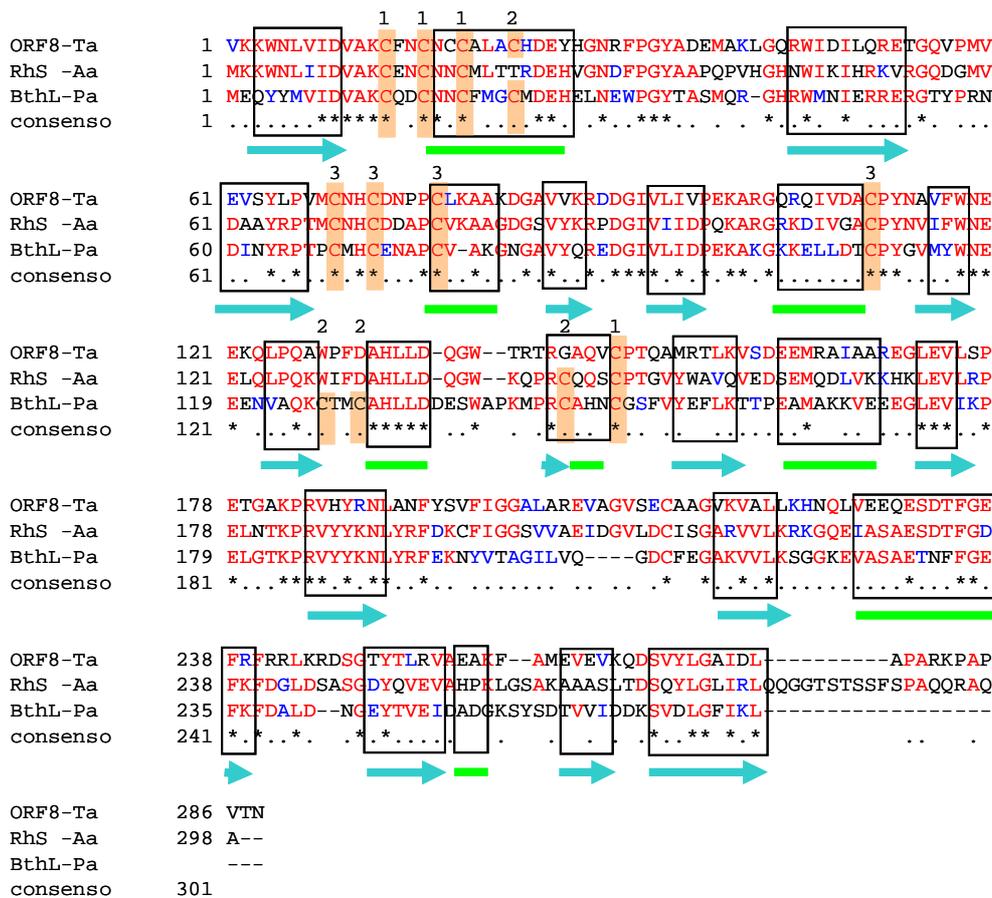


Figura 42. Alineamiento del producto de *orf8* de *T. aromatica* AR-1, RhS de *A. anaerobius* y BthL de *P. acidigacilli*. En los recuadros se pueden observar la estructura secundaria conservada, láminas beta (flechas azules) y hélices alfa (barras verdes). 1 y 3 representan las cuatro cisteínas (C) conservadas de sendos dominios sulfoférricos [4Fe-4S]. 2 representa las cuatro cisteínas (C) del dominio sulfoférrico [4Fe-4S] de *P. acidigacilli* que no está conservado en ORF8 y RhS.

El dominio amino terminal de la pirogallol transhidroxilasa presenta homología estructural con fibronectinas, lo que sugiere que podría estar asociada a la membrana a través de esta subunidad (Messerschmidt et al, 2004). A este grupo pertenecen también proteínas periplásmicas de respiración anaeróbica, como la nitrato reductasa NAP de *Desulfovibrio desulfuricans* (Dias et al, 1999) y proteínas citoplásmica como la nitrato reductasa A de *E. coli* codificada por los genes *narGHI* (Bertero et al, 2003).

El producto de la *orf9* presenta una similitud media del 50% con manosa-1-fosfato guanilil transferasas, y un máximo del 28% de identidad con una proteína desconocida de *Coprobacillus* sp. 29_1, que pertenece a la superfamilia de las cupinas. Estas proteínas se denominan así por presentar una estructura conservada de barril beta en forma de copa constituida por hojas plegadas beta (Dunwell et al, 2004). En el *cluster* de genes para la degradación de resorcinol de *A. anaerobius* también se encuentra un gen cuyo producto es homólogo a proteínas con estructura de cupinas. Pese a carecer de homología entre sí a lo largo de la secuencia (< 15% de homología), es posible modelar las dos proteínas utilizando como molde las mismas estructuras disponibles en las bases de datos, entre ellas 2VQA_C, que corresponde a MncA, la proteína de unión a manganeso más abundante en la cianobacteria *Synechococcus* 6803 (Tottey et al, 2008) (Figura 43).

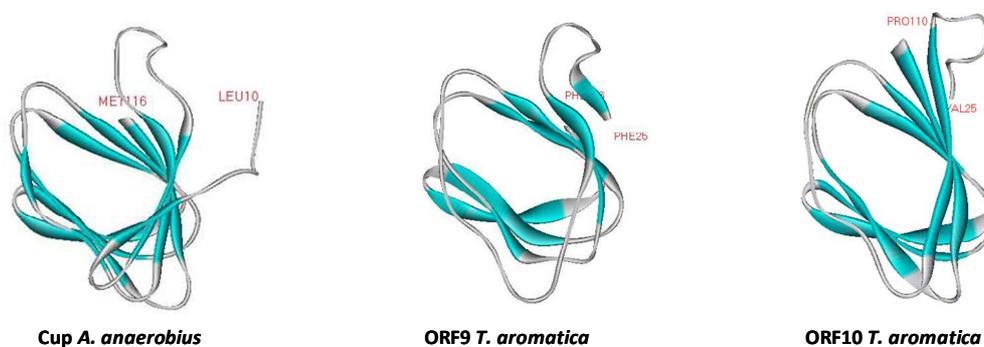


Figura 43. La homología estructural de los productos de *orf9* y *orf10* *T. aromática*, y *cup* de *A. anaerobius*. ORF9 de *T. aromática* y Cup de *A. anaerobius* se han modelado sobre la estructura de una posible oxalato decarboxilasa (TM1287) de *Thermotoga maritima* (1O4TA) (Schwarzenbacher et al, 2004). ORF10 de *T. aromática* se ha modelado sobre la estructura de una cupina de función desconocida (BF4112) de *Bacteroides fragilis* (3CEW_A). La herramienta de predicción utilizada fue Phyre2 (Kelley & Sternberg, 2009).

En la figura 43 se muestran los modelos de las dos proteínas obtenidos utilizando como molde los cristales sobre los que se obtienen las predicciones óptimas de estructura en cada caso. Hay que destacar que estos modelos son muy semejantes

a los obtenidos sobre 2VQA_C. Queda patente la similitud estructural entre ambas proteínas.

Las proteínas de esta familia se relacionan con multitud de funciones, enzimáticas y estructurales, tanto en eucariotas como en procariontes (Agarwal et al, 2009; Dunwell et al, 2004). Como se observa en la figura 44 se conservan muy bien los dominios característicos de las cupinas, que se corresponden con dos motivos (Motivos 1 y 2) formados por dos láminas beta, separados por una región menos conservada de longitud variable, compuesta por otras dos láminas beta (IRM). Los residuos de His y Glu del Motivo 1, junto con la His del Motivo 2, actúan como ligandos del sitio activo de unión a metales (Dunwell et al, 2004).

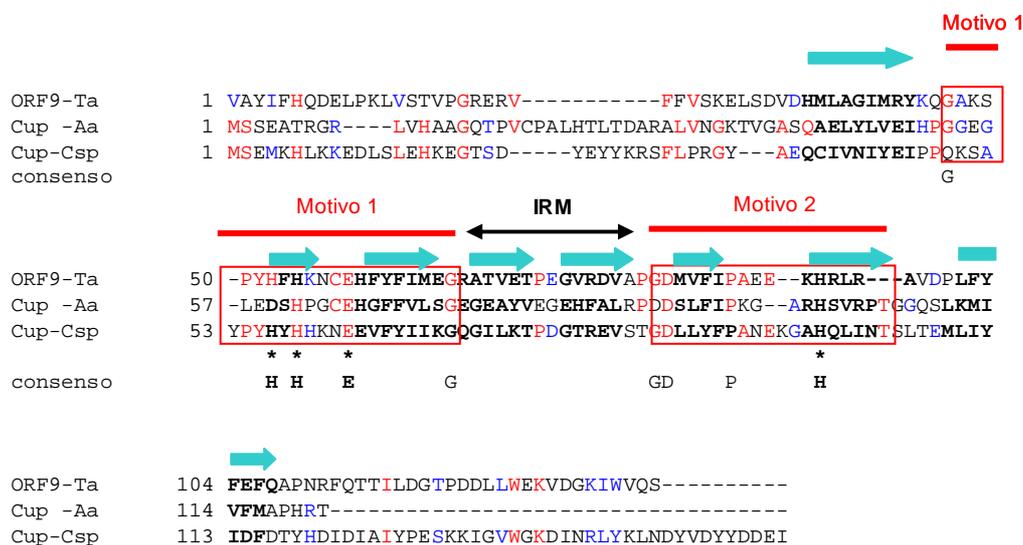


Figura 44. Alineamiento múltiple del producto de *orf9* de *T. aromatica* AR-1 Cup de *A. anaerobius* y Cup de *Coprobacillus* sp. 29_1 (ZP_08011617.1). Se puede observar el Motivo 1 y Motivo 2 cuya secuencia conservada se acerca al consenso $G(X)_5HXH(X)_{3,4}E(X)_6G$ y $G(X)_5PXG(X)_2H(X)_3N$, respectivamente. IRM representa la región menos conservada comprendida entre Motivo 1 y 2 (Dunwell et al, 2004). Las flechas azules representan las láminas beta más conservadas.

Con el producto de la *orf10* no se obtuvo ninguna anotación funcional con homología media suficiente utilizando Blast2GO. Un análisis en BLAST contra la base de datos de proteínas no redundantes dio el mejor resultado (28% de identidad) con una proteína hipotética de *Abiotrophia defectiva*. Curiosamente, y pese a no tener homología a nivel de secuencia con el producto de *orf9*, el producto de *orf10* presenta

homología estructural en el 75% de su secuencia, con más del 95% de confianza, con proteínas de la familia de las cupinas. La función de esta proteína es desconocida.

El producto de la *orf11* presenta una similitud media del 63% con 6-fosfogluconato deshidrogenasas, y un máximo del 50% de identidad con una deshidrogenasa de *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. Es posible modelar con alta fiabilidad el 99% de la secuencia de esta proteína (290 residuos) sobre la estructura de GarR, la tartronato semialdehído reductasa de *Salmonella typhimurium* LT2 (c1vpdA) (Osipiuk et al, 2009), y se predice una hélice transmembrana entre los residuos 170 y 191. Las proteínas de esta familia de beta-hidroxiácido deshidrogenasas tienen en el extremo amino un dominio de unión a piridin nucleótido que está presente en numerosas deshidrogenasas (Figura 45). Generalmente, presentan un segundo dominio catalítico de unión a sustrato. Haciendo blast local de proteínas de *T. aromatica* AR-1 contra la base de datos de proteínas del cósmido F, sale como hit de ORF11 BtdhL, con un Evalue de 2E-31. La ORF11 presentó una similitud de 51% con BtdhL de *A. anaerobius*



Figura 45. Alineamiento del producto de *orf11* de *T. aromatica* AR-1 con BtdhL de *A. anaerobius*. En verde se representa el dominio de unión de NAD y en azul el dominio transmembrana conservado en las dos proteínas.

El producto de la *orf12* presenta una identidad del 93 % con la *orf13* de *A. anaerobius* y una similitud media de 68% con metalopeptidasas de la familia M24B, que cortan delante de residuos de prolina. Estas proteínas presentan una estructura

típica de “pan de pitta”, y generalmente unen cobalto o manganeso (Bazan et al, 1994). Estas aminopeptidasas presentan una relativa especificidad de sustrato comparada con otras aminopeptidasas, y están presentes tanto en eucariotas como en procariotas. Sin embargo, la base de datos de peptidasas MEROPS (Rawlings & Barrett, 1993) clasifica tanto al producto de *orf12* como al de la *orf13* de *A. anaerobius* como homólogos no-peptidasa dentro de esta familia, por carecer de algunos residuos conservados del centro activo considerados críticos para esa actividad (Rawlings & Morton, 2008).

Los productos de las *orf13*, *orf14* y *orf15* presentan homología con las tres subunidades de los llamados sistemas de transporte periplásmicos de tres componentes independientes de ATP (TRAP) (Kelly & Thomas, 2001). Estos sistemas están constituidos por tres proteínas: un receptor extracitoplásmico (ESR), y dos proteínas integrales de membrana, subunidad pequeña y grande (DctQ y DctM). El producto de la *orf13* presenta una similitud media del 53% con proteínas periplásmicas de unión a ácidos C4-dicarboxílicos, pertenecientes a la superfamilia SBP_bac7, que está involucrada en la unión de solutos extracitoplasmáticos para su transporte a través de la membrana plasmática, y sería el componente periplásmico del transportador TRAP. El producto de la *orf14* presenta una identidad del 34 % con una posible permeasa de *Azoarcus sp.* BH72, y se clasifica dentro de la superfamilia DctQ, una pequeña proteína integral de membrana esencial para el transporte de ácidos C4-dicarboxílicos. Esta subunidad es la más variable de las tres que constituyen estos sistemas de transporte, y su función es desconocida. El producto de la *orf15* presenta una similitud media del 64% con permeasas de transportadores de tipo TRAP, y una identidad del 50% con una posible permeasa de *Azoarcus sp.* BH72. Estas proteínas pertenecen a la superfamilia ArsB_NhaD de permeasas que forman canales en las membranas por los que transita el soluto. Como en las demás proteínas de la familia, en la secuencia del producto de *orf15* se predicen 11 ó 12 segmentos transmembrana (según el programa utilizado para la predicción). Esta proteína constituiría la subunidad transmembrana grande del transportador (subunidad DctM). El producto de la *orf16* presenta una similitud media del 65% con proteínas periplásmicas de unión a ácidos C4-dicarboxílicos, y una identidad del 57% con la subunidad DctP del transportador TRAP de ácidos dicarboxílicos de *Leptothrix cholodnii* SP-6, y pertenece también a la superfamilia SBP_bac7. Pese a no presentar homología de secuencia (menor del 10%), los productos de *orf13* y *orf16* presentan homología estructural, y la modelización de su estructura utiliza el mismo molde óptimo (DctP de *Bordetella pertussis*, c2pfyA) (Rucktooa et al, 2007) en los dos casos. La presencia de dos

subunidades de unión a soluto en un mismo sistema TRAP también ocurre en otros sistemas (Mulligan et al, 2007).

El producto de la *orf17* presenta una similitud media del 65% con proteínas de la superfamilia del plegamiento $\alpha\beta$ hidrolasa (Holmquist, 2000; Ollis et al, 1992), y una identidad máxima del 60% con una alfa-beta hidrolasa de *Comamonas testosteroni* S44. Estas proteínas pertenece a la superfamilia de las esterasas_lipasas, cuyos residuos catalíticos son responsables del ataque al grupo carbonilo de los enlaces ester, y tienen funciones catalíticas muy diversas, tanto en eucariotas como en procariotas (Holmquist, 2000). Un análisis de la *orf17* frente a la base de datos de esterasas/ $\alpha\beta$ -hidrolasas disponible el servidor ESTHER, que agrupa a las distintas proteínas de la superfamilia de $\alpha\beta$ -hidrolasas atendiendo a su estructura tridimensional (<http://bioweb.ensam.inra.fr/ESTHER/general?what=index>; (Cousin et al, 1996; Hotelier et al, 2004), alinea a esta proteína preferentemente en el grupo de las hidrolasas de enlaces C-C, con una región de alta homología entre los residuos 57 y 93.

El producto de la *orf18* presenta una similitud media del 60% con molibdopterin- oxidorreductasas de la superfamilia MopB, al igual que el producto de *ORF7*. La proteína con mayor homología en la base de datos es una posible molibdopterina oxidorreductasa de *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*, con la que presenta una identidad del 53%. Entre los residuos 20 a 80 se predice un dominio de unión a centro sulfoférico del tipo Fe₄-S₄, que no está presente en el producto de *ORF7*. El producto de *orf18* es unos 250 residuos más corto que el de *ORF7*, con el que sólo muestra una homología del 35%.

El producto de la *orf19* muestra una similitud media del 80% con proteínas de la familia de dihidrolipoamida deshidrogenasas, y una identidad del 73% con una posible dihidrolipoamida deshidrogenasa de *Azospirillum sp.* B510. El producto de *orf19* presenta además un 65% de identidad (80% de homología) con la proteína BqdhM de *A. anaerobius*, una proteína similar al componente E3 del complejo enzimático piruvato deshidrogenasa. En esta cepa, BqdhM participa junto a BqdhL y BqdhS en la rotura del anillo, convirtiendo HBQ finalmente en malato y acetato, tercer paso en la ruta de degradación de resorcinol (Darley et al, 2007). En la región central de *orf19* (residuos 177 a 258) se puede identificar un típico dominio de unión a piridín nucleótido, así como un dominio C-terminal de dimerización, característicos de numerosas deshidrogenasas de esta familia. Igualmente se observa cerca del extremo N-terminal la secuencia GGXCXXXGCXP, típica de proteínas de esta familia, que

constituye un centro redox de tipo disulfuro como parte del centro activo de la proteína (Rajashankar et al, 2005), (Figura 46).

				Redox SH	
ORF19-T.a	1	MTDNNSYDLIVVAGPGGYVAAIRAAQLGMKTAVVEREHLGGICLNWGCIP	TKALLRSAE		
BqdhM-A.a	1	MAQEKFDLTVIGGGPGGYVAAIRAAQLGLRTALIEREHLGGICLNWGCIP	TKALLRSAE		
consenso	1	M syDL VvGaGPGGYVAAIRAAQLGmkTAvvEREHLGGICLNWGCIP	TKALLRSAE		
ORF19-T.a	61	VGRLARHAAEYGVSVPEPKFDLERIVQRSRAIAAQLNGGIRHLLNKNKVSVEGEARLAG			
BqdhM-A.a	60	IFDHFKHAGDFGLEVQGASFDLQKIVARSRVAAQLNAGVKHLLKKNKVQVFEQSGRLAG			
consenso	61	v rHAaeyGv V FDL rIV RSRaiAAQLNgGirHLL KKNV V EG aRLAG			
ORF19-T.a	121	AGRVAVTRGGADAGTYAAPHLILATGARARQLPGLLEDDGRLVWTYRKAMTPDVLPK	SLLI		
BqdhM-A.a	120	SGTIRLEQKDG-VSEIQSTHILATGARARAMAPVEPDGRLVWSYKEAMTPERMPK	SLLI		
consenso	121	G v v ad HILATGARAR l lE DGRLVWtYr AMTPd lPK	SLLI		
				Unión de NAD	
ORF19-T.a	181	VGSGAIGIEFASFYHALGSQVTVVEVMDRILPVEDEI SALARKAFEDQGMRLTGAKAS			
BqdhM-A.a	179	VGSGAIGIEFASFYRSLGAEVTVVEVRDRVLPVEDAEVSAFAHKAFERQGMKLLTSSSVV			
consenso	181	VGSGAIGIEFASFYh LG VTVVEV DRiLPVED diSA ArKAFE QGMriLT			
ORF19-T.a	241	IARKSAECVTVRIEAGGAEEELTVDRVIVAVGISPNTENLGLEHTRVRLERGHIVTD	PWC		
BqdhM-A.a	239	SLQKQADSIVIAVIDTKGTTTEIRADRVIAAVGI VGNVENLGLEGTGVQVENTHIVTD	AWC		
consenso	241	K Ae V Ie G El DRVI AVGI N ENLGLE T V lE HIVTD WC			
ORF19-T.a	301	RTDEPGLYAIGDVRTPPWLAHKASHEAMICVEAIAGLADVHPLELRN	IPGCTYShPQIAS		
BqdhM-A.a	299	QTGEPGVYAIGDVAGAPWLAHKASHEGILLCVERIAGVDGIHPLDKTE	IPGCTYSRPQIAS		
consenso	301	T EPGLYAIGDV PwLAHKASHEamicVE IAGl vHPLe	IPGCTYShPQIAS		
				dimerización	
ORF19-T.a	361	VGLTERKAREQGHVVRVGRFPFVGNPKAIALGEPGLVKTVDARS	GELLAGHAMIGA		
BqdhM-A.a	359	IGLTEAQAKERGYELKVGRFPFMGNPKAIALGEPGFIKTVFDAKT	GELLAGHAMVGA		
consenso	361	vGLTE ArE G EvrVGRFPFvGNPKAIALGEPeg vKTVFDARS	GELLAGHAMiGA		
ORF19-T.a	421	ELIQGYTLARTLEATEAELIATVFPHPPTLSETMHEAVLAAYGRAIHI			
BqdhM-A.a	419	ELIQGFSIGKTLTTEAELMHVFPHPPTLSEMLHEATLAAYGRAIHT			
consenso	421	ELIQGytlarTLE TEAEli TVFPHPPTLSE mHEA LAAYGRAIH			

Figura 46. Alineamiento del producto de *orf19* de *T. aromatica* AR-1 y BqdhM de *A. anaerobius* dónde se muestra en el extremo amino, un centro redox (desde el residuo 41 a 51) de tipo disulfuro que forma parte del centro activo de la proteína (verde), la región central (desde los residuos 177 a 258), que es un dominio de unión a piridin dinucleótido (azul) y el dominio C-terminal de dimerización (Pflugger et al). En la tercera línea se muestra la secuencia consenso.

El producto de la *orf20* presenta una similitud media del 83% con proteínas de la familia de la succinato semialdehído deshidrogenasa (SSDAH), y una identidad del 72% con una posible SSDAH de *Geobacter lovleyi* SZ. Estas proteínas pertenecen a la superfamilia de la aldehído deshidrogenasa (ALDH), enzimas dependientes de NAD(P), que en general oxidan un amplio espectro de aldehídos alifáticos y aromáticos y juegan un papel importante en detoxificación. Generalmente funcionan como homodímeros u homotetrámeros. El producto de *orf20* conserva los residuos esenciales del centro activo, de unión a piridin nucleótido y de dimerización. En la agrupación génica de degradación de resorcinol de *A. anaerobius* encontramos un gen,

metalopectidasas y a proteínas encargadas de reciclar el cofactor pterina (Naponelli et al, 2008). Su función es desconocida. En otros subgrupos, se encuentran asociadas a molibdo proteínas con actividad hidroxilasa que participan en la degradación de compuestos aromáticos.

El producto de la *orf22* presenta una similitud media del 75% con el componente E1 de deshidrogenasas multicomponentes, y la secuencia con mayor homología en las bases de datos es *bqdhL* de *A. anaerobius*, con la que presenta un 74% de identidad. Los miembros de esta familia utilizan tiamina pirofosfato (TPP) como cofactor, y conservan en el extremo amino terminal un dominio que modula la unión de TPP, imprescindible para su actividad. Tanto el producto de *orf22* como BqdhL conservan en su secuencia el dominio de unión a TPP y el dominio C-terminal implicado en la unión a moléculas reguladoras (Figura 49). Este tipo de enzimas cataliza la rotura o unión de enlaces al carbono de un grupo carbonilo (Frank et al, 2007; Nemeria et al, 2009), siendo el componente E1 del complejo piruvato deshidrogenasa la proteína más representativa de esta familia. Junto con los productos de *orf19* y de *orf24* (ver más adelante), formaría el complejo enzimático encargado de la rotura del anillo de la HBQ (Darley et al, 2007).

El producto de la *orf23* presenta una similitud media del 72% con proteínas de la superfamilia de metaloenzimas denominada “*vicinal oxygen chelate family*”, que recibe este nombre porque su estructura terciaria forma una cavidad que proporciona un entorno conservado de coordinación de iones metálicos, que facilita la interacción entre el sustrato y el metal a través de los átomos vecinales de oxígeno del sustrato. Las proteínas de esta superfamilia están relacionadas estructural y mecánicamente, y las reacciones que llevan a cabo incluyen isomerizaciones, epimerizaciones, roturas de enlace C-C, o sustituciones nucleofílicas (Armstrong, 2000). Además, el producto de *orf23* presenta una identidad del 73% con el producto de la *orf5* de *A. anaerobius*, que codifica para una proteína de función desconocida (Figura 50).

El producto de la *orf24* tiene un 54% de identidad con una dihidrolipolisina acetiltransferasa de *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 y en el extremo amino presenta un dominio de unión a lipoamida típico del componente E2 del complejo piruvato deshidrogenasa. Además, presenta un 53% de identidad con BqdhS de *A. anaerobius* que forma parte del complejo benzoquinona deshidrogenasa que cataliza la rotura del anillo de la HBQ (Darley et al, 2007). Un alineamiento de estas dos proteínas con las proteínas con las que presentaban mayor homología puso de manifiesto un error en la secuencia de BqdhS de *A. anaerobius*, que debe incluir una secuencia más larga en el extremo N-terminal que la secuencia publicada (Darley et al,

El producto de la *orf25* presentó una homología media del 52% con reguladores transcripcionales de la familia de LysR, y una identidad del 33% con un regulador transcripcional de *Ralstonia eutropha* JMP134. Cerca del extremo amino presenta un dominio típico hélice-giro-hélice (HTH) de unión a ADN. La figura 52 muestra un alineamiento de las dos proteínas. Podemos observar que la homología se centra en el dominio HTH.

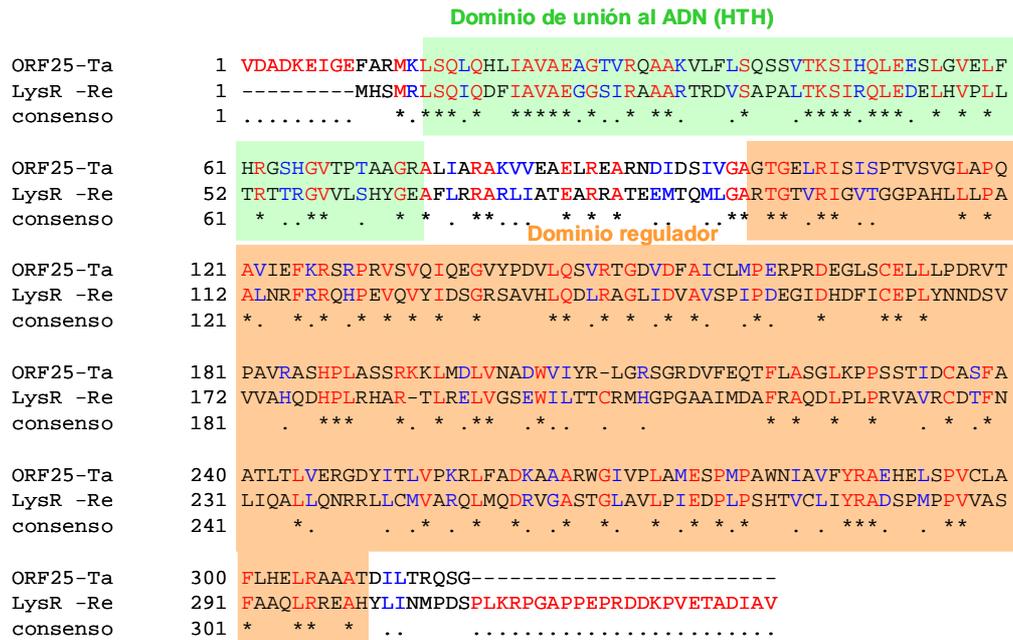


Figura 52. Alineamiento del producto de *orf25* de *T. aromatica* AR-1 con el regulador YP_297902.1 de *R. eutropha* JMP134. Se muestran los dominios típicos de reguladores de la familia LysR, dominio de unión al ADN (HTH) (verde) y dominio regulador, de unión al inductor (canela)

Después de la *orf25* encontramos un gen truncado que presenta una identidad de 65% con una quinona oxidoreductasa de *Cupriavidus taiwanensis* LMG 19424

A modo de resumen en la tabla 12 se representan los genes de *T. aromatica* AR-1 que tienen su homólogo en los genes del cósmido R de *A. anaerobius* y que por lo tanto son firmes candidatos a participar en la degradación de 3,5-DHB

Tabla14. Resumen de correspondencia entre genes de *A. anaerobius* y genes *T. aromatica*.

Gen <i>A. anaerobius</i>	Función	% Ident.	Gen <i>T. aromatica</i> AR-1	Función propuesta
<i>orf5</i>	desconocida	73	<i>orf23</i>	desconocida
<i>rhL</i>	resorcinol	53,7	<i>dbhL</i>	3,5-DHB hidroxilasa
<i>rhS</i>	hidroxilasa	53	<i>dbhS</i>	
<i>bqdhL</i>	HBQ	65	<i>bqdM</i>	HBQ deshidrogenasa
<i>bqdhS</i>	deshidrogenasa	74	<i>bqdL</i>	
<i>bqdhM</i>		53	<i>bqdS</i>	
<i>orf10</i>	desconocida	46	<i>orf21</i>	desconocida
<i>orf12</i>	desconocida	69	<i>orf20</i>	desconocida
<i>btdhL</i>	HHQ deshidrogenasa	35	<i>btdL</i>	HHQ deshidrogenasa
<i>orf13</i>	peptidasa	93	<i>orf12</i>	peptidasa

Proponemos, por tanto, que los genes *dbhL* y *dbhS* forman el complejo 3,5-DHB hidroxilasa que cataliza el primer paso en la degradación de 3,5-DHB, responsable de la hidroxilación anaerobia del 3,5-DHB por homología con el complejo RhLS de *A. anaerobius*. Los genes *bqdM*, *bqdL* y *bqdS* forman el complejo HBQ deshidrogenasa y *btdL* formaría parte del complejo HHQ deshidrogenasa. La *orf12* codifica una peptidasa probablemente necesaria para la maduración de las enzimas de la ruta. Los genes *orf20*, *orf21* y *orf23* que guardan homología con genes detectados en *A. anaerobius* sin función asignada, muy probablemente participan en la ruta de degradación en ambas cepas, ya que se han conservado en las dos rutas.

3.2 Mutantes de *T. aromatica* AR-1

Para confirmar que estos genes podían estar involucrados en la degradación de 3,5-DHB, se construyó una serie de mutantes nulos de *T. aromatica* AR-1 mediante disrupción génica como se indica en el apartado 10 de Materiales y Métodos. Los genes mutados fueron: *ORF7 (dbhL)*, *orf8 (dbhS)*, *orf13 (dctP)*, *orf19 (bqdM)*, *orf20*, *orf21* y *orf22 (bqdL)*. Todas las cepas mutantes fueron capaces de crecer anaeróbicamente en medio Widdel con succinato 5 mM como única fuente de carbono. Sin embargo, excepto el mutante en *orf13 (dctP)*, ninguno fue capaz de crecer con 3,5-DHB como única fuente de carbono (Figura 53. Esto apoya nuestra hipótesis de que estos genes podrían estar involucrados en la degradación de 3,5-DHB en *T. aromatica* AR-1.

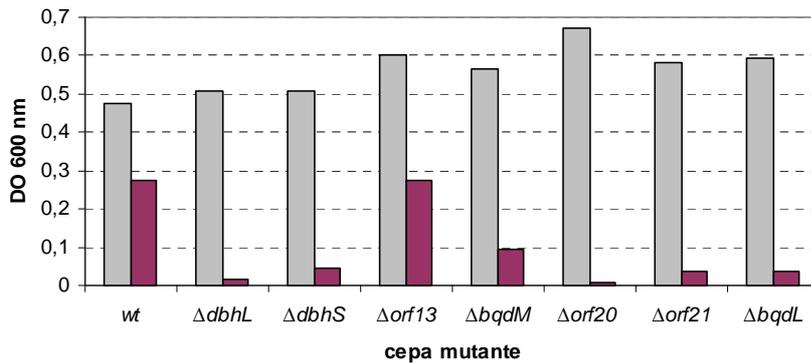


Figura 53. Crecimiento de *T. aromatica* AR-1 silvestre y sus mutantes en *dbhL*, *dbhS*, *orf13*, *bqdM*, *orf20*, *orf21* y *bqdL* cultivados en medio Widdel con succinato 5 mM como única fuente de carbono (gris) o con 3,5-DHB 2 mM como única fuente de carbono (morado) tras 72 h de crecimiento.

Para confirmar que este fenotipo era debido a la mutación introducida, se transfirió a dos de las cepas mutadas el cósmido pCOS4 mediante conjugación. Como se observa en la figura 54A, los mutantes en la *orf20* (Δsuc) y *orf22* ($\Delta bqdL$) que no eran capaces de crecer con 3,5-DHB como única fuente de carbono, recuperaban esta capacidad cuando transferíamos el cósmido pCOS4 portador de los genes intactos. El análisis mediante HPLC de los sobrenadantes de los cultivos mostró que sólo la cepa silvestre y los mutantes complementados con el cósmido pCOS4 fueron capaces de degradar 3,5-DHB completamente (figura 54B).

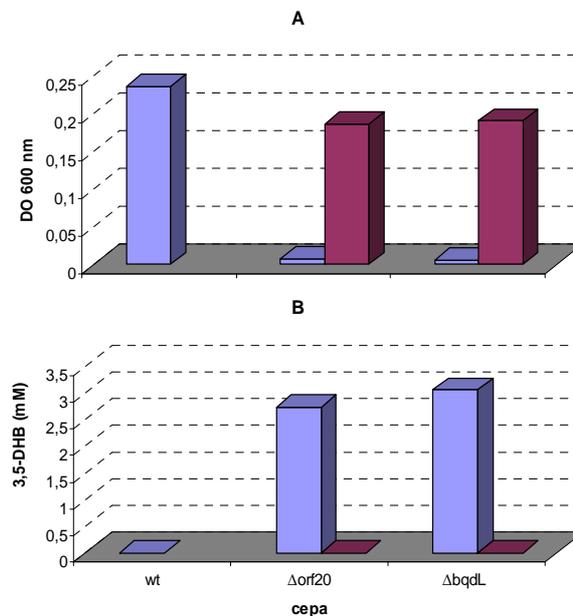


Figura 54. Crecimiento de distintas cepas de *T. aromatica* AR-1. Las células se cultivan en medio Widdel con nitrato como aceptor de electrones (8 mM) y 3,5-DHB (2 mM) como fuente de carbono. Tras 6 días se determinó la turbidez midiendo la DO_{600nm} (A) y la concentración de 3,5-DHB en el medio (B). *T. aromatica* AR-1 silvestre (wt) y los mutantes *orf20* y *bqdL* se representan en azul y las cepas mutantes *orf20* y *bqdL* complementadas con el cósmido pCOS4 se representan en morado.

3.3 Análisis bioquímico de los mutantes de degradación de 3,5-DHB

La función de los genes descrita en el apartado 3.1, (Tabla 14) ha sido asignada por homología con otros genes anotados en la base de datos, y especialmente por su homología con los genes descritos para la degradación de resorcinol en *A. anaerobius*. Por otra parte, habíamos visto que muchos de los mutantes en los genes propuestos como parte de la ruta de degradación no eran capaces de crecer con 3,5-DHB como fuente de carbono (figura 53). Para confirmar la posible función de los genes identificados en el *cluster*, se llevaron a cabo ensayos enzimáticos para la primera enzima de la ruta, la 3,5-dihidroxibenzoato hidroxilasa. Para ello se utilizaron extractos celulares de *T. aromatica* AR-1 y de los mutantes en los distintos genes del *cluster* descritos anteriormente y la actividad se determinó según se detalla en el apartado 11.2 de Materiales y Métodos.

Dado que los mutantes *dbhL* y *dbhS* no eran capaces de crecer en 3,5-DHB como fuente de carbono, los ensayos se hicieron en células cultivadas con succinato como fuente de carbono y en presencia de 3,5-DHB como inductor. Esto requirió ajustar previamente las condiciones de cultivo, ya que por una parte la degradación de 3,5-DHB se reprime por la presencia de fuentes alternativas de carbono (ver Capítulo II), y por otra el nitrato utilizado para la oxidación de succinato se puede hacer limitante. Como ejemplo, la figura 55 muestra la determinación de actividad 3,5-DHB de extractos de células de *T. aromatica* AR-1 cultivadas 72 h en las condiciones estándar de cultivo (2 mM 3,5-DHB, 10 mM succinato y 8 mM de nitrato). Se puede observar que la actividad 3,5-DHB hidroxilasa en *T. aromatica* AR-1 cultivada en presencia de ambas fuentes de carbono (3,5-DHB y succinato) era significativamente inferior a la actividad detectada cuando crecía únicamente con 3,5-DHB. Por tanto, podemos decir que el succinato ejerce un efecto represor en la actividad 3,5-DHB hidroxilasa

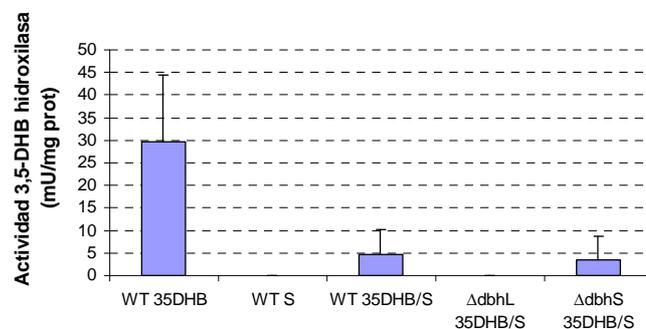


Figura 55. Actividad específica 3,5-DHB hidroxilasa en extractos celulares de *T. aromatica* AR-1 silvestre (WT) y de los mutantes AR-1Mut $\Omega dbhL$ ($\Delta dbhL$) y AR-1Mut $\Omega dbhS$ ($\Delta dbhS$) creciendo con succinato (10 mM) (S), 3,5-DHB (2mM) (3,5-DHB), o con ambas fuentes de carbono (3,5-DHB/S) y KNO₃ (8mM) como aceptor de electrones.

Para establecer las condiciones óptimas para la determinación de las actividades enzimáticas, se utilizaron células de *T. aromatica* AR-1 silvestre y los mutantes *dbhL* y *dbhS*, cultivados con 3,5-DHB (1 mM) más succinato (2 mM) y nitrato (8 mM) como aceptor de electrones y se midió la actividad a lo largo de la curva de crecimiento (figura 56). Los mutantes *dbhL* y *dbhS* no presentaron actividad a diferencia de la cepa silvestre cuya máxima actividad se observó a las 48 h, justo cuando el 3,5-DHB comenzaba a degradarse (ver Capítulo II). A las 72 h, la actividad seguía elevada pese a que el 3,5-DHB había sido degradado completamente. Por ello, elegimos las 48 h, cuando la actividad era máxima, para hacer el mismo ensayo en los distintos mutantes

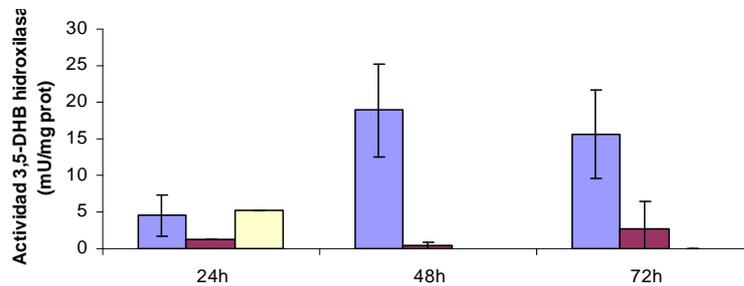


Figura 56 Actividad específica 3,5-DHB hidroxilasa a distintos tiempos durante el crecimiento de *T. aromatica* AR-1 (azul) y de los mutantes AR-1Mut Ω *dbhL* (amarillo) y AR-1Mut Ω *dbhS* (morado) en medio Widdel con 3,5-DHB (1 mM) más succinato (2 mM) como fuentes de carbono y nitrato (8 mM) como aceptor de electrones.

Como se observa en la figura 57, la actividad fue nula en todos los mutantes ensayados, salvo en el mutante *bqdM*, donde la actividad alcanzó un 40% de la de la cepa silvestre. Cabe recordar que este mutante era capaz de utilizar 3,5-DHB como fuente de carbono, aunque en menor medida que el tipo silvestre (figura 53).

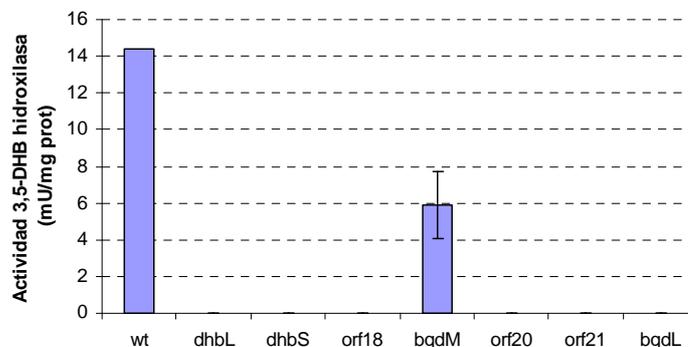


Figura 57. Actividad específica 3,5-DHB hidroxilasa en *T. aromatica* AR-1 (wt) y mutantes crecidos anaeróbicamente con 3,5-DHB (1 mM), succinato (2 mM) y NO₃ (8 mM) como aceptor final de electrones.

En la degradación de 3,5-DHB y resorcinol sólo se han detectado bioquímicamente los intermediarios HHQ e HBQ, que daría lugar tras sucesivos pasos, no identificados, a la aparición de acetato y malato (Gallus & Schink, 1998; Philipp & Schink, 1998). Puesto que asumíamos que dicho mutante debería participar en la rotura de HBQ estábamos interesados en ver si dicho mutante acumulaba alguno de los intermediarios que no habían sido identificados hasta el momento, ya que crecía con cierta dificultad y acumulaba un producto coloreado de naturaleza desconocida.

Para seguir cuantitativamente la aparición del metabolito intermediario, se analizó mediante HPLC el sobrenadante de los cultivos a lo largo de la curva de crecimiento del mutante *bqdM* cultivado con 3,5-DHB (2 mM) como única fuente de carbono. Como se puede observar en la figura 58B aparecían dos compuestos con tiempos de retención de 14,48 y 10,16 minutos, cuya concentración aumentaba a lo largo del tiempo hasta alcanzar valores máximos entre las 96 y 120 horas, coincidiendo con la desaparición del 3,5-DHB. Estos compuestos, que no hemos podido identificar, podrían ser intermediarios en la degradación de 3,5-DHB.

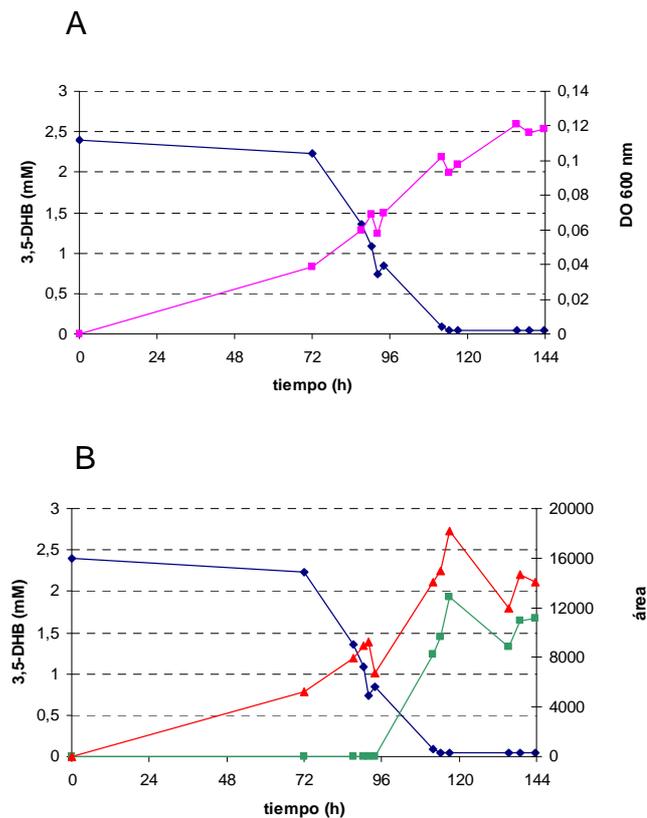


Figura 58. Degradación de 3,5-DHB por la cepa mutante *bqdM*. A) Degradación de 3,5-DHB (azul) y curva de crecimiento (morado) en el mutante *bqdM*. B) Degradación de 3,5-DHB (azul) y aparición de algunos productos no identificados con tiempo de retención 14,48 min (rojo) y 10,16 min (verde).

**CAPÍTULO III: ESTUDIO DE LA REGULACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE LOS
GENES DE LA RUTA DE DEGRADACIÓN DE 3,5-DHB EN *Thauera aromatica* AR-1**

CAPÍTULO III: ESTUDIO DE LA REGULACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LA RUTA DE DEGRADACIÓN DE 3,5-DHB EN *Thauera aromatica* AR-1

1. ORGANIZACIÓN GÉNICA Y EXPRESIÓN DE LA RUTA DE DEGRADACIÓN DE 3,5-DHB EN *Thauera aromatica* AR-1

1.1 Expresión de los genes *dbhLS* de *T. aromatica* AR-1

Como ocurre en la mayoría de rutas de degradación de compuestos aromáticos, tanto aerobios como anaerobios, la síntesis de los primeros enzimas de la ruta de degradación de 3,5-DHB en *Thauera aromatica* AR-1 es inducible (Philipp and Schink, 2000; Barragan et al., 2004). Esto implica que al menos alguno de los genes esenciales de las enzimas de la ruta deben inducirse por la presencia del sustrato. Para confirmar que los genes identificados en el Capítulo I estaban involucrados en la degradación de 3,5-DHB, nos propusimos estudiar si estos genes se inducían en presencia del sustrato. Los genes *dbhL* y *dbhS* presentan una alta homología con la subunidad alfa y beta, respectivamente, de la resorcinol hidroxilasa de *A. anaerobius* y probablemente codifican el primer paso de la ruta, la 3,5-DHB hidroxilasa. Para analizar la expresión de estos genes se llevaron a cabo ensayos de RT-PCR con ARN extraído de células de *T. aromatica* AR-1 cultivadas en condiciones desnitrificantes con succinato, 3,5-DHB o benzoato como única fuente de carbono. El ARN se analizó como se indica en el apartado 6.12 de Materiales y Métodos, utilizando cebadores internos de los genes *dbhL* y *dbhS* (Figura 59).

El análisis de los productos de las reacciones de RT-PCR reveló niveles de expresión significativos de ambos genes sólo en células cultivadas en presencia de 3,5-DHB (Figura 59). No se observó expresión de *dbhS* en células cultivadas en succinato o benzoato, mientras que *dbhL* mostró cierto nivel de expresión en ausencia de 3,5-DHB, aunque muy inferior al observado en presencia de este sustrato. De estos resultados podemos deducir que la actividad enzimática 3,5-DHB hidroxilasa (*DbhLS*) se induce en presencia del sustrato 3,5-DHB.

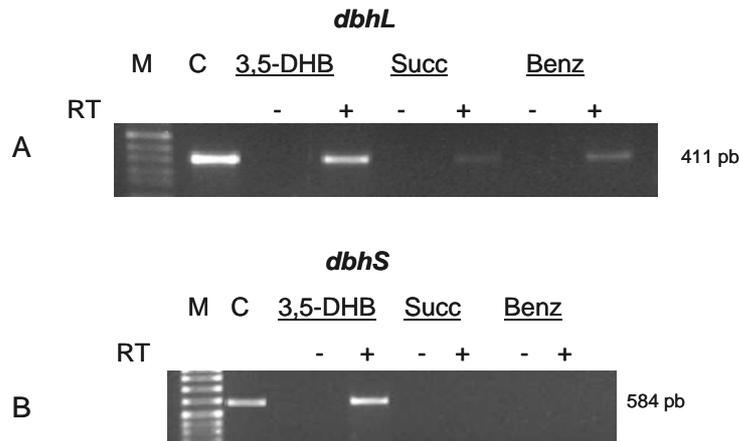


Figura 59. Expresión de los genes *dbhLS* en células cultivadas con distintas fuentes de carbono. Electroforesis en geles de agarosa de los productos de RT-PCR resultantes de amplificar a partir de ARN total con cebadores específicos para *dbhL* (A) y *dbhS* (B). A las 72 h se extrajo el ARN total de células de *T. aromatica* AR-1 cultivadas en condiciones desnitrificantes con 3,5-DHB (3,5-DHB) (2 mM), succinato (Succ) (5 mM) y benzoato (Benz) (2 mM) como fuentes de carbono. La extracción de ARN y las reacciones de RT-PCR se realizaron como se detalla en el apartado 6.11 y 6.12 de Materiales y Métodos. Los oligonucleótidos empleados fueron rhLF y rhLR para amplificar una región interna de 411 pb del gen *dbhL* y rhSF y rhSR que amplifica una región que incluye a los genes *dbhS* y *orf9* de 584 pb (Tabla 4 de Materiales y Métodos). La calle M correspondiente marcador de peso molecular de MBL[®] de 50 a 1000 pb. La calle C corresponde al control positivo de la reacción de PCR realizado a partir de ADN genómico de *T. aromatica* AR-1. Las calles (-) se corresponden con el control negativo de la RT-PCR realizado sin reversotranscriptasa y las calles (+) con las reacciones de RT-PCR realizadas con la reverso transcriptasa.

1.2 Organización transcripcional de los genes para la degradación de 3,5-DHB de *T. aromatica* AR-1

Para identificar las unidades transcripcionales operativas en la expresión en la ruta de degradación de 3,5-DHB se llevaron a cabo reacciones de RT-PCR analizando las regiones intergénicas del *cluster* identificado en el Capítulo I. Para ello, se aisló ARN total de *T. aromatica* AR-1 cultivada en condiciones desnitrificantes utilizando 3,5-DHB (2 mM) o succinato (5 mM) como únicas fuentes de carbono y se analizó mediante RT-PCR con parejas de cebadores complementarios a los genes adyacentes, y los productos de amplificación se analizaron en geles de agarosa (Figura 60B).

Se puede observar que las *orf5* y *orf6* se transcribieron como una unidad transcripcional (operón A) y de expresión independiente de la presencia de 3,5-DHB (reacción 1). Por otro lado se puede deducir una segunda unidad transcripcional (operón B) que incluyó desde la *orf7* (*dbhL*) hasta la *orf12* (M24) (reacciones 3 a 9). Además, se observó cotranscripción constitutiva desde *dbhS* hasta *orf12*. Pese a que el producto de la reacción 3 comprendida entre *dbhL* y *dbhS* no se observó en este caso en presencia de succinato (figura 56B) en otros ensayos de RT-PCR sí se

observó expresión constitutiva de *dbhL* (figura 55A) por lo que asumimos que la expresión constitutiva se produce desde *dbhL* hasta *orf12* (Figura 60B).

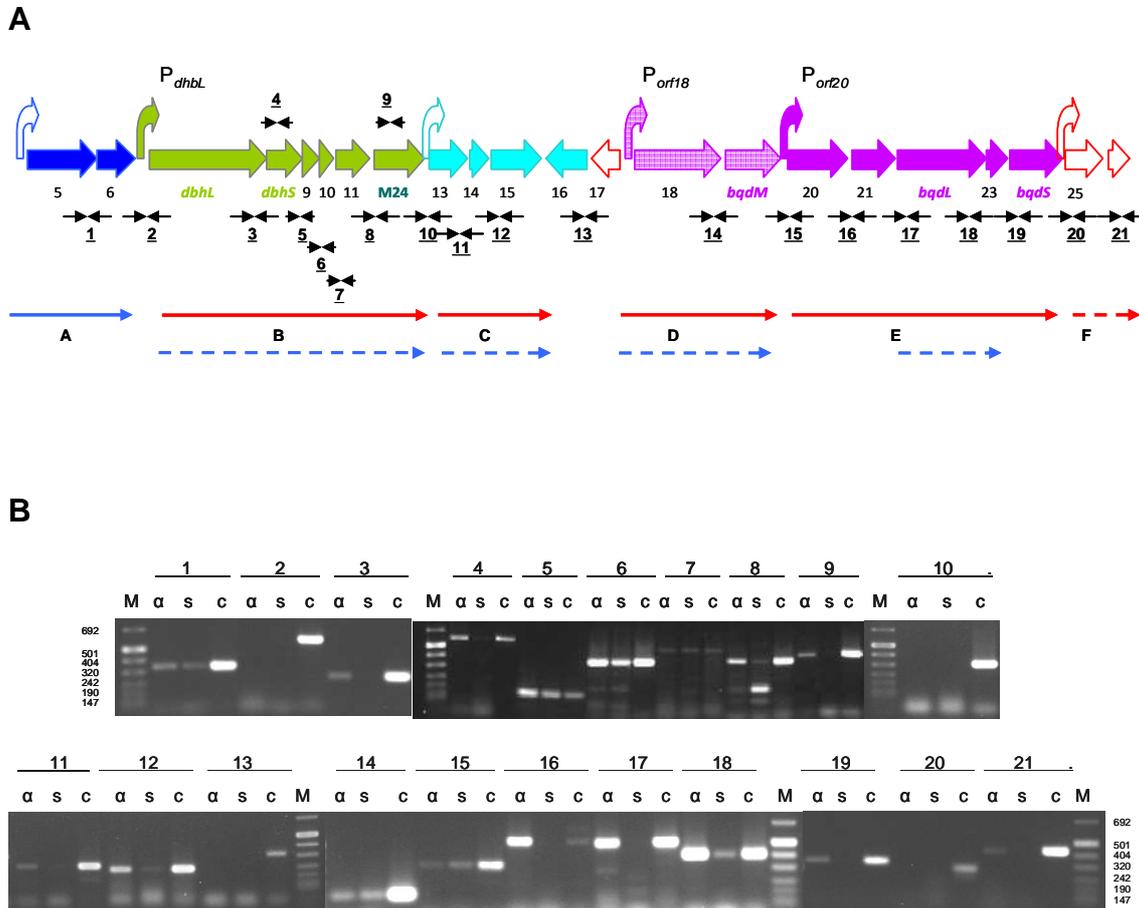


Figura 60. Organización transcripcional del cluster de genes de degradación de 3,5-DHB de *T. aromatica* AR-1 entre la *orf5* hasta la *orf25*. A) Representación esquemática del *cluster* de genes de *T. aromatica* AR-1 donde los diferentes marcos abiertos de lectura se representan con flechas anchas y las unidades transcripcionales con flechas rojas (inducibles) o azules (constitutivas). Las flechas azules discontinuas representan niveles basales de expresión. Los promotores que se asocian a cada unidad transcripcional se representan con flechas curvas, blancas (promotores hipotéticos) y de colores (promotores determinados experimentalmente). Las flechas negras convergentes y los números del 1 al 21 reflejan la región amplificada por RT-PCR empleando los oligonucleótidos que se detallan en la Tabla 4 de Materiales y Métodos. B) Electroforesis en geles de agarosa de los productos de RT-PCR resultantes de amplificar ARN total con cebadores internos de dos genes adyacentes (esquematizados con flechas negras convergentes). Cada número corresponde a la región indicada en el esquema A. El ARN se extrajo de células de *T. aromatica* AR-1 cultivadas durante 72h en condiciones desnitrificantes usando 3,5-DHB (α) o succinato (s) como únicas fuentes de carbono. La extracción de ARN y las reacciones de RT-PCR se realizaron según se detalla en los apartados 6.11 y 6.12 de Materiales y Métodos. Los controles positivos (c) se realizaron empleando ADN genómico de *T. aromatica* AR-1. La calle M representa el marcador VIII de peso molecular (Roche). Al lado del marcador se indica el tamaño de los distintos fragmentos en pb.

La siguiente unidad transcripcional, inducible por 3,5-DHB, incluyó las *orf13*, *orf14* y *orf15* (operón C), que codifica los tres componentes de un transportador tipo TRAP. También se detectó una leve expresión basal de estos genes (reacciones 11 y 12). Este operon constituye una unidad transcripcional claramente distinguible del operón B (reacción 10). La *orf16*, que codifica para un receptor extracitoplasmático que probablemente también forme parte del transportador se transcribe en sentido convergente. No hay cotranscripción entre este gen y el que le precede (*orf17*, reacción 13) en ninguna de las condiciones ensayadas.

De acuerdo con los resultados de la figura 56, las *orf18* y *orf19* (*bqdB*) con expresión constitutiva formarían el operón D (D, reacciones 14 y 15). Además, delante de *orf18* existe un promotor inducible por 3,5-DHB (ver más adelante). Las *orf20*, *orf21*, *orf22* (*bqDL*), *orf23* y *orf24* (*bqDS*) constituirían la quinta unidad transcripcional inducible por 3,5-DHB (operón E, reacciones 16 a 19). Finalmente, las *orf25* y *orf26* formarían una unidad transcripcional inducible (operón F, reacciones 20 y 21), que tal vez incluya algún gen situado aguas abajo del gen truncado *orf26*.

Según estos resultados, existirían al menos seis unidades transcripcionales: el operón A de expresión constitutiva y los operones B, C, D, E y F inducibles en presencia de 3,5-DHB. No podemos descartar la existencia de niveles de expresión basal de los operones B, C, D y de los genes *bqDL-orf23*. La determinación de estas unidades transcripcionales nos permite predecir la existencia de promotores constitutivos delante de *orf5*, *orf13* y *orf18*, y de promotores inducibles delante de *dbhL*, *orf13*, *orf20* y *orf25*.

2. IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES PROMOTORES IMPLICADOS EN LA DEGRADACIÓN DE 3,5-DHB EN *Thauera aromatica* AR-1

Tras determinar la existencia de seis unidades transcripcionales, nos propusimos identificar los puntos de inicio de la transcripción de los tres operones que consideramos esenciales en la degradación de 3,5-DHB, P_{dbhL} , P_{orf18} , y P_{orf20} . P_{dbhL} controlaría el operón que se extiende desde *dbhL* hasta *orf12*, implicado en el primer y segundo paso de la ruta ya que *orf7* y *orf8* codifican para los componentes del complejo 3,5-DHB hidroxilasa; y *orf11* presentan homología con la subunidad *btdhL* del complejo HHQ deshidrogenasa propuesto para *A. anaerobius* (Darley et al., 2007). P_{orf18} controlaría la expresión de *orf18* y *bqdB*, formando parte este último gen del complejo enzimático HBQ deshidrogenada, tercer paso de la ruta, y P_{orf20} controlaría el operón que se extiende desde *orf20* hasta *bqDS*, e incluiría los genes homólogos a dos

de los componentes del complejo HBQ deshidrogenasa de *A. anaerobius* (*bqdhLSM*) (Darley et al., 2007).

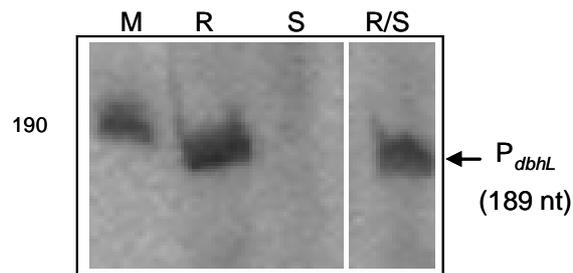
2.1 Caracterización de la región promotora del gen *dbhL* (P_{dbhL})

Puesto que en el *cluster* de *T. aromatica* AR-1 habíamos encontrado dos genes con homología a reguladores de la familia LysR (*orf3* y *orf25*), nos propusimos primero determinar el punto de inicio de la transcripción y a partir de ahí buscar los elementos típicos de promotores regulados por reguladores transcripcionales de esta familia.

Para determinar el punto de inicio de la transcripción de los distintos operones se llevaron a cabo experimentos de extensión a partir de cebador con cebadores internos al primer gen del operón. La figura 61 muestra el análisis del punto de inicio de la transcripción de *dbhL*, primer gen del operón B. El producto de extensión de 189 nt nucleótidos situó la posición +1 a 58 pb aguas arriba del codón de inicio de la traducción de *dbhL* (figura 61A). Esto nos permitió proponer las regiones -10 y -35 de unión de la subunidad σ^{70} de la ARN polimerasa (Figura 61B). La caja -10 mantiene buena homología (4/6) con la secuencia consenso TATAAT (Dombroski, 1997), mientras que a la distancia canónica de 17 pb aguas arriba de esta, la caja -35 no está conservada, probablemente por solapar con el sitio de unión de una proteína reguladora (Lochowska et al., 2004).

Los reguladores LTTR (Reguladores transcripcionales de tipo LysR) reconocen una secuencia de ADN palindrómica que mantiene el consenso T-N₁₁-A, que se denomina sitio RBS (Regulatory Binding Site) (Schell, 1993; Parsek et al., 1994; Maddocks and Oyston, 2008). El sitio ABS (Activator Binding Site) no presenta una secuencia conservada y está localizado entre el sitio RBS y el promotor, y a menudo solapa la región -35 (Schell, 1993; Porrúa et al., 2007). En nuestra secuencia se han identificado secuencias palindrómicas que cumplen el consenso T-N₁₁-A para el sitio ABS. El primero de ellos estaría centrado en posición -22 y el segundo en posición -66, respecto al sitio de inicio de la transcripción. Además, se ha encontrado otra región que se encuentra conservada en los tres promotores analizados (en fucsia en la figura 57B) y que se encuentra entre las posiciones -30 y -45, lo que sugiere que podría jugar un papel importante en la regulación de los tres promotores, podría corresponder al sitio ABS. El hecho de que solape con la región -35 puede ser uno de los motivos por los que esta secuencia no conserve el consenso típico de los sitios de unión de σ^{70} .

A



B

CCTCGTTTTTCATCCGTCCC GGAGGGCGTCCGGAGCCGGATCGAGGCGGGCTTGTCGTG**GATCGG**
CAAAAGCGATCGGAAGGGAGTT**AGATTGAATCACTTGG**AGAT**TGGGGGGCTGGAT**AGACTGCCA
 -35 -10
 GGCA**AT**CGACAAGGTCGGCATCGATCGGCTCGACAGACCTGGATTTCAATACAG**AGG**GGACT**ATG**
 +1 RBS *dbhL*

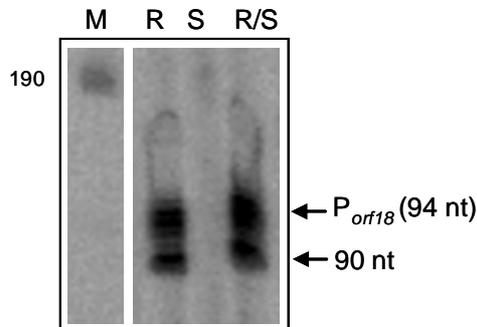
Figura 61. Determinación del punto de inicio de la transcripción y secuencia del promotor P_{dbhL} . **A)** Determinación del punto de inicio de la transcripción mediante extensión a partir de cebador del promotor P_{dbhL} . Para ello, se extrajo ARN de células de *T. aromatica* AR-1 cultivada hasta alcanzar una DO de 0,3 en condiciones desnitrificantes con succinato (5 mM) (S), 3,5-DHB (2 mM) (R) o succinato y 3,5-DHB (5 y 2 mM respectivamente) (R/S) como fuentes de carbono. La extracción de ARN y los ensayos de extensión se realizaron siguiendo el protocolo que se detalla en los apartados 6.11 y 7 de Materiales y Métodos utilizando el oligonucleótido rt-rhL_5' complementario a la región interna de *dbhL* (Tabla 6). El tamaño del producto de extensión se determinó mediante extrapolación con una recta de calibrado realizada a partir del marcador de peso molecular. Se utilizó el marcador VIII de Roche (M) como patrón de peso molecular; a la izquierda se presenta el tamaño en nucleótidos. **B)** Secuencia del promotor P_{dbhL} , donde se indica la +1 (subrayado y en negrita) a 58 nucleótidos del codón de inicio de la traducción, que nos permitió localizar las posibles cajas -10 y -35 de unión de σ^{70} (sombreadas en gris), la secuencia de unión del ribosoma (RBS) (azul y cursiva), y el codón de inicio de la traducción (subrayado en rojo). Las cajas negras muestran las secuencias que forman el palíndromo de los posibles sitios de unión para reguladores de tipo LysR. En fucsia se muestra la secuencia conservada en los tres promotores

2.2 Caracterización de la región promotora de *orf18* (P_{orf18})

El punto de inicio de la transcripción de *orf18*, primer gen del operón D, se determinó del mismo modo descrito para P_{dbhL} . En este caso pudimos observar dos productos de extensión de 90 nt y 94 nt ambos inducibles por la presencia de 3,5-DHB (Figura 62A). Es posible que la banda de menor tamaño sea un producto de procesamiento del mensajero de mayor tamaño, aunque no podemos descartar que se trate de un segundo promotor solapante. El producto de extensión de 94 nucleótidos sitúa la posición +1 a 79 pb del codón de inicio de la traducción. Esto nos permite proponer las cajas -10 y -35 de unión de σ^{70} . Como en el caso anterior, la caja -10 mantiene buena homología (4/6) con el consenso TATAAT, mientras que la caja -35 no guarda homología con el consenso. Esto podría ser debido a un solapamiento con

la secuencia parcialmente conservada en los tres promotores (sitio ABS) (en fucsia en la figura 58B), y que podría jugar un papel en la regulación.

A



B

```

CTGTGCTTCCGATGCCAAATCTTCCCGTCTTGATCGCGTTCAGTGAACGCCTTGCGGCGGATCG
GTGCCGGGCCGGCCGAGCGCCACGGGGCGGGCAGCGAAAGGCGTGGGGCGGGTGAGGAGGTGT
GTTCCCCGGCAGGGGTTTGGCGGAATCGATCAGGTTCCGAAGATTCGGTATCGGGCCGGCTGCG
                                     -35
ACTCACGGCGTTACACTCGGAAAAACGGTGCCATCGCTCGATGGCGGACAAAAGGAGTGCCGCGG
          -10          +1
TTCGACCGCGGCCCGCACGACTGGAGGATGGGTTGCGATG
                               RBS                orf18

```

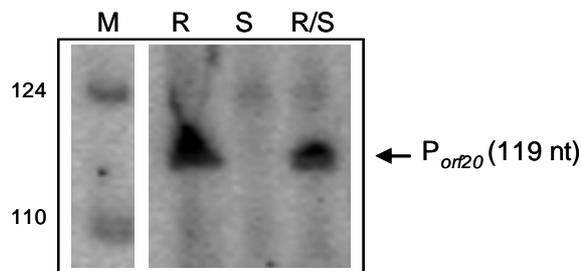
Figura 62. Determinación del punto de inicio de la transcripción y secuencia del promotor P_{orf18} . **A)** Determinación del punto de inicio de la transcripción mediante extensión a partir de cebador del promotor P_{orf18} . Para ello, se extrajo ARN de células de *T. aromatica* AR-1 cultivada hasta alcanzar una DO de 0,3 en condiciones desnitrificantes con succinato (5 mM) (S), 3,5-DHB (2 mM) (R) o succinato y 3,5-DHB (5 y 2 mM respectivamente) (R/S) como fuentes de carbono. La extracción de ARN y los ensayos de extensión se realizaron siguiendo el protocolo que se detalla en los apartados 6.11 y 7 de Materiales y Métodos utilizando el oligonucleótido primario complementario a la región interna de *orf18* (Tabla 6). El tamaño del producto de extensión se determinó mediante extrapolación con una recta de calibrado realizada a partir del marcador de peso molecular. Se utilizó el marcador VIII de Roche (M) como patrón de peso molecular; a la izquierda se presenta el tamaño en nucleótidos. **B)** Secuencia del promotor P_{orf18} , donde se indica la +1 (subrayado y en negrita) a 94 nucleótidos del codón de inicio de la traducción, que nos permitió localizar las posibles cajas -10 y -35 de unión de σ^{70} (sombreadas en gris), la secuencia de unión del ribosoma (RBS) (azul y cursiva), y el codón de inicio de la traducción (subrayado en rojo). Se muestra en negrita subrayado la posición del extremo 5' del producto de extensión de 90 nt identificado en A. Las cajas negras muestran las secuencias que forman el palíndromo de los posibles sitios de unión para reguladores de tipo LysR. En fucsia se muestra la secuencia conservada en los tres promotores.

También se han identificado en esta región promotora secuencias palindrómicas que cumplen con el consenso T-N₁₁-A. La primera de ellas estaría centrada en posición -52 y la segunda en posición -188, respecto al sitio de inicio de la transcripción. Además, se ha podido identificar una región parcialmente conservada que está presente en los tres promotores analizados (en fucsia en la figura 62B) y que se encuentra entre la posición -31 y -41.

2.3 Caracterización de la región promotora de *orf20* (P_{orf20})

Se determinó el punto de inicio de la transcripción para el promotor P_{orf20} de la misma forma que en los casos anteriores. Se puede observar un punto de extensión de 119 nucleótidos que sólo está presente en presencia de 3,5-DHB (Figura 63A). Este producto de extensión sitúa la posición +1 a 72 pb del codón de inicio de la traducción, lo que permitió proponer las cajas -10 y -35 de unión del factor σ^{70} . La caja -10 mantenía buena homología (5/6) con el consenso TATAAT, mientras que, como en los casos anteriores, la caja -35 no guardaba homología con el consenso. De nuevo se observa un solapamiento con la secuencia conservada en los tres promotores (en fucsia en la figura 63B), que en este caso se sitúa entre las posiciones -28 y -43, y es idéntica a la secuencia encontrada en P_{dbhL} .

A



B

```

AATGGTGAATCGCCATATTGAATCTTACTGCTCGAAGATTGAATCACTTGGCGATCGCCTGCCTG
                                     -35
CCTAGAATGCCCTTGCCGATGCAGGCGAGCGCGGCACGAGCGCGGCGACAGGCAGTCCATTTCC
-10      +1
GAAAATCTTCGAGGACGATTCATG
           RBS      orf20
  
```

Figura 63. Determinación del punto de inicio de la transcripción y secuencia del promotor P_{orf20} . **A)** Determinación del punto de inicio de la transcripción mediante extensión a partir de cebador del promotor P_{orf20} . Para ello, se extrajo ARN de células de *T. aromatica* AR-1 cultivada hasta alcanzar una DO de 0,3 en condiciones desnitrificantes con succinato (5 mM) (S), 3,5-DHB (2 mM) (R) o succinato y 3,5-DHB (5 y 2 mM respectivamente) (R/S) como fuentes de carbono. La extracción de ARN y los ensayos de extensión se realizaron siguiendo el protocolo que se detalla en los apartados 6.11 y 7 de Materiales y Métodos utilizando el oligonucleótido rt-suc5' complementario a la región interna de *orf20* (Tabla 6). El tamaño del producto de extensión se determinó mediante extrapolación con una recta de calibrado realizada a partir del marcador de peso molecular. Se utilizó el marcador VIII de Roche (M) como patrón de peso molecular; a la izquierda se presenta el tamaño en nucleótidos. **B)** Secuencia del promotor P_{orf18} , donde se indica la +1 (subrayado y en negrita) a 119 nucleótidos del codón de inicio de la traducción, que nos permitió localizar las posibles cajas -10 y -35 de unión de σ^{70} (sombreadas en gris), la secuencia de unión del ribosoma (RBS) (azul y cursiva), y el codón de inicio de la traducción (subrayado en rojo). Las cajas negras muestran las secuencias que forman el palíndromo de los posibles sitios de unión para reguladores de tipo LysR. En fucsia se muestra la secuencia conservada en los tres promotores.

También, en este caso, se ha identificado una secuencia palindrómica que cumple con el consenso T-N₁₁-A y se encuentra centrada en posición -64 respecto al sitio de inicio de la transcripción.

Como hemos visto, en los promotores P_{dbhL} y P_{orf20} se encuentra la misma secuencia de 16 nucleótidos en posición -28 a -43 y -30 a -45, respectivamente, solapando con la caja -35 de unión de la ARN polimerasa. Esta misma secuencia se puede identificar en P_{orf18} en la misma posición, aunque menos conservada (56%) (Figura 64).

```

>dbhL  AGATTGAATCACTTGG
>orf18 AGATTCGGTATCGGGG
>orf20 AGATTGAATCACTTGG
  
```

Figura 64. Alineamiento de la secuencia que corresponde con el posible sitio ABS de unión de reguladores LysR. Los nucleótidos conservados se representan en fucsia y la caja -35 sombreada en gris.

En las reacciones de extensión a partir de cebador para localizar el punto de inicio de la transcripción de los promotores P_{orf18} y P_{orf20} se detectaron bandas de expresión constitutiva de mayor tamaño que las inducidas por resorcinol (Figura 65) que confirman la existencia de un promotor constitutivo aguas arriba del gen *orf18* y que se extiende incluso hasta *orf20*, lo que confirma los resultados obtenidos mediante RT-PCR, en los que se había detectado un transcrito de expresión constitutiva que comprendía los genes *orf18*, *orf19* y *orf20* (reacción 14 y 15, Figura 60).

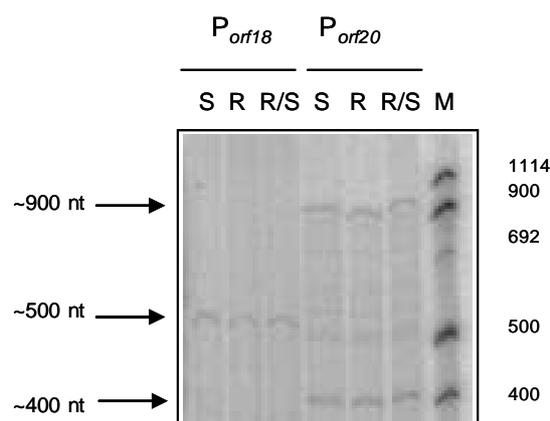


Figura 65. Bandas de expresión constitutiva delante de los genes *orf18* y *orf20*. ARN extraído de células de *T. aromatica* AR-1 cultivada como se indica en la figura 61 con succinato (5 mM) (S), 3,5-DHB (2 mM) (R) o succinato y 3,5-DHB (5 y 2 mM respectivamente) (R/S) como fuentes de carbono se utilizó en ensayos de extensión a partir de cebador utilizando el oligonucleótido primario, complementario a la región interna de *orf18* y rt-suc5', complementario a la región interna de *orf20* (Tabla 6).

3. IDENTIFICACIÓN DEL INDUCTOR ESPECÍFICO DE LA RUTA DE DEGRADACIÓN DE 3,5-DHB

Los resultados anteriores muestran que la expresión de los tres operones depende de la presencia del sustrato 3,5-DHB en el medio. Para determinar si el inductor de la ruta era el 3,5-DHB o alguno de los productos de su metabolismo se realizaron ensayos de RT-PCR para analizar la expresión del primer operón, empleando cebadores que amplifican una región interna del gen *dbhL* y usando como molde ARN de *T. aromatica* AR-1 y de cepas mutantes en los siguientes genes: *dbhL* y *dbhS*, que forman el complejo 3,5-DHB hidroxilasa (DbhLS) y que no es capaz de metabolizar 3,5-DHB (Figura 53, Cap II); *bqdB* y *bqDL*, que formarían parte del complejo HBQ deshidrogenasa (BqdMLS) y que por tanto no serían capaces de transformar el compuesto intermedio HBQ.

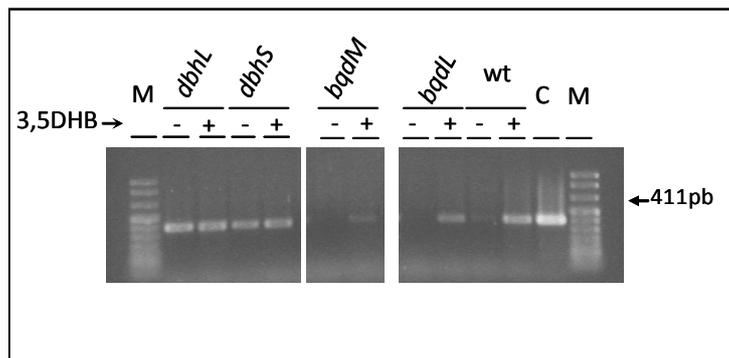


Figura 66. Expresión del operón B en la cepa silvestre de *T. aromatica* AR-1 y en los mutantes de la ruta de degradación de 3,5DHB. Electroforesis en geles de agarosa del producto de RT-PCR de una región interna de 411 pb del gen *dbhL* amplificada usando los oligonucleótidos rhLF y rhLR (Tabla 4 de Materiales y Métodos) controlado por el promotor P_{dbhL} , obtenido a partir de ARN de cultivos crecidos con succinato (-) y con succinato más 3,5-DHB (+) de *T. aromatica* AR-1 silvestre (wt), y de los mutantes AR-1Mut Ω *dbhL* (*dbhL*), AR-1Mut Ω *dbhS* (*dbhS*), AR-1Mut Ω *bqdB* (*bqdB*), y AR-1Mut Ω *bqDL* (*bqDL*). La extracción de ARN y la reacción de RT-PCR se realizó según se detalla en los apartados 6.11 y 6.12 de Materiales y Métodos. El control positivo de la PCR usa como molde ADN genómico de *T. aromatica* AR-1 (C). En ningún caso amplificaron las reacciones de control negativo de la RT-PCR, que emplea ARN de las distintas cepas como molde, los mismos oligonucleótidos y Taq polimerasa, omitiéndose en los ensayos la transcriptasa reversa (resultados no mostrados).

Los ensayos de RT-PCR muestran una expresión constitutiva del primer operón en los mutantes *dbhL* y *dbhS* (Figura 66), Sin embargo, el comportamiento parece diferente para los mutantes *bqdB* y *bqDL*, en los que el gen *dbhL* se induce por 3,5DHB como en la cepa silvestre. Según estos resultados, no podemos descartar que el inductor sea el 3,5-DHB o los intermediarios HHQ o HBQ, que se formarían en el caso del mutante *bqdB* (este mutante crece 3,5DHB) o se acumularían en el caso

de *bqdl*. Un mutante en el primer paso de la ruta (*dbhL* y *dbhS*) provoca una expresión constitutiva del primer gen del operón B. De estos resultados podemos deducir que existe un nivel de regulación superior, en el que los genes para el primer paso de la ruta están ejerciendo algún efecto represor sobre la expresión basal del operón.

Decidimos analizar la activación por 3,5-DHB de los promotores P_{orf18} y P_{orf20} para los otros dos segmentos de la ruta de degradación de 3,5-DHB. Para ello, realizamos ensayos de extensión a partir de cebador analizando la activación por 3,5-DHB de los promotores P_{orf18} y P_{orf20} en un mutante en el primer paso de la ruta (*dbhL*), empleando como molde ARN de *T. aromatica* AR-1 y de la cepa mutante en *dbhL*. Como podemos observar en la figura 67, de nuevo el mutante en el primer paso de la ruta (*dbhL*) presenta niveles altos de expresión en células creciendo en succinato como única fuente de carbono, en ausencia de 3,5-DHB. Estos niveles fueron más elevados en presencia del sustrato. Estos resultados parecen indicar que el 3,5-DHB es el inductor de la ruta, y que el producto de *dbhL* participa de algún modo en la regulación de los tres promotores manteniendo el promotor inactivo en ausencia de sustrato.

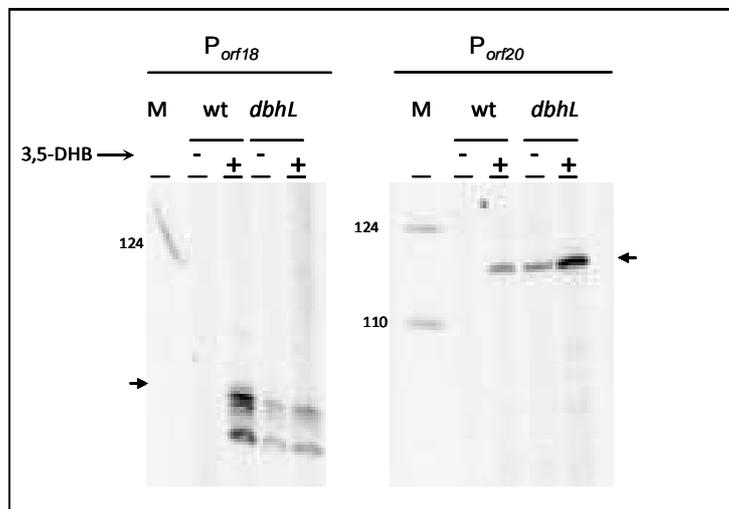


Figura 67. Identificación del inductor de la ruta de degradación 3,5-DHB. Extensión a partir de cebador de ARN extraído de células de *T. aromatica* AR-1 silvestre (wt) y mutante AR-1Mut Δ *dbhL* (*dbhL*) tras 72h creciendo en condiciones desnitrificantes con succinato (2 mM) (-) y 3,5-DHB más succinato (1 y 2 mM) (+) como fuentes de carbono. La extracción de ARN y la extensión a partir de cebador se realizaron como se detalla en el apartado 6.11 y 7 de Materiales y Métodos. Los oligonucleótidos empleados fueron primob (para P_{orf18}) y rt-suc_5' (para P_{orf20}) (Tabla 6 de Materiales y Métodos). La calle M contiene el marcador de peso molecular VIII (Roche), junto a las bandas se indica su tamaño en nucleótidos. Las flechas indican los productos de extensión correspondientes a los dos promotores.

4 EFECTO DE FUENTES DE CARBONO ALTERNATIVAS SOBRE LA DEGRADACIÓN DE 3,5-DHB POR *T. aromatica* AR-1

Tanto en rutas de degradación aerobias como en rutas anaerobias, es frecuente que la regulación específica de la ruta dependiente de la presencia de sustrato esté sujeta a mecanismos de regulación global destinados a optimizar el aprovechamiento de los recursos disponibles para la célula (Saier, 1996; Morales et al., 2004; Aranda-Olmedo et al., 2005; Gorke and Stulke, 2008) Uno de estos mecanismos permite regular la utilización de una fuente de carbono en presencia de fuentes de carbono alternativas más favorables, un fenómeno que se conoce genéricamente como represión catabólica (Hester et al., 2000)

4.1 Caracterización del crecimiento de *T. aromatica* AR1.en presencia de dos fuentes alternativas de carbono

Para determinar si la presencia en el medio de fuentes alternativas de carbono afectaba a la utilización de 3,5-DHB, decidimos analizar el consumo de fuentes de carbono en cultivos de *T. aromatica* AR-1 en condiciones desnitrificantes con succinato y 3,5-DHB como fuentes simultáneas de carbono. Para ello se iniciaron cultivos de *T. aromatica* AR-1 en medio con 2 mM de succinato más 1 mM de 3,5-DHB y se tomaron periódicamente muestras a lo largo de la curva de crecimiento para determinar turbidez del cultivo (medida como DO 600 nm), concentración de los dos sustratos y reducción del aceptor de electrones (Figura 68).

La figura 68 muestra los resultados obtenidos. Se pudo observar crecimiento exponencial durante las primeras 24 h, tras lo cual se producía una fase de latencia de aproximadamente 24 h sin crecimiento neto detectable. Transcurrido esta fase se reiniciaba el crecimiento hasta alcanzar el valor máximo. El análisis de los sobrenadantes de los cultivos mediante HPLC mostró que en las primeras 24 h se consumía totalmente el succinato, produciéndose una degradación mínima de 3,5-DHB. Una vez consumido todo el succinato en el medio, el crecimiento cesaba, reiniciándose 24 h más tarde, momento a partir del cual se empezaba a consumir el 3,5-DHB hasta su totalidad. Por tanto, podemos concluir que *T. aromatica* AR-1 presentaba crecimiento diaúxico típico, lo que permite sugerir que la degradación de 3,5-DHB está sujeta a represión catabólica, un nivel de regulación superior a la regulación específica por sustrato.

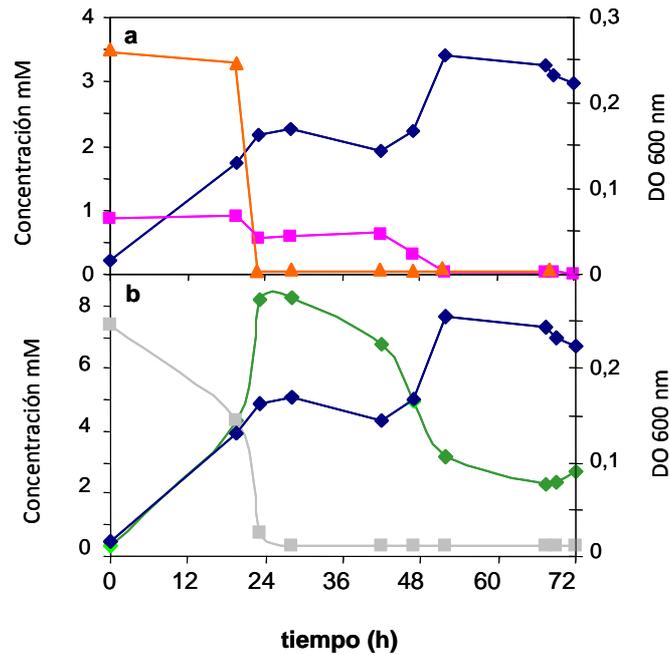


Figura 68. Crecimiento diauxico de *T. aromatica* AR-1 con succinato (3,5 mM), 3,5-DHB (1 mM) y KNO_3 (8 mM) como aceptor final de electrones. A los tiempos indicados se tomó 1 ml del cultivo para medir DO a 600 nm (azul), posteriormente se centrifugó y el sobrenadante se empleó para la determinación de 3,5-DHB (rosa), succinato (rojo) (a), nitrato (gris) y nitrito (verde) (b) mediante HPLC según se detalla en los apartados 11.4, 11.5 y 11.6 de Materiales y Métodos.

Actualmente desconocemos los mecanismos implicados en esta regulación, aunque se ha detectado mediante PCR la presencia de un gen homólogo a CRP en el cromosoma de esta cepa.

Es interesante destacar que, en la primera etapa, el nitrato era utilizado como aceptor de electrones, siendo reducido totalmente hasta nitrito, que presentaba una concentración máxima equivalente a la concentración inicial de nitrato durante la fase intermedia de latencia. Posteriormente el nitrito desaparece paulatinamente y de forma paralela a la degradación de 3,5-DHB. Por tanto, en la primera fase de crecimiento a expensas de succinato sólo el nitrato actúa como aceptor de electrones en la respiración hasta ser consumido en su totalidad, y sólo a partir de ese momento se produce la respiración de nitrito (desnitrificación). Estos resultados sugieren la existencia de mecanismos estrictos de regulación de las enzimas respiratorias que mantendrían inactiva la nitrito reductasa en presencia de nitrato o hasta alcanzar concentraciones elevadas de nitrito. En muchos organismos, la actividad de la nitrito reductasa depende del aumento de concentración de NO en el medio (van Spanning et al., 2007).

4.2 Efectos en la degradación de 3,5-DHB en los mutantes de *T. aromatica* AR-1 en presencia de una fuente adicional de carbono

Este mismo experimento se repitió con los mutantes en distintos genes de la ruta. Mutantes en la *orf7* y *orf8* (*DbhLS*); y en *bqdM*, *orf20*, *21* y *bqdL* (que participan en el tercer paso de la ruta)

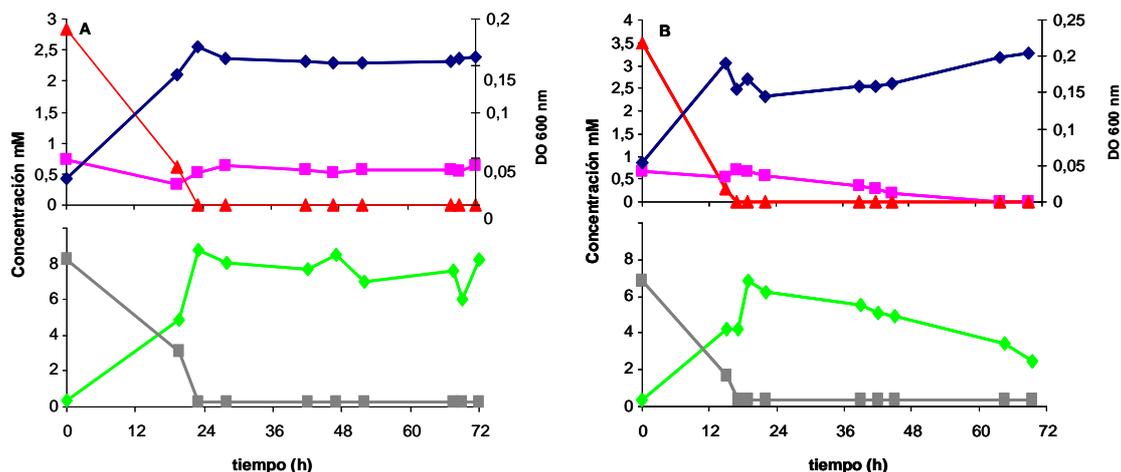


Figura 69. Crecimiento de las cepas mutantes *dbhS* (A) y *bqdM* (B) con succinato (3,5 mM), 3,5-DHB (1 mM) y KNO_3 (8 mM) como aceptor final de electrones. A los tiempos indicados se tomó 1 ml del cultivo para medir DO a 600 nm (azul), posteriormente se centrifugó y el sobrenadante se empleó para la determinación de 3,5-DHB (rosa), succinato (rojo), nitrato (gris) y nitrito (verde) mediante HPLC según se detalla en los apartados 11.4, 11.5 y 11.6 de Materiales y Métodos.

Como cabía esperar, los mutantes en los genes *dbhL*, *dbhS*, *orf18*, *orf20*, *orf21* y *bqdL*, que no eran capaces de crecer en 3,5-DHB (Figura 53, Cap II) tampoco lo degradaban, y por tanto se acumulaba en el medio. Estas cepas sólo consiguieron crecer durante las primeras 24 h gracias a la degradación de succinato, que en todos los casos fue completamente degradado. El nitrato, que actúa como aceptor de electrones durante la degradación de succinato, es degradado completamente hasta nitrito que se acumula en el medio debido a que no hay degradación de 3,5-DHB. La DO es menor y se asemeja a la alcanzada por la cepa silvestre durante la primera etapa del crecimiento. Como ejemplo se muestra en la figura 69A el comportamiento del mutante *dbhS*. La figura 69B muestra el comportamiento del mutante *bqdM*, que sí era capaz de crecer en 3,5-DHB (Figura 53, Cap II) y que por tanto lo degradaba, aunque más lentamente. En este caso el nitrato es degradado hasta nitrito que va desapareciendo lentamente, ya que es usado como aceptor de electrones en la degradación de 3,5-DHB. La DO alcanzada es mayor y se asemeja a la de la cepa silvestre.

DISCUSIÓN

Las dos rutas de degradación analizadas en esta tesis son las únicas representantes hasta este momento de un nuevo tipo de estrategia a través de la cual bacterias reductoras de nitrato son capaces de degradar compuestos aromáticos en ausencia de oxígeno. El paso fundamental en ambas rutas es un ataque a los sustratos hidroxilados mediante un mecanismo de oxidación independiente de oxígeno. Esta estrategia difiere básicamente de la estrategia utilizada por otros organismos anaerobios, que degradan estos compuestos mediante un mecanismo reductivo. Al inicio de esta tesis se conocían las bases bioquímicas de la degradación de resorcinol por *A. anaerobius* y se había identificado la agrupación génica responsable de la ruta. En este trabajo hemos iniciado el estudio de la regulación de su expresión. Por otra parte, las características bioquímicas de la degradación de 3,5DHB en *T. aromatica* permitían predecir la existencia en esta cepa de una ruta semejante a la descrita en *A. anaerobius* para el resorcinol, por lo que gran parte del trabajo se ha centrado en la identificación y caracterización genética de esta ruta. En su conjunto, los nuevos conocimientos adquiridos nos permiten afianzar esta estrategia como un mecanismo consolidado de degradación de compuestos aromáticos hidroxilados en bacterias desnitrificantes.

1. Organización transcripcional y expresión de los genes para la degradación de resorcinol en *A. anaerobius*

En la mayoría de los microorganismos aerobios, los genes de las rutas de degradación de compuestos aromáticos se encuentran agrupados en operones, que pueden estar dispersos o localizados en una misma región del cromosoma, formando una organización supraoperónica, como ocurre en *Acinetobacter baylyi* ADP1 (Young et al., 2005). Igualmente, los genes para la degradación anaerobia de compuestos aromáticos se encuentran con frecuencia agrupados en operones, que en algunos casos forman también organizaciones supraoperónicas (Carmona et al., 2009). Esto se observa al analizar la secuencia de algunos genomas de cepas degradadoras anaerobias, como *R. pallustris* (Egland et al., 1997), y en algunos casos estas agrupaciones se concentran en determinadas regiones formando islas catabólicas de gran tamaño (300 Kb), como en *G. metallireducens* (Butler et al., 2007). Sin embargo en otros casos, las agrupaciones génicas involucradas en la degradación de estos compuestos aromáticos se encuentran dispersas en el cromosoma, como por ejemplo en *Azoarcus* sp EbN1 (Rabus et al., 2005) y *M. magnetotacticum* AMB-1 (Matsunaga et al., 2005).

En *A. anaerobius*, una β -proteobacteria aislada de lodos activos capaz de degradar resorcinol hasta CO_2 y agua, la ruta de degradación implica la hidroxilación de resorcinol hasta HHQ, que es posteriormente oxidada hasta HBQ. Ambas actividades están asociadas a la membrana (Philipp and Schink, 1998). En trabajos anteriores, se aisló de una genoteca de la cepa un cósmido que contenía todos los genes para la degradación de resorcinol agrupados en una región de 29,88 kb. Mediante similitud de secuencia con otras enzimas conocidas y gracias a la obtención de una serie de mutantes esenciales, se identificaron los principales genes implicados en la degradación anaerobia de resorcinol (Darley et al., 2007). El primer objetivo de esta tesis fue analizar la regulación de la expresión de estos genes.

Para determinar las unidades transcripcionales en que se organizaban estos genes, se llevó a cabo un análisis de co-expresión de genes mediante ensayos de RT-PCR (Figura 21). Según los resultados obtenidos, pudimos definir cuatro unidades transcripcionales:

El **operón I**, inducible por la presencia de resorcinol, lo formarían los genes para el complejo resorcinol hidroxilasa (*rhLS*) además de *orf4*, *orf5* y *orf6*, que en principio no parecen jugar un papel importante en la degradación de resorcinol, ya que un mutante en *orf5* no era esencial para la degradación de resorcinol (Darley et al., 2007). Sin embargo, el hecho de que estos genes se induzcan por resorcinol implica que deben jugar algún papel en la degradación, aunque hasta el momento no se ha determinado.

El **operón II** sólo se expresa en presencia de resorcinol y estaría constituido por los genes para el complejo hidroxibenzoquinona deshidrogenasa, *bqdhLSM*, que participa en la rotura de la HBQ hasta acetato y malato. Además incluiría el gen para el regulador *redR1*, cuya expresión dependería por tanto de la presencia del sustrato.

El **operón III** lo formarían la *orf8*, *orf9* y *orf10*, y también se induce por resorcinol. La ORF8 presenta homología con proteínas de la familia de las tiorredoxinas, que se caracterizan por la presencia de dos cisteínas vecinas formando un motivo CXXC en el extremo N-terminal (Amegbey et al., 2003). Estas proteínas participan en el control del estado redox de la célula y actúan como antioxidantes, facilitando la reducción de otras proteínas a través de un intercambio tiol-disulfuro en la cisteína. El producto de *orf8* se induce en presencia de resorcinol, por lo que es probable su implicación en la degradación de este compuesto. El producto de *orf9* guarda homología con proteínas transportadoras de la superfamilia MFS (*Major Facilitator Superfamily*); como los demás miembros de la familia, es una proteína de

gran tamaño (411 aminoácidos) formada por 12 alfa-hélices transmembrana conectadas por bucles hidrofílicos. Estas proteínas facilitan el transporte de una gran variedad de sustratos a través de la membrana utilizando el potencial electroquímico del sustrato transportado, y tienen tres posibles mecanismos de acción: como uniporter, symporter o antiporter (Law et al., 2008). Dentro de esta familia, los que transportan ácidos aromáticos son de tipo symporter y pertenecen a la familia AAHS (*Aromatic Acid:H⁺ Symporter*) (Pao et al., 1998; Saier et al., 1999). La ORF9, por tanto, podría participar en el transporte de resorcinol al interior de la célula (Hellstern, 2005). El producto del último gen de este operón, *orf10*, presenta un 46% de identidad con la ORF21 del cluster de genes para la degradación de 3,5-DHB de *T. aromatica* AR-1 identificado en este trabajo. Aunque un mutante en el producto de *orf10* no resultó ser esencial para la degradación de resorcinol (Darley et al., 2007), una mutación en la *orf21* de *T. aromatica* AR-1 sí resultó esencial para la degradación de 3,5-DHB (Figura 53, Capítulo II). Ambos genes se inducen por la presencia del sustrato respectivo, lo que los hace fuertes candidatos a participar en su degradación. Pertenecen a la familia CobW, y conservan un dominio GTPasa en el extremo N-terminal, que también se ha encontrado en algunas proteínas como UreG de *M. tuberculosis*, que funciona como chaperona en la activación de la ureasa por la inserción de níquel en su centro activo (Zambelli et al., 2007). Existe un sistema de transporte de proteínas a la membrana denominado Tat (*twin-arginina translocation*) (Sargent, 2007) por el que se transportan algunas proteínas de membrana con dos argininas contiguas (RR) en su extremo amino terminal, motivo que también se encuentra en RhL y DbhL (Figura 41). Esta secuencia actúa generalmente como una señal que es reconocida por chaperonas que van a participar en su maduración y ensamblaje en la membrana. Un de los ejemplos mejor estudiado es TorD de *E. coli*, con actividad GTPasa, que actúa como una chaperona que coordina la maduración y exportación al periplasma de la enzima respiratoria trimetilamina N-óxido reductasa (TorA) (Méjean et al., 1994). Trabajos recientes demuestran que TorD actúa como una plataforma donde tienen lugar los últimos pasos en la biosíntesis del cofactor molibdeno y su inserción en el sitio catalítico de la apoproteína. TorD interacciona con MobA, enzima que cataliza la conversión de MoMPT (molibdeno-molibdopterina) hasta MGD (molibdopterina guanina dinucleótido), provocando la unión de molibdeno a TorA, y por tanto su maduración (Genest et al., 2008; Genest et al., 2009). La hidrólisis de GTP a menudo es necesaria para regular procesos donde varias proteínas pueden funcionar coordinadamente (Bernstein et al., 1989), y la maduración de TorA es un proceso complejo que requiere la coordinación de dos funciones distintas de TorD: en el ensamblaje de TorA y en la interacción de proteínas para la unión de molibdeno.

Esto sugiere que ORF10 de *A. anaerobius* y ORF21 de *T. aromatica*, que conservan el dominio de actividad GTPasa y un sitio de unión a metal (Figura 48), podrían actuar como chaperonas uniendo molibdeno al complejo resorcinol hidroxilasa (RhLS) o 3,5-DHB hidroxilasa (DbhLS), respectivamente, y participar en el ensamblaje y maduración de las proteínas y en su asociación a la membrana. Hay que destacar que RhLS y DbhLS, pese a localizarse en la fracción de proteínas asociadas a membrana (Gallus and Schink, 1998; Philipp and Schink, 1998), no presentan en su secuencia hélices transmembrana predecibles, ni señales de exportación o inserción en la membrana.

El **operón IV**, que se induce en presencia de resorcinol, está formado por *orf12*, *btdhL*, *btdhS*, *cup*, *orf13* y *orf14*. Los genes *btdhLS* son esenciales para la degradación de resorcinol y codifican el complejo HHQ deshidrogenasa (Darley et al., 2007). Además, hemos reanotado la región comprendida entre *btdhS* y *orf13* y se ha identificado una *orf* adicional entre las posiciones 25172 y 24807, cuyo producto presenta homología con proteínas de la familia de las cupinas. Estas proteínas están asociadas a múltiples funciones en la célula y conservan los residuos de unión a metales, por lo que su función podría ser la de transportar el metal para su unión a la enzima diana (Dunwell et al., 2004). El producto de *orf13*, esencial en la degradación de resorcinol, tiene una gran similitud con aminopeptidasas de la familia M24 y es esencial para la degradación de resorcinol en *A. anaerobius* (Darley et al., 2007). Estas proteínas son esenciales en la maduración de enzimas, por lo que Darley y colaboradores (2007) proponen que ORF13 interviene en la maduración de las enzimas para la degradación de resorcinol en *A. anaerobius*. En *T. aromática* AR-1 se ha encontrado otro gen, *orf12*, cuyo producto presenta una identidad del 93% con la ORF13 de *A. anaerobius*, por lo que también proponemos que puede intervenir en la maduración de las enzimas de la ruta de degradación de 3,5-DHB. En muchos casos, la peptidasas de la familia M24 incluyen metales en su centro activo, por lo que es posible que las cupinas, codificadas por genes cercanos en ambas cepas, fuesen las transportadoras del metal correspondiente. El producto de *orf14*, también esencial en la degradación de resorcinol, muestra una alta similitud con NADH-flavín oxidorreductasas de α - y β -proteobacterias, y se ha sugerido que esta proteína podría intervenir en la cadena de transporte de electrones usando NAD(P)H como donador (Darley et al., 2007). Formando parte del mismo operón está *orf12* cuyo producto tiene una identidad del 69% con el producto de *orf20* de la ruta de degradación de 3,5-DHB de *T. aromatica* AR-1. En ambos casos su expresión se induce en presencia del sustrato y, aunque en *A. anaerobius* una mutación en *orf12* no era esencial en la degradación de resorcinol (Darley et al., 2007), en *T. aromatica* AR-1 una mutación en

la *orf20* sí resultó esencial, por lo que es probable la implicación de ORF12 en la degradación de resorcinol. El producto de *orf12*, que tiene similitud con proteínas pertenecientes a la familia aldehído deshidrogenasa (ALDHs) (Jackson et al., 2011), una superfamilia de enzimas multiméricas que catalizan la oxidación de una amplia gama de aldehídos a sus correspondientes ácidos carboxílicos con la reducción de un cofactor NAD(P) a NAD(P)H. En la degradación de HBQ se detectan como productos finales acetato y malato; este último desaparece simultáneamente a la aparición de succinato, lo que indica que el malato es el producto primario de la degradación (Hellstern, 2005). Se ha propuesto que la degradación de HBQ hasta acetato y malato implicaría la generación de intermediarios aldehído y/o cetona tras la rotura del anillo (Hellstern, 2005). Por tanto, proponemos que ORF12 podría intervenir en estas reacciones que transforman un precursor aldehído en su correspondiente ácido carboxílico y que tendría lugar después de la rotura del anillo hasta acetato y malato. En la figura 70 se presenta un esquema de los principales pasos implicados en la degradación de resorcinol.

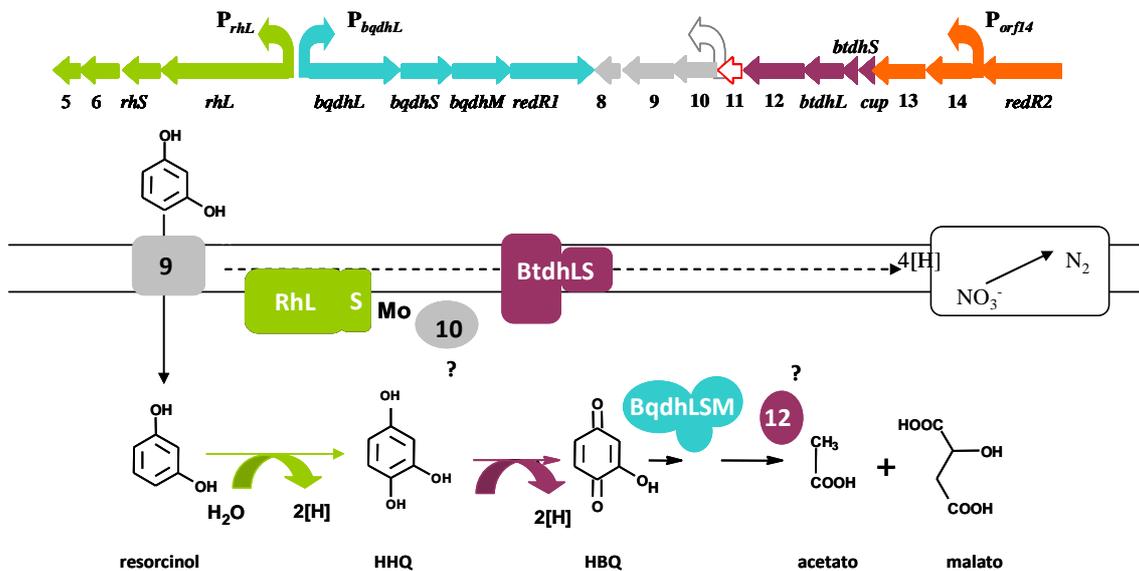


Figura 70. Principales pasos enzimáticos implicados en la ruta de degradación de resorcinol. El complejo resorcinol hidroxilasa (RhLS, verde) e HHQ deshidrogenasa (BtdhLS, morado) se encuentran asociados a la membrana. La ORF9 (Mulder et al.) en la membrana es el transportador que facilitaría la entrada de resorcinol en la célula y la ORF10 (Mulder et al.) intervendría en la unión de molibdeno y ensamblaje de las proteínas en la membrana. El complejo HBQ deshidrogenasa (BqdhLSM, turquesa) interviene en la rotura de la HBQ, y ORF12 (morado) podría participar en los sucesivos pasos hasta dar acetato y malato. Arriba se representan los genes implicados en la degradación de resorcinol, cuyos colores se corresponden con los de las proteínas abajo identificadas (Modificada a partir de Schink 2007, sin publicar).

Además de estos cuatro operones inducibles, hemos encontrado que algunos genes se transcriben en ausencia de resorcinol, como *orf5-orf6*, *orf11-orf12*, y *cup-orf13-orf14* (Figura 21). Aunque mediante RT-PCR no hemos podido observar expresión constitutiva de *redR2*, es de esperar un nivel de expresión basal mínimo en la célula, que garantice la presencia de esta proteína reguladora para su activación por el inductor (ver más adelante). De igual forma, es muy probable que la expresión constitutiva que se observa para los genes *orf5* y *orf6* también incluya a *rhL* y *rhS*, ya que si se ha podido observar expresión constitutiva desde el promotor P_{rhL2} mediante extensión a partir de cebador (Figura 22). De esta forma, el operón I constituido por los genes *rhL*, *rhS*, *orf5* y *orf6* tendrían niveles de expresión basales dependientes de P_{rhL2} , no detectables por RT-PCR en el caso de *rhLS*, que se activarían en presencia de resorcinol desde el promotor P_{rhL1} dependiente de σ^{54} .

Los resultados obtenidos en este trabajo no coinciden con la propuesta teórica inicial de organización en tres operones (Darley et al., 2007). Como podemos ver, cada uno de los pasos en la degradación de resorcinol se lleva a cabo por enzimas codificadas en diferentes unidades transcripcionales. La resorcinol hidroxilasa (*rhLS*) que cataliza el primer paso de la ruta se encuentra formando parte del operón I, la HHQ deshidrogenasa (*btdhLS*) del operón IV y la HBQ deshidrogenasa forma parte del operón II, junto con el regulador RedR1. El regulador RedR2 se transcribe en un operón independiente, aunque no hemos podido determinar si se transcribe individualmente o junto con genes adicionales situados corriente arriba, ya que es el último gen detectado en el cósmido R⁺.

Es frecuente encontrar en bacterias que los genes de una ruta de degradación estén organizados en diferentes unidades transcripcionales. Es el caso de la ruta de degradación anaerobia de benzoato de *R. palustris*, donde todos los genes están contiguos en el cromosoma, pero se organizan en cinco unidades transcripcionales: *badDEFGAB*, *badHI-aliBA-badK*, *badC*, *badR* y *badM* (Egland et al., 1997; Egland and Harwood, 1999; Pelletier and Harwood, 2000; Peres and Harwood, 2006). Esto no siempre es así, ya que en muchos casos los genes de degradación de compuestos aromáticos se encuentran en su mayoría formando una única unidad transcripcional. Esto ocurre en *Azoarcus* sp. CIB, donde los genes de degradación de benzoato se disponen formando un único operón inducible, *bzdNOPQMSTUVWXYZA*, y formando parte de otra unidad transcripcional estaría el gen regulador *bzdR* (López Barragan et al., 2004b). En *T. aromatica* los genes para la degradación anaeróbica del benzoato también se encuentran formando una única unidad transcripcional, a excepción del gen que codifica para la benzoato-CoA ligasa, que se encuentra formando parte del

cluster para la degradación aeróbica del benzoato (Breese et al., 1998; Schühle et al., 2003).

Una vez definida la organización transcripcional, se localizó el punto de inicio de la transcripción de los operones implicados en los pasos principales de la ruta: P_{rhL} para el primer paso, operón I, P_{bqdhL} para el tercer paso, operón II y P_{orf14} para el segundo paso, operón IV (Figuras 22, 23 y 24). El análisis de la secuencia aguas arriba del punto de inicio de la transcripción nos permitió confirmar que se trataba de promotores dependientes de σ^{54} . En los promotores dependientes de σ^{54} , la ARN polimerasa unida al factor σ^{54} ($E \sigma^{54}$) reconoce las secuencias -12 y -24, pero para que se produzca la formación del complejo abierto, y por tanto el inicio de la transcripción, requieren una activación específica que se lleva a cabo gracias a la acción de unas proteínas activadoras denominados EBPs (*Enhancer Binding Protein*), que hidrolizan ATP, transfiriendo a la holoenzima la energía necesaria para la formación del complejo abierto. Estas proteínas reconocen secuencias repetidas e invertidas que se sitúan corriente arriba del punto de inicio de la transcripción (UAS) y que gracias al plegamiento del ADN favorecido por la acción de la proteína IHF contactan con la holoenzima para la formación del complejo abierto e inicio de la transcripción (Figura 15) (Morett and Buck, 1989; Thöny and Hennecke, 1989; Wigneshweraraj et al., 2008). Los tres promotores dependientes de σ^{54} detectados en el cósmido R^+ son homólogos entre sí: la secuencia de reconocimiento de σ^{54} conserva ampliamente el motivo consenso de unión del factor σ^{54} (Figura 25) (GGCAC-N₅-TTGC) (Taylor et al., 1996; Burrows et al., 2003). Se han detectado repeticiones invertidas que serían los posibles sitios de unión de la proteína activadora (UAS) (Figura 27), aunque se han encontrado repeticiones invertidas adicionales que podrían constituir sitios de unión alternativos a los que proponemos. Igualmente, se conserva la posición de un posible sitio de unión de la proteína IHF (Figura 26) (Friedman, 1988), que permitiría el plegamiento de la molécula de ADN, necesario para la interacción de la proteína reguladora con la ARN polimerasa. La existencia de todas estas similitudes entre los tres promotores nos hace pensar que funcionan con mecanismos semejantes y que la proteína reguladora que reconoce los tres promotores es la misma.

En la secuencia del cósmido R^+ de *A. anaerobius* se encuentran dos genes, *redR1* y *redR2*, con homología a reguladores transcripcionales pertenecientes a la familia NtrC de activadores de promotores dependientes de σ^{54} (Darley et al., 2007). Los reguladores RedR1 y RedR2 son prácticamente idénticos en secuencia, y sólo se diferencian en los 7 primeros residuos de la proteína en el extremo N-terminal y 9 residuos que se localizan en el dominio HTH de unión al ADN en el extremo C-terminal.

Además, hay un cambio de Ile a Thr en el dominio sensor. Para determinar qué regulador era el responsable de la transcripción de cada uno de los promotores se hicieron ensayos de extensión de cebador utilizando el cósmido R⁺ silvestre y mutado en uno u otro gen regulador. En un fondo genético *redR1* no se alteraba la transcripción desde los tres promotores principales; sin embargo, al mutar *redR2*, sólo se observó transcripción desde el promotor constitutivo P_{rhL2} (Figura 31, 32 y 33). De esta forma pudimos concluir que RedR2 era el regulador principal de la ruta, responsable de la transcripción desde los tres promotores. Sin embargo, ensayos con fusiones transcripcionales de dos de los tres promotores en un huésped heterólogo llevados a cabo con posterioridad en nuestro laboratorio, han puesto de manifiesto que la proteína RedR1 a la que se le ha delecionado el dominio N-terminal responsable de detectar la señal activadora, es capaz de activar de forma constitutiva a P_{bqdhL} y P_{orf14} (resultados no mostrados). Este resultado parece indicar la existencia de mecanismos de regulación adicionales que tendrán que ser analizados en el futuro.

Hemos determinado mediante RT-PCR y extensión a partir de cebador que los genes que participan en la degradación de resorcinol se inducen cuando *A. anaerobius* crece en presencia de este sustrato, lo que parece indicar que la activación de la ruta implica la interacción del regulador con un efector, que podría ser el resorcinol o alguno de los compuestos intermedios en su metabolismo. Para analizar este extremo, se comparó la expresión de los tres promotores en fondos genéticos con cada uno de los pasos de la ruta mutados. De esta forma, pudimos observar que en *Azoarcus* sp. CIB portando el cósmido R⁺ mutado en el primer paso de la ruta (Mut_{rhL}) no había transcripción desde ninguno de los promotores, por lo que descartamos al resorcinol como inductor de la ruta. Sin embargo, la misma cepa con el cósmido R⁺ mutado en *btdhS*, segundo paso de la ruta (Mut₁₃), que debe acumular HHQ, presentaba mayores niveles de inducción tanto en presencia como en ausencia del sustrato. Por otro lado, un mutante en el tercer paso de la ruta, *bqdhS* (Mut₅₃), presentaba expresión inducible desde los tres promotores, aunque a niveles inferiores. Esto podría ser debido a una acumulación transitoria de HHQ, que es metabolizada hasta HBQ. Estos resultados apuntaban a la HHQ como efector de RedR2 para la activación de los tres promotores. Sin embargo, *A. anaerobius* y *T. aromatica* AR-1 no fueron capaces de crecer empleando este sustrato como única fuente de carbono (datos no mostrados). Pudimos comprobar que este compuesto tiene un efecto tóxico sobre estos organismos, ya que a bajas concentraciones (0,5 mM), impedía el crecimiento de cultivos suplementados con succinato como fuente de carbono (datos no mostrados).

Son muchos los reguladores pertenecientes a la familia NtrC que se activan por interacción directa con un efector. Dos ejemplos muy estudiados son DmpR de *Pseudomonas* sp., que regula la ruta de degradación aerobia de fenol y se activa por un amplio espectro de compuestos fenólicos, incluyendo algunos que no son sustrato de su catabolismo (Pavel et al., 1994; Shingler and Moore, 1994), y XylR del plásmido TOL de *P. putida* mt2, que se activa por compuestos aromáticos con una amplia variedad de sustituyentes (Marqués and Ramos, 1993; Ramos et al., 1997). Además de los sustratos de la ruta *upper* del plásmido TOL, que codifica los enzimas para la oxidación de tolueno y xilenos hasta benzoatos, otros carbohidratos que no son metabolizados por ésta pueden actuar de efectores y activar a XylR (Abril et al., 1989; Galvão and de Lorenzo, 2006). Esto es debido a que el dominio sensor de estas proteínas es capaz de reconocer compuestos de estructura semejante al sustrato de la ruta. En nuestro caso no fue posible ensayar directamente el efecto de la HHQ sobre la inducción de la ruta por la mencionada toxicidad para las células. Por ese motivo, decidimos probar distintos análogos estructurales a la HHQ, tales como el catecol (con dos grupos hidroxilo adyacentes) y el protocatecuato (con dos grupos hidroxilo enfrentados) como posibles efectores de RedR2, pero en ambos casos obtuvimos resultados negativos (Figura 36).

Uno de los resultados más interesantes de esta tesis fue observar que *Azoarcus* sp. CIB portando el cósmido R⁺ mutado en la subunidad *btdhS* (Mut_13) presentaba expresión constitutiva desde los tres promotores estudiados (P_{rhL} , P_{bqdhL} y P_{orf14}), y que el punto de inicio de la transcripción coincidía con el dependiente de σ^{54} inducido por resorcinol en la cepa silvestre. Esto sugiere que en la estirpe silvestre el gen debe tener una expresión basal constitutiva, y que la presencia de BtdhS reprime la transcripción hasta que haya una inducción específica por el sustrato HHQ. Por tanto es necesario que *btdhS* se exprese de forma constitutiva. Aunque no hemos detectado expresión constitutiva de *btdhS* mediante RT-PCR, sí se ha detectado para los genes *orf11*, *orf12*, *cup*, *orf13* y *orf14*; por lo que no podemos descartar la existencia de un transcrito de expresión constitutiva que se extienda desde *orf14* hasta *orf11*, incluyendo *btdhS* (Figura 21).

El producto de *btdhS* codifica una proteína de 135 aminoácidos con cuatro dominios transmembrana, que guarda una gran homología con DoxD de la archeae *Acidianus ambivalens*, que presenta actividad thiosulfato-quinona oxidorreductasa (TQO) (Müller et al., 2004). DoxD es un complejo integral de membrana que participa en la oxidación de sulfuro y utiliza quinonas como aceptores de electrones. BtdhS junto con BtdhL forman el complejo HHQ deshidrogenasa, responsable de la oxidación

de HHQ hasta HBQ (Philipp and Schink, 1998; Darley et al., 2007). Es probable que en este proceso, los electrones se transfieran a través de BtdhS a la cadena de transporte de electrones, por lo que esta proteína oscilaría entre los estados oxidado y reducido, que estaría reducida cuando *A. anaerobius* crece en presencia de resorcinol. Sin embargo, cuando crece en presencia de un sustrato que no utiliza esta vía, BtdhS estará siempre en estado oxidado, y puede ser en estas condiciones cuando ejerza su efecto represor, directa o indirectamente, sobre la expresión de los promotores (Figura 71). Considerando su secuencia de aminoácidos y la predicción de su localización como proteína integral de membrana, se puede descartar un papel directo de BtdhS a nivel de DNA en la activación de la transcripción.

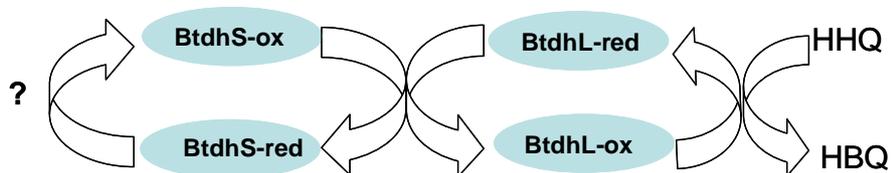


Figura 71. Esquema que muestra la transferencia de electrones en la oxidación de HHQ hasta HBQ mediada por BtdhLS. Las proteínas BtdhL y BtdhS oscilan entre su estado oxidado (ox) y reducido (red). Con una interrogación (?) se representa al aceptor de electrones desconocido de la membrana.

Se han descrito otros casos en los que el estado redox de la célula puede actuar regulando la expresión génica. En la biodegradación de la tetralina por *Sphingomonas macrogolita* se ha observado que el regulador de la ruta, ThnR, que pertenece a la familia de LysR, se induce por tetralina pero además está sometido a un nivel superior de regulación; se ha observado que el estado reducido de ThnY, una proteína con homología con el componente ferredoxina reductasa de las dioginenasas, inhibe la expresión de los genes *thn* para la degradación de tetralina (Martinez-Perez et al., 2004). Cuando se bloquea el transporte de electrones hacia la dioxigenasa, que en estado reducido va a catalizar el primer paso en la degradación de tetralina, se inhibe la expresión de los genes *thn* mediada por el regulador principal ThnR (Martinez-Perez et al., 2007). De esta manera se controla que aunque el inductor esté presente en el medio, sólo se produce la activación de los genes cuando de verdad es posible que se lleve a cabo la degradación de la tetralina. Aunque en *A. anaerobius* el regulador RedR2 pertenece a la familia NtrC, el fenotipo observado es

similar: además de responder a una activación por el inductor (HHQ), el regulador está también sometido a un nivel superior de control que conecta los niveles de expresión de la ruta con el estado de oxido-reducción de la célula.

Existe otro ejemplo muy bien estudiado, en el que una proteína asociada a la membrana (PspA) ejerce un efecto represor sobre un regulador de la familia NtrC (PspF). Es el caso del sistema de respuesta a Psp (*Phage Shock Protein*) estudiado en profundidad en *E. coli* y *Yersinia enterocolitica*. En este sistema, PspA puede unirse a PspF formando un complejo que inhibe la actividad ATPasa del activador, que en estas condiciones es incapaz de activar la transcripción. Sin embargo cuando PspA, a través de otras proteínas de membrana (PspBC), detecta una señal de estrés en la membrana, se libera el complejo inhibitorio PspA-PspF, lo que pone en marcha la transcripción regulada por PspF de los genes del regulón (Joly et al., 2010).

Tanto RedR1 como RedR2 contienen un dominio PAS, presente en muchas proteínas implicadas en señalización, cuya función es detectar señales ambientales, como por ejemplo tensión de oxígeno o potencial redox (Möglich et al., 2009). La actividad de otra proteína de la familia NtrC, NifA de *Azotobacter vinelandii*, está controlada por la proteína NifL, que responde a cambios en los niveles de oxígeno en la célula. Los genes *nif* son responsables de la síntesis y regulación de la actividad nitrogenasa en distintas bacterias fijadoras de nitrógeno. NifL contiene dos dominios PAS en tándem: el dominio PAS1, que contiene el cofactor FAD, capaz de detectar el potencial redox de la célula, y el dominio PAS2, que no une cofactor y cuya función es desconocida (Hill et al., 1996; Macheroux et al., 1998). El siguiente modelo explica el mecanismo de acción de NifL: en presencia de oxígeno, el FAD del dominio PAS1 es fácilmente oxidado, lo que provoca cambios estructurales en las láminas beta del dominio PAS1 que se propagan rápidamente, provocando cambios en la estructura cuaternaria del dominio PAS2 y generando una reorganización de los demás dominios de NifL. Esto modifica su afinidad por NifA, permitiendo su interacción con ella y provocando su inactivación, impidiéndose de esta forma la transcripción de los genes *nif* en presencia de oxígeno (Key et al., 2007; Slavny et al., 2010; Little et al., 2011).

Parece por tanto que es habitual que reguladores de la familia de NtrC respondan a señales múltiples del entorno, dando lugar a distintas posibilidades de control. Actualmente no podemos definir qué tipo de mecanismos adicionales subyacen en la regulación mediada por RedR2 y RedR1. Sin embargo, el conjunto de nuestros resultados nos permite proponer el siguiente modelo de regulación de la ruta de degradación de resorcinol en *A. anaerobius* (Figura 72): en ausencia de resorcinol, se está produciendo el complejo resorcinol hidroxilasa (RhLS) gracias a la expresión

desde el promotor constitutivo P_{rhL2} , de manera que cuando *A. anaerobius* detecta la presencia de resorcinol, éste es inmediatamente metabolizado hasta HHQ, el inductor de la ruta que se va a unir a RedR2 (que debe tener una expresión basal), provocando su activación. La forma activa de este regulador es la responsable de la transcripción a partir de los tres promotores que ponen en marcha la ruta de degradación. El regulador RedR1 sólo aparece cuando se ha activado RedR2, ya que su transcripción se produce a partir del promotor dependiente de σ^{54} P_{bqdhL} .

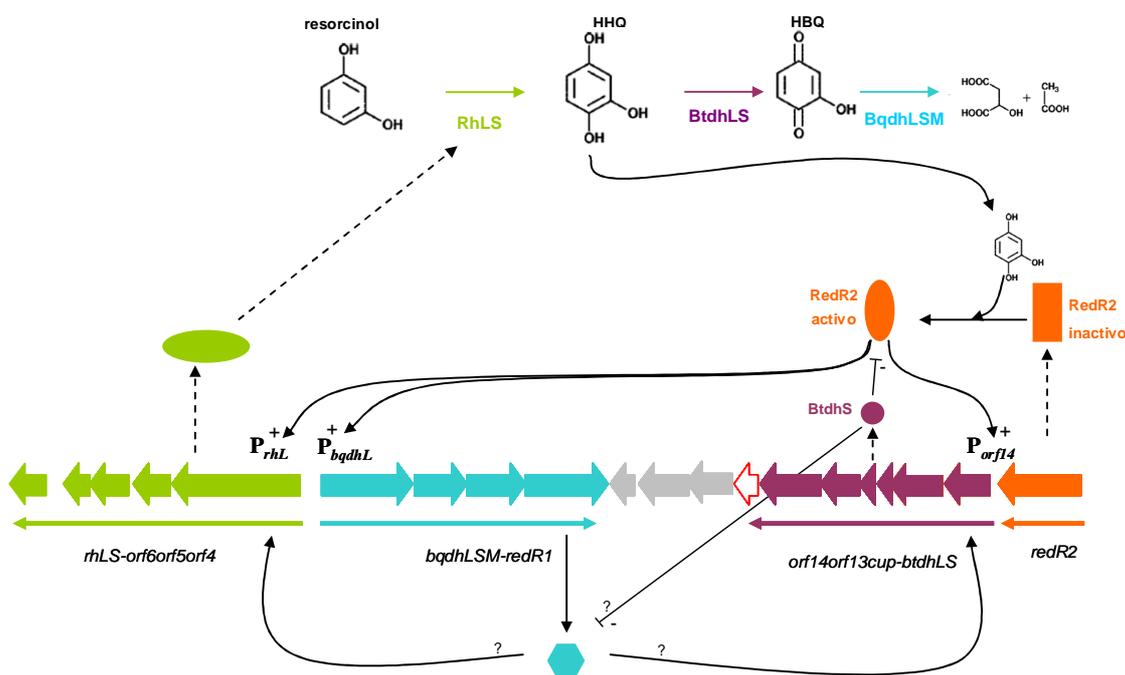


Figura. 72. Modelo de regulación en la degradación de resorcinol en *A. anaerobius*. Por colores se representan los principales operones implicados en la degradación de resorcinol; el operón I (verde) que contiene los genes que codifican el complejo resorcinol hidroxilasa, el operón II (turquesa) con los genes para el complejo HBQ deshidrogenasa y RedR1, el operón IV (morado) contiene los genes para el complejo HHQ deshidrogenasa, y RedR2 en un operón independiente (naranja). En ausencia de sustrato, los niveles basales de síntesis (flechas discontinuas) producen RedR2 inactivo y el complejo resorcinol hidroxilasa. Cuando el resorcinol entra en la célula, éste es metabolizado por la resorcinol hidroxilasa hasta dar HHQ, que se va a unir a RedR2 para dar su forma activa, que es la responsable de activar (flechas continuas) la transcripción dependiente de σ^{54} desde los promotores P_{rhL1} , P_{bqdhL} y P_{orf14} . De esta forma se sintetizan todas las enzimas para la degradación del resorcinol y el regulador RedR1, que podría participar en la activación de los promotores P_{bqdhL} y P_{orf14} en alguna circunstancia. Por su parte, la proteína de membrana BtdhS inhibiría de alguna manera la actividad del (de los) regulador(es).

Según este modelo RedR2 es el regulador principal y responsable de la transcripción desde los tres promotores dependiente de σ^{54} . Queda aún por descifrar el por qué de la existencia de dos reguladores prácticamente idénticos, cuando sólo

uno de ellos parece ser el responsable de la activación de los tres promotores. Por otra parte, es necesario conocer qué regulador es el responsable de la expresión constitutiva observada en ausencia de la proteína BtdhS, qué señal es la que se percibe por esta proteína, y cuál es el mecanismo por el que se transfiere al regulador.

2. Detección e identificación de los genes involucrados en la degradación de α -resorcilato (3,5-dihidroxibenzoato) en *T. aromatica* AR-1

T. aromatica AR-1 es una β -proteobacteria anaerobia facultativa capaz de crecer con 3,5-DHB como única fuente de carbono y nitrato como aceptor de electrones (Gallus et al., 1997). En esta cepa la degradación de 3,5-DHB ocurre vía oxidativa y descarboxilativa hasta HHQ, de tal forma que el 3,5-DHB se convierte en HHQ por una hidroxilación seguida de una descarboxilación (Gallus and Schink, 1998). Este tipo de reacción, y la formación del intermediario HHQ, es común a la ruta de degradación de resorcinol en *A. anaerobius*, bien caracterizada a nivel bioquímico y genético (Darley et al., 2007). Esta homología nos permitió proponer el funcionamiento de rutas enzimáticas semejantes de degradación de aromáticos hidroxilados en ambas cepas. Se conoce con bastante detalle la ruta bioquímica para la degradación de 3,5-DHB, pero al inicio de esta tesis carecíamos de información sobre los genes que participaban en ella. Éste fue uno de los principales objetivos planteados en este trabajo: identificar y caracterizar los genes implicados en la degradación de 3,5-DHB.

El uso de sondas para los genes de degradación de resorcinol de *A. anaerobius* en condiciones relajadas nos permitió detectar en el cromosoma de *T. aromatica* AR-1 la presencia de genes homólogos a los genes de degradación de resorcinol. Estas sondas se emplearon para el rastreo de una genoteca de la cepa, de la que se seleccionaron una serie de cósmidos positivos. La secuenciación individual y masiva de un grupo de cósmidos dio como resultado una secuencia completa de 33905 pb con un total de 25 marcos abiertos de lectura. La asignación inicial de funciones de las ORFs se hizo por comparación con secuencias disponibles en distintas bases de datos de GenBank (Tabla 13), lo que nos permitió proponer algunas funciones. Por otra parte, la obtención y análisis fenotípico de mutantes determinó qué genes eran esenciales para el crecimiento en 3,5-DHB, y por tanto firmes candidatos a participar en la degradación de este compuesto.

En este trabajo no ha sido posible obtener un único cósmido que portara todos los genes para la degradación de 3,5-DHB. Probablemente una de las causas sea el

límite de empaquetamiento en fago, que sólo permite un empaquetamiento de ADN recombinante de entre 47 y 51 kb, lo que implica insertos de cromosoma de 26 a 30 Kb. En nuestro caso, entre el primer gen de la agrupación involucrado en la degradación de 3,5-DHB (*dbhL*) y el último gen detectado en el extremo opuesto hay aproximadamente 27 kb, un tamaño muy próximo al límite de fragmento empaquetado. En la secuencia analizada de *T. aromatica* AR-1 encontramos adyacentes al primer gen de degradación de 3,5-DHB las *orf5* y *orf6*, que son homólogas a los genes *korA* y *korB* de *T. aromatica* K172 y MZ1T que codifican las subunidades α y β respectivamente de la enzima KGOR (2-oxoglutarato ferredoxín oxidorreductasa), responsable de regenerar la ferredoxina reducida necesaria en el primer paso del catabolismo del benzoil-CoA (Reams and Neidle, 2004). En *T. aromatica* K172 los genes que codifican la KGOR se encuentran adyacentes al operón *bad* para la degradación de benzoato, igual que ocurre en *M. magnetotacticum* MS-1 (López Barragan et al., 2004a), *Magnetospirillum* sp. TS-6 (Shinoda et al., 2005) y *M. magnetotacticum* AMB-1. Sin embargo, en la región cromosómica secuenciada de *T. aromatica* AR-1 no se han encontrado genes para la degradación del benzoato aguas arriba de *korAB*, como ocurre en *T. aromatica* K172. Aguas arriba encontramos una proteína reguladora de la familia de LysR y aguas abajo los genes para la 3,5-DHB hidroxilasa (*dbhLS*), que cataliza el primer paso en la degradación del 3,5-DHB. Es llamativo que los genes *korAB* aparezcan adyacentes a la ruta de degradación de 3,5-DHB, ya que en la degradación de este sustrato no interviene la ferredoxina y tampoco se ha encontrado ningún gen homólogo en el *cluster* de genes de *T. aromatica* AR-1. En *T. aromatica* MZ1T, la única estirpe de *T. aromatica* secuenciada hasta la fecha, aguas arriba de *korAB* se encuentran los genes para la degradación del benzoato (operón *bad*) y aguas abajo otros genes entre los que se encuentran numerosas oxidorreductasas (GenBank CP001281). En *Azoarcus* sp. CIB, adyacente a los genes *mbd* que participan en la ruta central del 3-metilbenzoil-CoA, necesaria para la degradación anaeróbica de 3MBz y *m*-xileno, también se han encontrado los genes *korA* y *korB* junto a una ferredoxina (MbdM) (Fernández-Juárez, 2011), que en esta ruta se encargan de regenerar el poder reductor para la 3-metilbenzoil-CoA reductasa. No siempre se han encontrado los genes del sistema KGOR asociados a los genes de degradación del benzoato. En *Aromatoleum aromaticum* EbN1 se ha encontrado *korAB* en otra región del cromosoma, lejos de los genes para la degradación del benzoato (Rabus et al., 2005). En *T. aromatica* AR-1 *korA* y *korB* se expresan constitutivamente, de forma independiente a la presencia de 3,5-DHB y formando una unidad transcripcional, lo que hace pensar que no participan en la degradación de este compuesto. *T. aromatica* AR-1, al igual que la cepa K172, es capaz de utilizar

anaeróbicamente benzoato como fuente de carbono (Philipp and Schink, 2000). Sin embargo, en nuestro análisis no hemos encontrado los genes del operón *bad* adyacentes a *korAB*. El tamaño de la región analizada no nos permite descartar la presencia de estos genes en regiones cercanas a las secuenciadas. Por otra parte, es posible que en el cromosoma de esta cepa se hayan producido procesos de reorganización génica e incluso procesos de duplicación, que hayan provocado que los genes *korAB* se encuentren en un contexto genético tan diferente al de las otras cepas de *T. aromatica*. Estos mecanismos se consideran una de las principales fuerzas evolutivas en la evolución vertical de las islas catabólicas (Reams and Neidle, 2004; Young et al., 2005).

Como resultado adicional de la pirosecuenciación de los cósmidos de la genoteca de *T. aromatica* AR-1 se obtuvo un contig (C18) de 13,3 kb que contenía los genes que codifican para la nitrato y la nitrito reductasa con una gran homología a los de la cepa MZ1T (86% de identidad). Pese a no haber podido ensamblar este contig con la secuencia del cluster de degradación de 3,5-DHB, la detección de estos genes parece indicar que los genes para la reducción de nitrato están muy próximos al *cluster* de genes para la degradación de 3,5-DHB. Otro contig (C37) de 1,6 kb contenía genes con homología a transposasas (87% de identidad) de *A. aromaticum* EbN1. La detección de elemento de inserción en la proximidad del cluster de degradación de 3,5-DHB podría indicar que se trata de un punto caliente donde tienen lugar procesos de recombinación y reorganización genética.

El análisis *in silico* de la secuencia obtenida nos permitió identificar los genes implicados en los pasos principales de degradación de 3,5-DHB.

Genes para el primer paso de la ruta, la 3,5-DHB hidroxilasa. La actividad enzimática responsable de la oxidación del 3,5-DHB está asociada a membrana: el 61,7 % de la actividad 3,5-DHB se localiza en la fracción de membranas, apareciendo un compuesto primario no identificado como producto de la reacción. La formación posterior de HHQ por descarboxilación de este intermediario desconocido requiere de la fracción citoplásmica (Gallus and Schink, 1998; Philipp and Schink, 2000). Esto indica que la descarboxilación no es el resultado de una reacción espontánea, como alguna vez se ha propuesto. Las *orf7* y *orf8* presentaban un 53,7% y un 53% de identidad, respectivamente, con los genes *rhL* y *rhS*, que participan en el primer paso en la degradación de resorcinol en *A. anaerobius* (Darley et al., 2007). Por otra parte, mutantes en *orf7* y *orf8* resultaron ser incapaces de degradar 3,5-DHB (Figura 53), y presentaban niveles de actividad 3,5-DHB hidroxilasa prácticamente nulos (Figura 56 y 69). Por tanto proponemos que estos dos genes codifican el complejo 3,5-DHB

hidroxilasa en *T. aromatica* AR-1 (*dbhLS*). Como resultado de la hidroxilación del 3,5-DHB se genera un compuesto intermediario, 2,3,5-trihidroxibenzoato (THB) (Gallus and Schink, 1998), que es descarboxilado hasta HHQ por la acción de alguna(s) proteína(s) citoplásmica(s). Puesto que esta reacción no tiene lugar en *A. anaerobius*, el candidato para llevar a cabo esta reacción no debe de estar conservado en el *cluster* de degradación de resorcinol de esta cepa. Entre los genes identificados en *T. aromática*, *orf17* no tiene su homólogo en *A. anaerobius* y su producto génico presenta homología con α/β hidrolasas que rompen enlaces C-C. Parece por tanto un buen candidato a codificar la decarboxilasa de THB.

Genes para la HHQ deshidrogenasa. En *A. anaerobius* la HHQ deshidrogenasa lleva a cabo una reacción redox en la cual la HHQ se oxida paralelamente a la reducción de nitrato a nitrito. Esta reacción ocurre en la fracción de membranas (Philipp and Schink, 1998). En esta cepa el gen *btdhL*, anotada como subunidad grande de la HHQ deshidrogenasa, se agrupa con *btdhS*, anotado como subunidad pequeña de la HHQ deshidrogenasa, con un gen para una cupina que hemos reanotado en esta Tesis Doctoral (Tabla 7), y con el gen *orf13*, que presenta una alta homología con la aminopeptidasas de la familia M24 (Darley et al., 2007). Estos cuatro genes están incluidos en la misma unidad transcripcional (Figura 21). En *T. aromatica* AR1 hemos identificamos el gen *orf11*, cuyo producto presentaba alta homología con deshidrogenasas, y que conservaba en el extremo amino un dominio típico de unión a NAD^+ . El producto de este gen presentaba también un 33% de identidad con la proteína BtdhL de *A. anaerobius*. Al igual que en *A. anaerobius*, en *T. aromatica* AR1 esta actividad está asociada a la fracción de membrana (Philipp and Schink, 2000), y en su secuencia se predice una hélice transmembrana entre los residuos 170 y 191 que se conserva también en BtdhL de *A. anaerobius*. Adyacente a este gen encontramos *orf9* y *orf10*, cuyos productos presentan homología estructural con proteínas de la familia de las cupinas, de función desconocida. Finalmente, aguas abajo de *orf11* se encuentra *orf12*, cuyo producto presenta una identidad del 93 % con la aminopeptidasa de la familia M24 encontrado en *A. anaerobius*. Todas estas características convierten a *orf11* en un buen candidato a formar parte del complejo HHQ deshidrogenasa, el cual probablemente necesite de proteínas accesorias para su actividad. La función de las cupinas no ha sido aclarada, pero debido a su estructura en forma de copa y a que conservan los residuos que interaccionan con el metal (Dunwell et al., 2004), estas proteínas son candidatas a participar en la maduración de enzimas de la ruta. Las enzimas diana podrían ser *DbhLS*, que requiere la incorporación de molibdeno en algún momento de su maduración, u ORF12, peptidasa

que podría a su vez participar en la maduración de otras enzimas de la ruta, igual que se ha propuesto para *A. anaerobius* (Darley et al., 2007).

Genes que participan en la rotura del anillo aromático: HBQ deshidrogenasa. Los productos de *orf19*, *orf22* y *orf24* presentan una alta homología con la BqdhM, BqdhL y BqdhS de *A. anaerobius*, es decir, con el complejo HBQ deshidrogenasa (BqdhLSM). Un mutante en el gen *bqdhL* resultó ser esencial para la degradación de 3,5-DHB, mientras que un mutante en *bqdhM* no era esencial; crecía más lentamente, acumulando un metabolito coloreado que podría ser algún intermediario de la ruta y que no hemos identificado hasta el momento (Figura 58).

Genes reguladores. Las ORF3 y ORF25 presentan una alta homología con reguladores transcripcionales pertenecientes a la familia de LysR. Ambas proteínas se pueden modelar usando el molde c3fzjC correspondiente a la estructura del regulador TsaR de *Camamonas testosteroni* (Monferrer et al., 2008; Monferrer et al., 2010), proteína con la que presentan una identidad de 29 y 28%, respectivamente. En principio, hemos descartado la participación de ORF3 en la regulación de esta ruta por su situación divergente a los genes *korAB*, que no se inducen por 3,5-DHB. Especial interés tiene la ORF25, con un 33% de identidad con un regulador transcripcional perteneciente a la familia LysR de *R. eutropha* JMP134, y que podría ser el regulador implicado en la degradación de 3,5-DHB: hemos observado que se induce por la presencia de este sustrato (Figura 67) y que se transcribe formando parte de un operón independiente (F, figura 60). Además, se han identificado en los principales promotores para la degradación de 3,5-DHB los elementos típicos de promotores regulados por LysR, como veremos más adelante.

Además de los genes responsables de los pasos esenciales de la ruta, también hemos encontrado genes presentes en las dos rutas que comparten una alta homología entre sí. Aunque en principio no tienen asignada una función clara en la degradación de resorcinol y 3,5-DHB, son unos firmes candidatos a participar en etapas claves de ambas rutas. Estos genes son *orf20* de *T. aromatica* AR-1, con un 72 % de identidad con una succinato semialdehído deshidrogenasa de *G. lovleyi* SZ, homólogo a *orf12* de *A. anaerobius* que también guarda homología con esta enzima. Ambos podrían estar involucrados en los últimos pasos de la degradación desde HBQ hasta acetato y malato, participando en la conversión de aldehídos en sus correspondientes ácidos carboxílicos. Por otro lado tenemos la *orf21*, con un 46% de identidad con *orf10* de *A. anaerobius*. Estas proteínas podrían participar en la unión del cofactor de molibdeno y ensamblaje de la molibdoproteína RhLS y DbhLS en la membrana, probablemente con la ayuda de una chaperona auxiliar. Además, hemos

determinado mediante mutagénesis que estos genes son esenciales para la degradación de 3,5-DHB en *T. aromatica* AR-1, aunque no lo son para la degradación de resorcinol en *A. anaerobius* (Darley et al., 2007). Finalmente, el producto de *orf23* de *T. aromatica* presenta un 73% de identidad con la ORF5 de *A. anaerobius*, aunque su función es desconocida.

Las *orf13*, *14*, *15* y *16* forman un transportador TRAP (*tripartite ATP-independent periplasmic transporters*) designado como transportador periplásmico de tres componentes independiente de ATP (Kelly and Thomas, 2001). El análisis de secuencias de genomas completos revelan que el sistema TRAP está muy extendido en bacterias y arqueas (Kelly and Thomas, 2001), aunque los sustratos específicos y su función fisiológica sólo han sido identificados en unos pocos organismos. Tal vez el ejemplo mejor estudiado de este tipo de transportadores sea el sistema DctPQM de *Rhodobacter capsulatus*, que se ha caracterizado a nivel molecular y bioquímico (Forward et al., 1997). En nuestro caso encontramos que las ORF13, ORF14 y ORF15 son homólogas a DctP, DctQ y DctM, respectivamente, los tres componentes que integran este tipo de transportadores; además, la ORF16 también presenta homología con un receptor extracitoplasmático (DctP). Pese a que las ORF13 y ORF16 no presentan homología a nivel de secuencia, ambas se pueden modelar usando el mismo molde (*c2pfyA*), correspondiente a la proteína DctP7 de unión a ácido pirolutámico de *Bordetella pertussis* (Rucktooa et al., 2006; Rucktooa et al., 2007), que se corresponde con un receptor extracitoplasmático de solutos perteneciente a la superfamilia ESR involucrada en el transporte de sustratos desde el periplasma al citosol. Además, tenemos que tener en cuenta que en el *cluster* de genes de *T. aromatica* AR-1, aguas abajo de *orf3* se ha encontrado una secuencia con homología a *dctP*, pero que no ha sido anotada por no contener codón de stop, por lo que no podemos descartar un error en la secuenciación. En este caso, la secuencia de proteína correspondiente a la posible DctP también se puede modelar utilizando el mismo molde que para las dos anteriores (*c2pfyA*). En los tres casos se detecta en la secuencia un péptido señal, necesario para su translocación a través de la membrana. Por tanto, estaríamos frente a un ejemplo de sistema TRAP con múltiples ESRs asociadas (Figura 73), como el que se ha descrito en *Mannheimia succinoproducens*, que presenta los genes *dctQM* fusionados con dos genes ESR situados aguas abajo. En *Desulfobacterium hafniense* Y51 se han encontrado dos genes ESR aguas arriba de *dctQM*. Análisis filogenéticos sugieren que ambos unen ácidos C₄-dicarboxílicos, sin embargo uno parece corresponder a una clásica proteína DctP de sistema TRAP, mientras que el otro codifica un ortólogo a YbdE de *B. subtilis*, que es un sensor de

ácidos C₄-dicarboxílicos e interacciona con un sistema de dos componentes (Asai et al., 2000). En *Polaromonas* sp. JS666 hay dos ejemplos con múltiples ESRs: en un caso estarían a ambos lados de los genes *dctQM* y en otro nos encontramos con tres genes ESR aguas abajo de los genes *dctQ* y *dctM*. En este último ejemplo, los tres ESRs presentan una alta identidad de secuencia, lo que sugiere que se han producido por duplicaciones génicas de un antecesor con una sola copia. Además, están separados de *dctQM* por una pequeña secuencia de función desconocida (Mulligan et al., 2007).

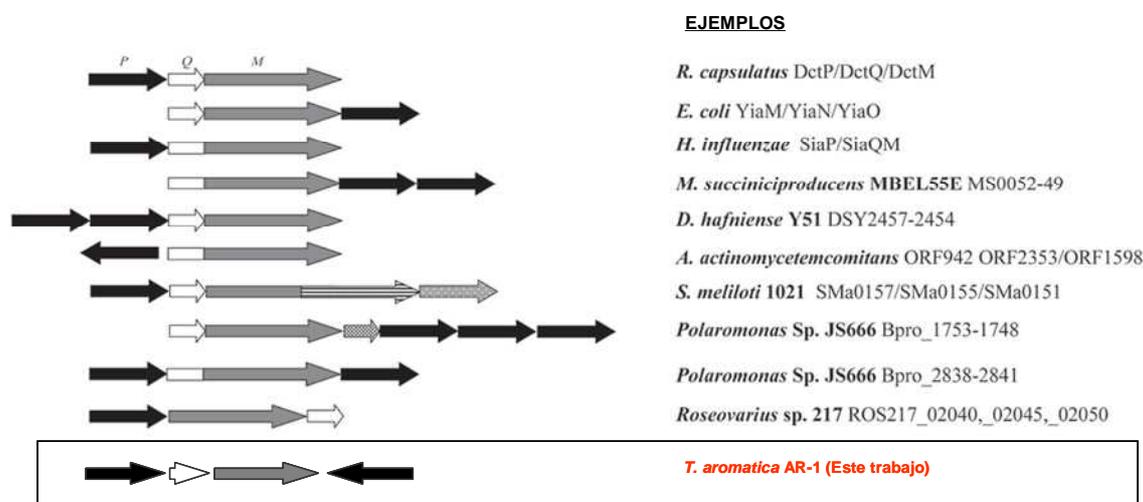


Figura 73. Ejemplos de organización genética de transportadores TRAP. La disposición de los genes TRAP está centrada en *dctP* (P, flechas negras), *dctQ* (Q, flechas blancas) y *dctM* (M, flechas grises) del operón *dctPQM* de *R. capsulatus* tomado de (Mulligan et al., 2007). El último ejemplo se corresponde con la disposición de los genes TRAP encontrados en *T. aromatica* AR-1.

Aunque numerosas evidencias ponen de manifiesto que los sistemas TRAP pueden transportar una gran variedad de sustratos con diferentes estructuras, en la mayoría de los casos los sustratos contienen al menos un grupo carboxilo (Quintero et al., 2001; Thomas et al., 2006). El sistema TRAP que hemos encontrado en *T. aromatica* AR-1, aunque presenta expresión basal, se induce en presencia de 3,5-DHB, lo que sugiere su implicación en el transporte de los sustratos de esta ruta de degradación. Sin embargo un mutante *dctP* en *T. aromatica* AR-1 no es esencial para la degradación de 3,5-DHB. Esto podría ser debido a que estas proteínas, que pueden llegar a ser de las más abundantes de la célula, pueden ser sustituida por otros DctP

(Kelly and Thomas, 2001). O tal vez sólo resulten esenciales en condiciones de baja concentración de sustrato, una situación probable en entornos naturales.

En la figura 74 se resume en un esquema la función de los principales genes y proteínas que participan en los primeros pasos de la degradación de 3,5-DHB en *T. aromatica* AR-1.

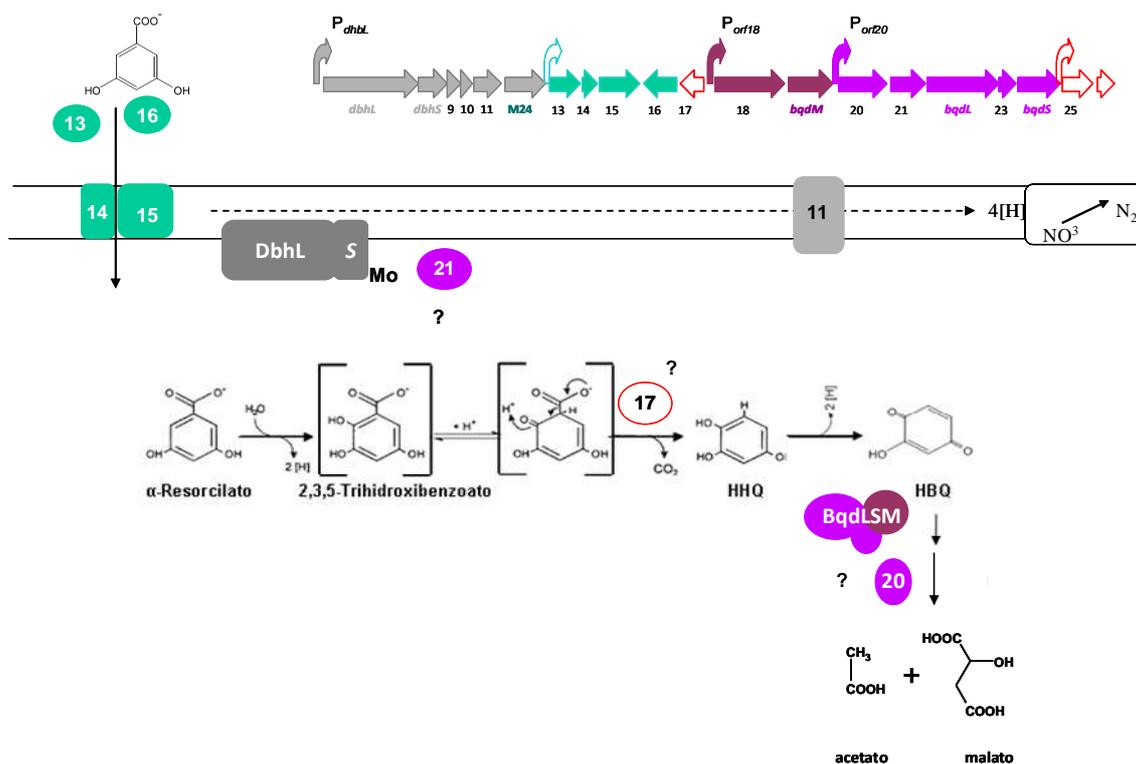


Figura 74. Principales pasos enzimáticos implicados en la ruta de degradación de 3,5-DHB. El complejo 3,5-DHB hidroxilasa (DbhLS, gris oscuro) e HHQ deshidrogenasa (ORF11, gris claro) se encuentran asociados a la membrana. Las ORF13, 14, 15 y 16 (verde) en la membrana representa el transportador TRAP a través del cual el 3,5-DHB entraría en la célula y la ORF21 (morado) intervendría en la unión de molibdeno y ensamblaje de las proteínas a la membrana. La ORF17 (sin rellenar) participaría en la descarboxilación del 2,3,5-THB. El complejo HBQ deshidrogenasa (BqdLSM, morado y ciruela) interviene en la rotura de la HBQ y ORF20 (morado) podría participar en algún paso posterior hasta dar acetato y malato. Arriba se representan los genes implicados en la degradación de 3,5-DHB, cuyos colores se corresponden con los de las proteínas abajo identificadas.

Los genes para la degradación de 3,5-DHB en *T. aromatica* AR-1 están agrupados en operones que se inducen por la presencia del sustrato. Además se ha detectado expresión basal de los operones B, C, D y E (Figura 60). El primer y segundo paso de la ruta, la 3,5-DHB hidroxilasa y la HHQ deshidrogenasa, se agrupan formando el operón B (*dbhL-orf12*). El tercer paso de la ruta, la HBQ deshidrogenasa, se encuentra dividido en dos operones: el operón D (*orf18-bqdM*) y el operón E (*orf20-*

bqds). Entre ambos se encuentra el operón C (*orf13-orf15*) que codifica para un transportador de tipo TRAP. Y finalmente, formando parte de otra unidad transcripcional (operón F), está la *orf25* con homología a un regulador de la familia LysR que también se induce por el sustrato.

Al tratarse ORF25 de un regulador perteneciente a la familia LysR nos propusimos encontrar en la secuencia de los promotores los elementos necesarios para la regulación transcripcional mediada por LTTR (regulador transcripcional de tipo LysR). Mediante experimentos de extensión a partir de cebador (*primer extensión*) se determinó el punto de inicio de la transcripción de los principales promotores implicados en la degradación de 3,5-DHB: el promotor del operón B (P_{dbhL}), el del operón D (P_{orf18}) y el del operón E (P_{orf20}). Aguas arriba de este punto se identificaron en las tres secuencias los elementos típicos de promotores regulados por LysR (Figuras 61, 62 y 63).

Los LTTRs en un principio se describieron como activadores de la transcripción de un gen divergente con autorregulación negativa (Lindquist et al., 1989; Schell, 1993; Parsek et al., 1994a). Sin embargo hoy en día sabemos que pueden actuar como activadores o como represores de genes sencillos o de operones; y que aunque a menudo son transcritos divergentemente, no siempre es así. Actualmente se conocen muchas rutas de degradación reguladas por LTTRs. La ORF25 se transcribe en un operón independiente y se induce por la presencia de 3,5-DHB en el medio, por lo que es muy probable que esté respondiendo a otro regulador que se activa por el sustrato, o que como en el caso de ThnR, active su propia síntesis.

Un análisis *in silico* de la región promotora de *dbhL* y *orf20* puso de manifiesto que la estructura y secuencia de los promotores P_{dbhL} y P_{orf20} estaban muy conservadas, lo que sugiere que el mecanismo de regulación de ambos promotores sea similar. En ambos casos se detecta la existencia de posibles sitios de unión de un regulador que cumplen el consenso AT-N₁₁-AT descrito para la unión de LTTRs como sitio de alta afinidad **RBS** (*regulatory binding site*) (Parsek et al., 1994b; Maddocks and Oyston, 2008), y que se encuentran centrados en posición -65 y -53, respectivamente, con respecto al sitio de inicio de la transcripción. Además, se han encontrado secuencias muy conservadas (AGATTGAATCACTTGG), centradas en posición -37, que solapan con la región -35 del promotor, y que podrían actuar como sitio activador **ABS** (*activation binding site*) (Figura 75). La mayoría de los LTTRs son activos en estado oligomérico, siendo el tetrámero la forma activa fundamentalmente (Tropel and van der Meer, 2004), y el modelo vigente de funcionamiento de estos promotores propone un mecanismo de dímero deslizante. Según este modelo, cada uno de los

dímeros del tetrámero interaccionaría con los sitios RBS y ABS, con independencia de la presencia del inductor: primero se une un dímero al sitio RBS y posteriormente otro al sitio ABS. La presencia del inductor produciría cambios conformacionales que provocarían un deslizamiento del regulador sobre el sitio ABS, lo que permitiría la interacción con la ARN polimerasa, activándose la transcripción (Wang et al., 1992; Toledano et al., 1994; Wang and Winans, 1995a, b; McFall et al., 1997; van Keulen et al., 2003; Dubbs et al., 2004). La unión de LTTRs a la región ABS implica una interacción más débil, pero es crítica para la activación de la transcripción dependiente del inductor (Schell, 1993). Un ejemplo de este mecanismo ocurre con el regulador AtzR de *Pseudomonas* sp. ADP que activa el operón *atzDEF* para la utilización del cianuro (Porrúa et al., 2007). En este sistema, un dímero de AtzR se uniría fuertemente a la región RBS y un segundo dímero interaccionaría más débilmente con la región ABS. Esta segunda unión es dependiente de la presencia de inductor. La región ABS es importante para la activación de la transcripción porque la unión de un dímero en esta región permite la interacción del complejo regulador-ADN-proteína dependiente del inductor (Porrúa et al., 2007). Dada la estructura de los promotores P_{dbhL} y P_{orf20} y su semejanza con algunos sistemas descritos, es probable que el mecanismo de activación sea semejante al propuesto de dímero deslizante.

La organización en el promotor de *orf18* es algo diferente a los anteriores. En el promotor P_{orf18} se ha encontrado un posible sitio de unión RBS centrado en la posición -188, muy alejado del punto de inicio de la transcripción, y un posible sitio ABS que solapa con la región -35 y guarda cierta homología con la región encontrada en los promotores P_{dbhL} y P_{orf20} (AGATT_{CGG}T_{AT}C_{GG}GG) (Figura 75).

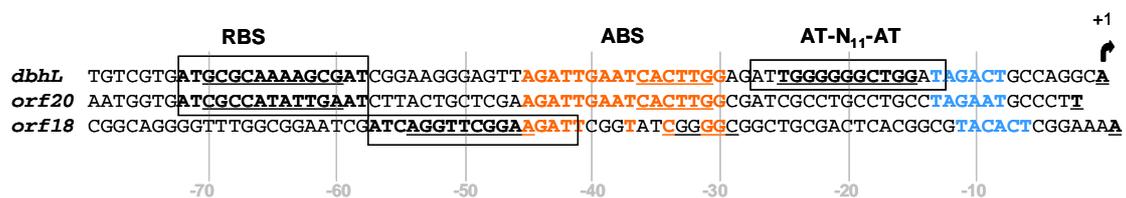


Figura 75. Alineamiento de la región promotora de los genes *dbhL*, *orf18* y *orf20*. Las tres secuencias se han alineado haciendo coincidir la región ABS (naranja). Marcado con un rectángulo se muestra el sitio RBS y otras secuencias que conservan el consenso (AT-N₁₁-AT). Aguas arriba de la secuencia mostrada de *orf18* se ha encontrado un sitio RBS centrado en la posición -188 (no mostrado). La posición +1 se representa subrayada y en negrita. La caja -10 con letras azules y la caja -35, que solapa con el sitio ABS, subrayada. La posición relativa de nucleótidos viene dada a partir de la posición +1 de *dbhL*.

Aunque normalmente los miembros de la familia LysR suelen unirse en una región del ADN centrada en la posición -65 (Schell, 1993), también se han descrito algunos casos en los que esto no es así. En el promotor regulado por GcvA de *E. coli*, que participa en la activación y represión de los genes *gcv* para la degradación de la glicina y que presenta autorregulación negativa, se han detectado hasta tres sitios de unión del regulador, dos de ellos bastante alejados de los típicos sitios de unión de los miembros de la familia LysR: el sitio 1 que ocupa las posiciones de -34 hasta -69, el sitio 2 que se extiende de -242 a -214, y el sitio 3 entre -271 y -243 (Wilson et al., 1995).

Al intentar identificar cual era el inductor de la ruta de degradación del 3,5-DHB nos encontramos con un resultado interesante: mutantes en los genes *dbhLS* presentaron una expresión constitutiva del primer operón de la ruta (Figura 66). De nuevo, nos encontramos con un fenómeno, semejante a lo que ocurría en *A. anaerobius*, que conecta la ruta metabólica con su regulación. DbhLS parece ejercer un efecto represor sobre el regulador LysR cuando la cepa crece con una fuente de carbono que no utiliza la vía del 3,5-DHB. Como ya mencionamos anteriormente, en la degradación de tetralina de *Sphingomonas macrogolita* (Heider et al.) se identificó un activador transcripcional de tipo LysR (ThnR) que se cotranscribía junto a genes para la degradación de tetralina (*thnCA34A*), y no reprimía su propia síntesis (Martinez-Perez et al., 2004); de hecho, parecía activar su propia expresión a través de un circuito positivo de respuesta a tetralina (López-Sánchez et al., 2009; Lopez-Sanchez et al., 2010). En este sistema, la regulación a través de ThnR está conectada con el metabolismo de la tetralina, de manera que cuando no se puede producir la degradación de ésta porque la enzima principal, la dioxigenasa, se encuentra oxidada, se reprimen la expresión de los genes *thn* para su degradación (Martinez-Perez et al., 2007).

3 Evidencias de represión catabólica en la degradación de resorcinol y 3,5-DHB

Los fenómenos de represión catabólica de rutas de degradación de compuestos aromáticos son habituales en microorganismos aerobios, y también se han detectado en bacterias que crecen en condiciones anaeróbicas, como en *T. aromatica* (Heider et al., 1998) o *Azoarcus* sp. CIB. En estos casos se ha visto cómo ciertos ácidos orgánicos como succinato, malato y acetato, pueden ser utilizados como fuente de carbono, ejerciendo una represión catabólica sobre la ruta de degradación anaerobia del benzoato (López Barragan et al., 2004b). En este caso, además, los mecanismos moleculares por los que se lleva a cabo esta represión están muy bien

estudiados (Durante-Rodriguez et al., 2008). La actividad del promotor P_N , que controla la expresión de los genes *bzd* para la degradación del benzoato, en la cepa silvestre *Azoarcus* sp CIB fue muy superior en células crecidas con benzoato como única fuente de carbono que en presencia de benzoato y succinato. También se ha observado fenómenos de represión catabólica, por fuentes de carbono tales como casaminoácidos, piruvato y ciclohexanocarboxilato, en la expresión de los genes *mbd* responsables del catabolismo anaeróbico de 3-metilbenzoato y m-xileno en esta misma cepa (Fernández-Juárez, 2011).

En *A. anaerobius*, mediante ensayos de PCR a tiempo real observamos cómo la expresión de los genes *rhL*, *bqdhL* y *orf14* disminuía cuando la células crecían en presencia de succinato como fuente adicional de carbono (Tabla 8). En el caso de *rhL*, la expresión disminuía un 93%, en *bqdhL* un 90% y *orf14* lo hacía un 71%. Esto es indicativo de un fenómeno de represión catabólica sobre la expresión de los tres operones de la ruta. Aunque hasta el momento no se conocen los mecanismos moleculares subyacentes, hay que resaltar que hemos podido amplificar a partir del cromosoma de la cepa un gen con homología con el gen *crp* de enterobacterias, que codifica la proteína receptora de AMP cíclico y es responsable de los fenómenos de represión catabólica en esta familia (no mostrado).

T. aromatica AR-1 presentaba crecimiento diaúxico cuando crecía con 3,5-DHB y benzoato como fuentes de carbono. El benzoato se consumía como sustrato preferente y el 3,5-DHB sólo se degradaba después de una larga fase de latencia (Philipp and Schink, 2000). En este trabajo, hemos observado que *T. aromatica* AR-1 creciendo con 3,5-DHB y succinato como fuente adicional de carbono también presentaba un crecimiento diaúxico que se correspondía con los niveles de expresión de la primera enzima de la ruta (3,5-DHB hidroxilasa): esta cepa utilizaba el succinato como fuente preferente, y sólo cuando éste se agotaba se producía la utilización del 3,5-DHB después de una etapa de latencia. La actividad 3,5-DHB hidroxilasa era prácticamente nula en la primera etapa de crecimiento, mientras se consumía el succinato, y fue máxima al final de la etapa de latencia, indicando el final de la fase de represión catabólica y la puesta en marcha de la inducción y síntesis de las enzimas que participan en la degradación del 3,5-DHB. Esta actividad se mantenía elevada en la segunda fase de crecimiento donde se producía la degradación del 3,5-DHB (Figura 56). Este fenómeno fue idéntico al observado en esta misma cepa cuando crecía con benzoato y 3,5-DHB, donde la actividad enzimática de la primera enzima de la ruta también se correspondía con las distintas etapas de crecimiento, siendo máxima en la fase de crecimiento correspondiente a la degradación de 3,5-DHB (Philipp and Schink,

2000). Además, observamos una utilización preferente del aceptor de electrones: existía una relación directa entre la desaparición de nitrato y la aparición de nitrito (Figura 68). Aunque la cepa es capaz de llevar a cabo una desnitrificación completa, el nitrato es el aceptor de electrones preferente, y el nitrito formado no es utilizado como aceptor de electrones mientras hay nitrato en el medio. Esto parece indicar una regulación estricta de los genes para la respiración de nitrato, que será objeto de estudio en el futuro.

4 Diferencias y semejanzas en la degradación de resorcinol y 3,5-DHB en bacterias nitratorreductoras

Resorcinol y 3,5-DHB son dos compuestos aromáticos dihidroxilados que se diferencian en su estructura por la presencia adicional en el 3,5-DHB de un grupo carboxilo en el anillo. En ambos casos el primer paso en la ruta de degradación en *A. anaerobius* y *T. aromatica* AR-1 es una oxidación del anillo donde el oxígeno procede del agua, dando lugar a un compuesto trihidroxilado. El producto directo de la reacción en *A. anaerobius* es la HHQ, mientras que en *T. aromatica* AR1 es el 2,3,5-trihidroxibenzoato (2,3,5-THB) (Figura 76) (Gallus and Schink, 1998; Philipp and Schink, 1998). Los complejos resorcinol hidroxilasa (RhLS) y 3,5-DHB hidroxilasa (DbhLS) están relacionados filogenéticamente con el complejo pirogallool-floroglucinol transhidroxilasa (AthLS) de *Pelobacter acidigacilli*, que consiste en una enzima citoplasmática constituida por una subunidad larga de 875 aminoácidos (AthL) y una subunidad pequeña de 274 aminoácidos (AthS) (Messerschmidt et al., 2004). Los tres complejos están formados por sendas subunidades, una subunidad grande (α) y una subunidad pequeña (β), siendo la subunidad grande la que une molibdeno como cofactor. En los tres casos se conserva la serina A175 de coordinación del molibdeno, la His A144 que interviene en la unión de Mo y la Tir A560 que forma parte del centro activo e interaccionaría con el sustrato (Messerschmidt et al., 2004) (Figura 41). RhLS y DbhLS son complejos enzimáticos asociados a membrana (Gallus and Schink, 1998; Philipp and Schink, 1998), a diferencia de AthLS que se ha descrito como una enzima citoplásmica; sin embargo, el dominio amino terminal de la subunidad β presenta homología estructural con fibronectinas, lo que sugiere que esta subunidad sea una reliquia sin actividad catalítica en la reacción de transhidroxilación, pero que usa este dominio fibronectina para asociarse a la membrana (Messerschmidt et al., 2004). En la reacción llevada a cabo por *P. acidigacilli* ocurre una transhidroxilación en la que el grupo hidroxilo es transferido desde una molécula donadora (tetrahidroxibenceno) a

una molécula aceptora (pirogallol) (Brune and Schink, 1990; Reichenbecher and Schink, 1999). Sin embargo, en la reacción que se lleva a cabo tanto en *T. aromatica* AR-1 como en *A. anaerobius*, ocurre una hidroxilación del anillo en la que la molécula donadora es el agua (Gallus and Schink, 1998; Philipp and Schink, 1998).

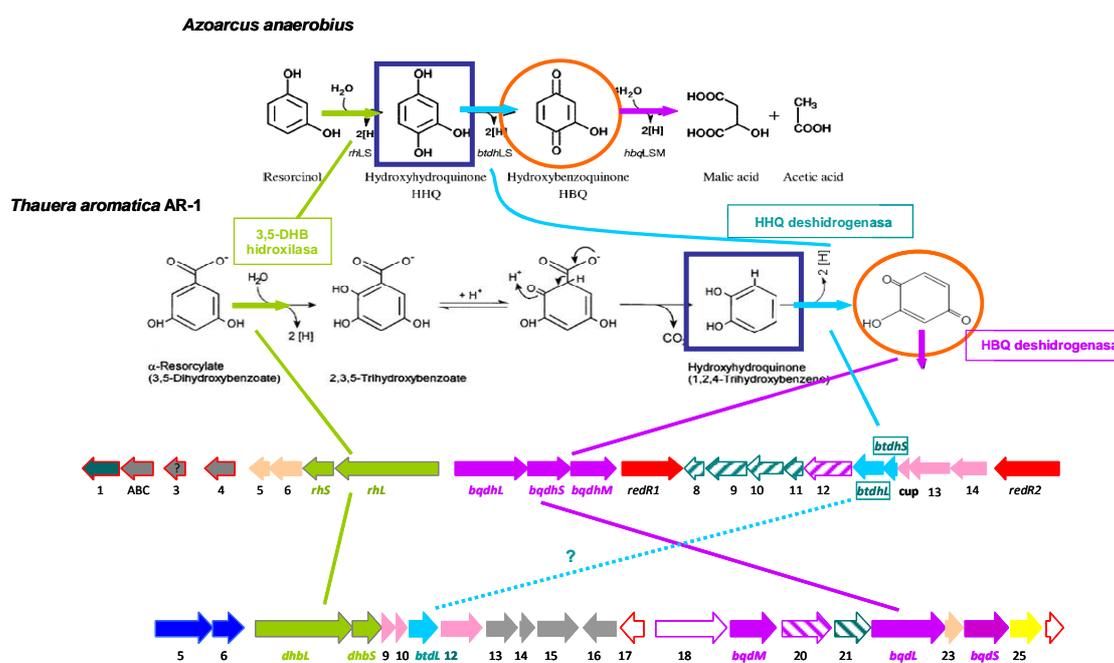


Figura 76. Comparación entre las rutas de degradación de resorcinol y 3,5-DHB. En verde se representa el primer paso de la ruta catalizado por la resorcinol hidroxilasa en *A. anaerobius* y 3,5-DHB hidroxilasa en *T. aromatica* AR-1, el segundo paso catalizado por la HHQ deshidrogenasa se representa en azul claro y el complejo HBQ deshidrogenasa en morado. Otros genes que guardan homología en las dos rutas están representados en el mismo color.

Tanto RhL como DbhL presentan en el extremo amino terminal dos argininas (Figura 41) que actúan como una señal que podría ser reconocida por un sistema similar al sistema Tat (*twin-arginine translocation*) de traslocación de proteínas a la membrana (Chan et al., 2010). Este sistema reconoce el motivo RR y requiere de la acción de chaperonas en la maduración y traslocación de las enzimas a la membrana. Como hemos visto anteriormente, proponemos que ORF10 de *A. anaerobius* y ORF21 de *T. aromatica* AR-1 podrían actuar como chaperonas en la maduración y ensamblaje de RhLS y DbhLS a la membrana, y que posiblemente necesiten de la acción de proteínas accesorias como podrían ser ORF12 en *T. aromatica* AR-1 y ORF13 en *A. anaerobius*, dos peptidasas de la familia M24 esenciales en la maduración de enzimas.

igualmente encontramos en ambas cepas proteínas con estructura de cupina, que por capacidad de unir metales, podrían intervenir en la biosíntesis del cofactor de molibdeno, o en la unión de metal a la peptidasa M24.

En un análisis filogenético se observa que la subunidad DbhL de *T. aromatica* AR-1, RhL de *A. anaerobius* y AthL de *P. acidigallici* están también relacionadas con otras oxidoreductasas de *Burkholderia* sp. y *Clostridium* sp. que utilizan molibdeno como ligando (Figura 77A). Formando otro grupo están otras oxidoreductasas pertenecientes al los géneros *Desulfobacterium* sp. y *Gordonibacter* sp. RhLS y DbhLS pertenecen a la familia III de las molibdoenzimas: familia DMSO reductasa (dimetil sulfoxido reductasa) (Magalon et al., 2011) dentro del grupo de las que contienen Mo-bisPGD (Molibdo-bis piranopterina guanina dinucleotido) y cluster [Fe-S]. En el árbol se puede observar un tercer grupo de proteínas que estaría formado por otras proteínas de la familia DMSO reductasas, como la trimetilamino N-oxido reductasas y la biotín sulfóxido reductasas, que son enzimas solubles que coordinan Mo-bisPGD como único cofactor, y que pueden estar localizadas en el citoplasma o en el periplasma.

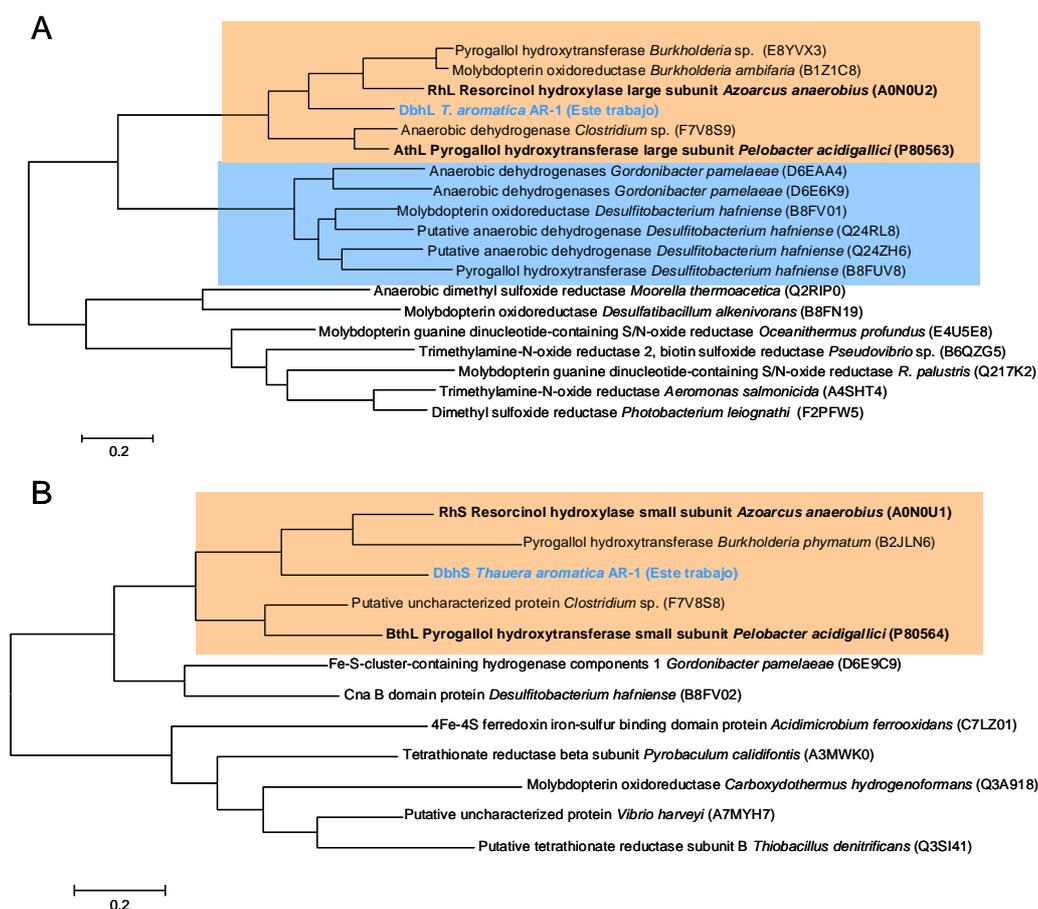


Figura 77. Árbol filogenético construido a partir de las secuencias de proteínas más relacionadas con DbhL (A) y DbhS (B) obtenidas tras un análisis con BLAST usando la base de datos de UniProtKB. El árbol filogenético se construyó empleando el programa MEGA 5.05 (Tamura et al., 2011).

Por otra parte la subunidad pequeña DbhS de *T. aromatica* AR-1 está relacionada filogenéticamente con RhS de *A. anaerobius* y con la subunidad pequeña AthS de *P. acidigacilli*, que a su vez están relacionadas con una pirogalol hidrotransferasa de *Burkholderia* sp., y con una proteína hipotética de *Clostridium* sp. SY8519, como ocurría con DbhL (Figura 77B). Muy estrechamente relacionadas están otras proteínas pertenecientes a bacterias de los géneros *Desulfobacterium* sp. y *Gordonibacter* sp.

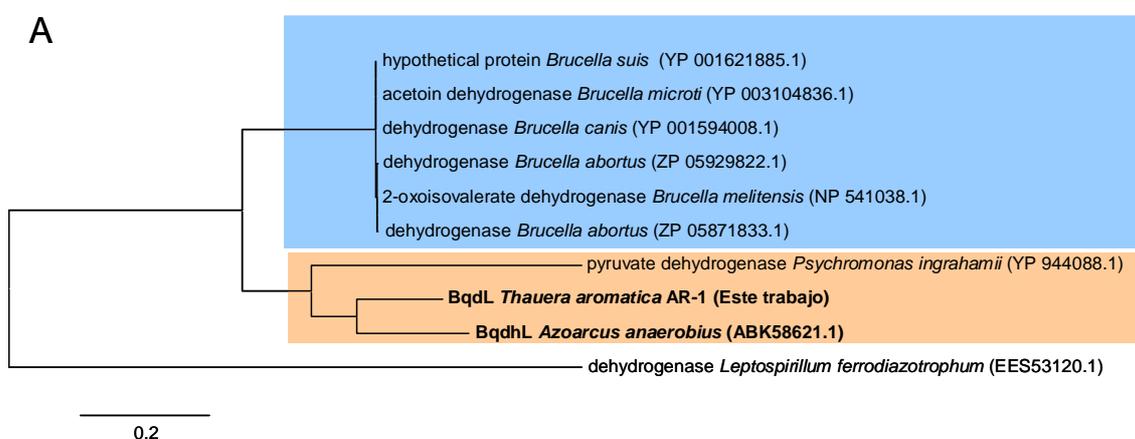
A partir de la HHQ, los pasos propuestos para ambas rutas son comunes (Gallus and Schink, 1998) y por tanto las enzimas involucradas deberían ser homólogas. En estudios de transferencia del cósmido R⁺ a distintos hospedadores, la cepa de *T. aromatica* K172 portadora del cósmido R⁺ mutante en *btdhL* (Mut_76) no era capaz de crecer en resorcinol como única fuente de carbono; sin embargo, la cepa *T. aromatica* AR-1 sí era capaz de crecer en las mismas condiciones (Darley et al., 2007). Esto sugería que el cromosoma de *T. aromatica* AR1 estaba suplementando la función mutada, y permitía predecir que los genes para la degradación de HHQ en *A. anaerobius* y *T. aromatica* AR-1 debían ser homólogos. La misma cepa, *T. aromatica* AR-1 portadora del cósmido R⁺ mutante en *btdhS* (Mut_13) no era capaz de crecer en resorcinol, pero acumulaba un producto coloreado que podría ser indicativo de acumulación de pequeñas trazas de HHQ o HBQ (Darley et al., 2007). Según todos estos indicios, esperaríamos que la actividad HHQ deshidrogenasa fuera común en los dos organismos, y por tanto estuviera codificada por genes muy homólogos. Sorprendentemente, es en este paso donde encontramos mayores diferencias, ya que la similitud entre BtdhL de *A. anaerobius* y ORF11 de *T. aromatica* fue del 51%, muy por debajo que la presentada entre otras proteínas homólogas entre ambas cepas. Por otra parte, no hemos encontrado en *T. aromatica* AR1 ningún gen homólogo a *btdhS*. En *T. aromatica* AR-1, en el entorno génico de *orf11* encontramos dos genes para cupinas y una peptidasa de la familia M24B, organización semejante a la encontrada en el entorno génico de *btdhL* en *A. anaerobius*. Actualmente no podemos decir si estos genes son esenciales para la degradación de 3,5-DHB.

Darley y colaboradores (2007) llegaron a la conclusión de que el complejo HBQ deshidrogenasa de *A. anaerobius* no debía tener homólogo en *T. aromatica* AR-1, ya que habían visto que al transferir cósmidos mutantes en las subunidades *bqdhL* y *bqdhS* a las cepas K172 y AR-1, no fueron capaces de crecer en resorcinol como única fuente de carbono, ni de degradarlo en cultivos en los que se había adicionado 3,5-DHB (Darley et al., 2007). Sin embargo, en el *cluster* de genes para la degradación de 3,5-DHB de *T. aromatica* AR-1 hemos podido identificar genes homólogos a

bqdhLSM, aunque no se encuentran agrupados en una misma unidad transcripcional. El gen *bqdm* se encuentra formando parte del operón D, que se induce por 3,5-DHB, y su función no es esencial, ya que un mutante *bqdm* es capaz de crecer con resorcinol como fuente de carbono y da lugar a la acumulación de un producto coloreado, posiblemente como consecuencia de un metabolismo defectivo. Por otro lado, se han identificado genes homólogos a *bqdhL* y *bqdhS* formando parte del operón E, que se induce por el sustrato 3,5-DHB y dónde se encuentran otros genes como la *orf20*, *orf21* y *orf23*, de función desconocida y que también tienen sus homólogos en *A. anaerobius*.

Como observamos en la figura 78, las tres enzimas que forman el complejo HBQ deshidrogenasa de *T. aromatica* AR-1 y *A. anaerobius* están muy relacionadas filogenéticamente.

BqdL de *T. aromatica* AR-1 está estrechamente relacionada con la enzima de *A. anaerobius*, y además guarda una gran relación filogenética con otras deshidrogenasas, sobre todo pertenecientes al género *Brucella* sp. (Figura 78A). Lo mismo ocurre con la subunidad BqdS, que es muy homóloga en ambos organismos, y está a su vez relacionada filogenéticamente con otras deshidrogenasas pertenecientes al género *Magnetospirillum* sp. También guarda relación con otras deshidrogenasas, pertenecientes sobre todo al género *Brucella* sp. (Figura 78B). La subunidad BqdM de ambas cepas forman un grupo con otras dihidrolipoamida deshidrogenasas pertenecientes al género *Magnetospirillum* sp., *Rhodospirillum* sp. *Gluconacetobacter* sp. y *Azospirillum* sp. (Figura 78C).



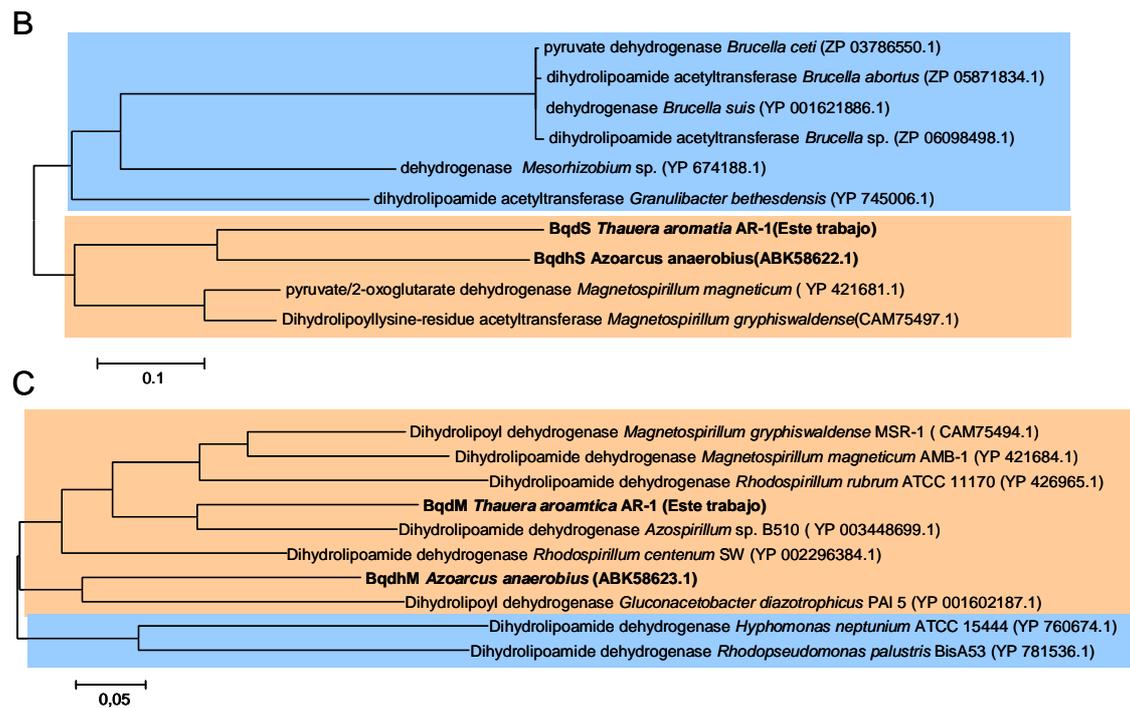


Figura78. Árbol filogenético construido a partir de las secuencias de proteínas más relacionadas con BqDL (A), BqDS (B) y BqDM (C) obtenidas haciendo un BLASTP con secuencias de proteínas depositadas en GenBank empleando la base de datos no redundante (nr). El árbol filogenético fue construido empleando el programa MEGA 5.05

CONCLUSIONES

El trabajo realizado en esta tesis y descrito en la memoria ha dado lugar a las conclusiones siguientes:

1. Los genes para la degradación de resorcinol de *A. anaerobius*, inducibles por sustrato, están organizados en 4 operones, cuya expresión se controla a través del regulador transcripcional RedR2, perteneciente a la familia NtrC. En presencia de resorcinol, RedR2 activa la transcripción de los tres promotores que controlan la expresión de los genes para los tres primeros pasos de la ruta, y que se transcriben con la ARN polimerasa asociada con el factor sigma-54.

2. Los tres promotores controlados por RedR2, P_{rhI} , P_{bqdhL} y P_{orf14} , presentan una organización estructural muy conservada, con alta homología en sus secuencias de unión de σ^{54} , de factor IHF y de la proteína reguladora. Esto sugiere mecanismos paralelos de regulación en los tres casos.

3. El resorcinol, inductor de la ruta, tiene que ser metabolizado hasta HHQ para que este compuesto pueda activar al regulador RedR2. Esta reacción, que depende del complejo resorcinol hidroxilasa (RhLS), está garantizada en cualquier circunstancia por la expresión constitutiva de los genes *rhLS* desde un segundo promotor constitutivo.

4. Existe un nivel adicional de regulación que implica al producto de *btdhS* de *A. anaerobius*, cuya presencia reprime de forma directa o indirecta la actividad de los tres promotores que controlan la expresión de los genes de la ruta en ausencia de efector. Dada la localización celular de BtdhS, anclada en la membrana, y su homología con proteínas con actividad oxido-reductasa, es probable que su efecto dependa del transporte de electrones en la membrana.

5. El paralelismo entre las rutas de degradación de resorcinol en *A. anaerobius* y 3,5-DHB en *T. aromatica* se ve reflejada en la presencia de genes homólogos para las principales enzimas de la ruta en ambos organismos, presentando una identidad media del 61,5%. Sin embargo, la organización genética de las respectivas regiones cromosómicas no está conservada en los dos organismos.

6. Los genes para la degradación 3,5-DHB en *T. aromatica* se organizan en varios operones y su transcripción es dependiente de la presencia de sustrato. La estructura de la región promotora de los tres operones principales de la ruta está muy conservada, y se ha detectado la presencia de posibles sitios de unión para reguladores de la familia LysR. Esto sugiere que el producto de *orf25*, con homología con Reguladores Transcripcionales de Tipo LysR, sea el regulador de los genes para la degradación de 3,5-DHB en *T. aromatica* AR-1.

BIBLIOGRAFÍA

- Abril, M.A., Michan, C., Timmis, K.N., and Ramos, J.L. (1989) Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway. *J. Bacteriol.* 171: 6782-6790.
- Achong, G.R., Rodriguez, A.M., and Spormann, A.M. (2001) Benzylsuccinate Synthase of *Azoarcus* sp. Strain T: Cloning, Sequencing, Transcriptional Organization, and Its Role in Anaerobic Toluene and m-Xylene Mineralization. *Journal of Bacteriology* 183: 6763-6770.
- Adler, E. (1977) Lignin chemistry—past, present and future. *Wood Science and Technology* 11: 169-218.
- Agarwal, G., Rajavel, M., Gopal, B., and Srinivasan, N. (2009) Structure-based phylogeny as a diagnostic for functional characterization of proteins with a cupin fold. *PLoS One* 4: e5736.
- Ahn, Y.-B., Chae, J.-C., Zylstra, G.J., and Haggblom, M.M. (2009) Degradation of Phenol via Phenylphosphate and Carboxylation to 4-Hydroxybenzoate by a Newly Isolated Strain of the Sulfate-Reducing Bacterium *Desulfobacterium anilini*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 4248-4253.
- Alex, L., and Simon, M. (1994) Protein histidine kinases and signal transduction in prokaryotes and eukaryotes. *Trends Genet* 10: 133-138.
- Alhapel, A., Darley, D.J., Wagener, N., Eckel, E., Elsner, N., and Pierik, A.J. (2006) Molecular and functional analysis of nicotinate catabolism in *Eubacterium barkeri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 12341-12346.
- Amegbey, G.Y., Monzavi, H., Habibi-Nazhad, B., Bhattacharyya, S., and Wishart, D.S. (2003) Structural and Functional Characterization of a Thioredoxin-Like Protein (Mt0807) from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Biochemistry* 42: 8001-8010.
- Aranda-Olmedo, I., Ramos, J.L., and Marques, S. (2005) Integration of Signals through Crc and PtsN in Catabolite Repression of *Pseudomonas putida* TOL Plasmid pWW0. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4191-4198.
- Arfin, S.M., Long, A.D., Ito, E.T., Toller, L., Riehle, M.M., Paegle, E.S., and Hatfield, G.W. (2000) Global Gene Expression Profiling in *Escherichia coli* K12. *Journal of Biological Chemistry* 275: 29672-29684.
- Armstrong, R.N. (2000) Mechanistic Diversity in a Metalloenzyme Superfamily. *Biochemistry* 39: 13625-13632.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., and Schwede, T. (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22: 195-201.
- Asai, K., Baik, S.-H., Kasahara, Y., Moriya, S., and Ogasawara, N. (2000) Regulation of the transport system for C4-dicarboxylic acids in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 146: 263-271.
- Baas, D., and Rétey, J. (1999) Cloning, sequencing and heterologous expression of pyrogallol-phloroglucinol transhydroxylase from *Pelobacter acidigallici*. *European Journal of Biochemistry* 265: 896-901.
- Barragan, M.J.L., Carmona, M., Zamarro, M.T., Thiele, B., Boll, M., Fuchs, G. et al. (2004) The bzd Gene Cluster, Coding for Anaerobic Benzoate Catabolism, in *Azoarcus* sp. Strain CIB. *J. Bacteriol.* 186: 5762-5774.
- Barragán, M.J.L., Blázquez, B., Zamarro, M.T., Mancheño, J.M., García, J.L., Díaz, E., and Carmona, M. (2005) BzdR, a Repressor That Controls the Anaerobic Catabolism

- of Benzoate in *Azoarcus* sp. CIB, Is the First Member of a New Subfamily of Transcriptional Regulators. *Journal of Biological Chemistry* 280: 10683-10694.
- Barrios, H., Valderrama, B., and Morett, E. (1999) Compilation and analysis of sigma(54)-dependent promoter sequences. *Nucleic Acids Res* 27: 4305-4313.
- Bates, P.A., Kelley, L.A., MacCallum, R.M., and Sternberg, M.J.E. (2001) Enhancement of protein modeling by human intervention in applying the automatic programs 3D-JIGSAW and 3D-PSSM. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 45: 39-46.
- Bazan, J.F., Weaver, L.H., Roderick, S.L., Huber, R., and Matthews, B.W. (1994) Sequence and structure comparison suggest that methionine aminopeptidase, prolidase, aminopeptidase P, and creatinase share a common fold. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 2473-2477.
- Bennett-Lovsey, R.M., Herbert, A.D., Sternberg, M.J.E., and Kelley, L.A. (2008) Exploring the extremes of sequence/structure space with ensemble fold recognition in the program Phyre. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 70: 611-625.
- Bernstein, H.D., Poritz, M.A., Strub, K., Hoben, P.J., Brenner, S., and Walter, P. (1989) Model for signal sequence recognition from amino-acid sequence of 54K subunit of signal recognition particle. *Nature* 340: 482-486.
- Bertero, M.G., Rothery, R.A., Palak, M., Hou, C., Lim, D., Blasco, F. et al. (2003) Insights into the respiratory electron transfer pathway from the structure of nitrate reductase A. *Nat Struct Mol Biol* 10: 681-687.
- Blázquez, B., Carmona, M., García, J.L., and Díaz, E. (2008) Identification and analysis of a glutaryl-CoA dehydrogenase-encoding gene and its cognate transcriptional regulator from *Azoarcus* sp. CIB. *Environmental Microbiology* 10: 474-482.
- Boll, M. (2005a) Dearomatizing benzene ring reductases. *J Mol Microbiol Biotechnol* 10: 132 - 142.
- Boll, M. (2005b) Key enzymes in the anaerobic aromatic metabolism catalysing Birch-like reductions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1707: 34-50.
- Boll, M., and Fuchs, G. (1998) Identification and characterization of the natural electron donor ferredoxin and of FAD as a possible prosthetic group of benzoyl-CoA reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. *Eur J Biochem* 251: 946 - 954.
- Bordes, P., Wigneshweraraj, S.R., Schumacher, J., Zhang, X., Chaney, M., and Buck, M. (2003) The ATP hydrolyzing transcription activator phage shock protein F of *Escherichia coli*: identifying a surface that binds sigma 54. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 2278-2283.
- Boyd, D.R., and Bugg, T.D.H. (2006) Arene cis-dihydrodiol formation: from biology to application. *Organic & Biomolecular Chemistry* 4: 181-192.
- Boyd, D.R., Sharma, N.D., Bowers, N.I., Dalton, H., Garrett, M.D., Harrison, J.S., and Sheldrake, G.N. (2006) Dioxygenase-catalysed oxidation of disubstituted benzene substrates: benzylic monohydroxylation versus aryl cis-dihydroxylation and the meta effect. *Organic & Biomolecular Chemistry* 4: 3343-3349.
- Boyer, H.W., and Roulland-dussoix, D. (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 41: 459-472.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

- Breese, K., and Fuchs, G. (1998) 4-Hydroxybenzoyl-CoA reductase (dehydroxylating) from the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*--prosthetic groups, electron donor, and genes of a member of the molybdenum-flavin-iron-sulfur proteins. *Eur J Biochem* 251: 916 - 923.
- Breese, K., Boll, M., Alt-Mörbe, J., Schägger, H., and Fuchs, G. (1998) Genes coding for the benzoyl-CoA pathway of anaerobic aromatic metabolism in the bacterium *Thauera aromatica*. *European Journal of Biochemistry* 256: 148-154.
- Breinig, S., Schiltz, E., and Fuchs, G. (2000) Genes involved in anaerobic metabolism of phenol in the bacterium *Thauera aromatica*. *J Bacteriol* 182: 5849 - 5863.
- Brune, A., and Schink, B. (1990) Pyrogallol-to-phloroglucinol conversion and other hydroxyl-transfer reactions catalyzed by cell extracts of *Pelobacter acidigallici*. *J. Bacteriol.* 172: 1070-1076.
- Brune, A., and Schink, B. (1992) Phloroglucinol pathway in the strictly anaerobic *Pelobacter acidigallici*: fermentation of trihydroxybenzenes to acetate via triacetic acid. *Archives of Microbiology* 157: 417-424.
- Bugg, T. (1997) An introduction to enzyme and coenzyme chemistry. 1st edn. *Blackwell Science, Oxford*.
- Burn, J.E., Hamilton, W.D., Wootton, J.C., and Johnston, A.W.B. (1989) Single and multiple mutations affecting properties of the regulatory gene *nodD* of *Rhizobium*. *Molecular Microbiology* 3: 1567-1577.
- Burrows, P.C., Severinov, K., Ishihama, A., Buck, M., and Wigneshweraraj, S.R. (2003) Mapping sigma 54-RNA polymerase interactions at the -24 consensus promoter element. *Journal of Biological Chemistry* 278: 29728-29743.
- Burton, S.G. (2003) Oxidizing enzymes as biocatalysts. *Trends in Biotechnology* 21: 543-549.
- Butler, J., He, Q., Nevin, K., He, Z., Zhou, J., and Lovley, D. (2007) Genomic and microarray analysis of aromatics degradation in *Geobacter metallireducens* and comparison to a *Geobacter* isolate from a contaminated field site. *BMC Genomics* 8: 180.
- Cao, B., Nagarajan, K., and Loh, K.-C. (2009) Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85: 207-228.
- Carmona, M., and Díaz, E. (2005) Iron-reducing bacteria unravel novel strategies for the anaerobic catabolism of aromatic compounds. *Molecular Microbiology* 58: 1210-1215.
- Carmona, M., Zamarro, M.T., Blazquez, B., Durante-Rodriguez, G., Juarez, J.F., Valderrama, J.A. et al. (2009) Anaerobic Catabolism of Aromatic Compounds: a Genetic and Genomic View. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73: 71-133.
- Cebolla, A., Sousa, C., and de Lorenzo, V.c. (1997) Effector Specificity Mutants of the Transcriptional Activator NahR of Naphthalene Degrading *Pseudomonas* Define Protein Sites Involved in Binding of Aromatic Inducers. *Journal of Biological Chemistry* 272: 3986-3992.
- Coco, W.M., Parsek, M.R., and Chakrabarty, A.M. (1994) Purification of the LysR family regulator, ClcR, and its interaction with the *Pseudomonas putida* *clcABD* chlorocatechol operon promoter. *J. Bacteriol.* 176: 5530-5533.
- Combet, C., Jambon, M., Delèage, G., and Geourjon, C. (2002) Geno3D: automatic comparative molecular modelling of protein. *Bioinformatics* 18: 213-214.

- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J., Terol, J., Talón, M., and Robles, M. (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21: 3674-3676.
- Coschigano, P.W. (2000) Transcriptional Analysis of the *tutE* *tutFDGH* Gene Cluster from *Thauera aromatica* Strain T1. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1147-1151.
- Coschigano, P.W., and Young, L.Y. (1997) Identification and sequence analysis of two regulatory genes involved in anaerobic toluene metabolism by strain T1. *Appl Environ Microbiol* 63(2): 652–660.
- Cousin, X., Hotelier, T., Lievin, P., Toutant, J.P., and Chatonnet, A. (1996) A cholinesterase genes server (ESTHER): a database of cholinesterase-related sequences for multiple alignments, phylogenetic relationships, mutations and structural data retrieval. *Nucleic Acids Res* 24: 132-136.
- Cserzo, M., Wallin, E., Simon, I., von Heijne, G., and Elofsson, A. (1997) Prediction of transmembrane alpha-helices in procariotic membrane proteins: the Dense Alignment Surface method. *Prot. Eng* 10: 673-676.
- Chan, C.S., Chang, L., Winstone, T.M.L., and Turner, R.J. (2010) Comparing system-specific chaperone interactions with their Tat dependent redox enzyme substrates. *FEBS Letters* 584: 4553-4558.
- Chen, B., Sysoeva, T.A., Chowdhury, S., and Nixon, B.T. (2008) Regulation and action of the bacterial enhancer-binding protein AAA+ domains. *Biochem Soc Trans.* 36(Pt 1): 89-93.
- Chen, B., Sysoeva, T.A., Chowdhury, S., Guo, L., De Carlo, S., Hanson, J.A. et al. (2010) Engagement of Arginine Finger to ATP Triggers Large Conformational Changes in NtrC1 AAA+ ATPase for Remodeling Bacterial RNA Polymerase. *Structure (London, England : 1993)* 18: 1420-1430.
- Choi, K.-H., Kumar, A., and Schweizer, H.P. (2006) A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: Application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *Journal of Microbiological Methods* 64: 391-397.
- Chugani, S.A., Parsek, M.R., Hershberger, C.D., Murakami, K., Ishihama, A., and Chakrabarty, A.M. (1997) Activation of the *catBCA* promoter: probing the interaction of CatR and RNA polymerase through in vitro transcription. *J. Bacteriol.* 179: 2221-2227.
- Dagley, S., Rose, A.H., and Wilkinson, J.F. (1971) Catabolism of Aromatic Compounds by Micro-Organisms. In *Advances in Microbial Physiology: Academic Press*, pp. 1-46.
- Darley, P.I., Hellstern, J.A., Medina-Bellver, J.I., Marques, S., Schink, B., and Philipp, B. (2007) Heterologous Expression and Identification of the Genes Involved in Anaerobic Degradation of 1,3-Dihydroxybenzene (Resorcinol) in *Azoarcus anaerobius*. *J. Bacteriol.* 189: 3824-3833.
- de Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U., and Timmis, K.N. (1990) Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* 172: 6568-6572.
- Dias, J., Than, M., Humm, A., Huber, R., Bourenkov, G., Bartunik, H. et al. (1999) Crystal structure of the first dissimilatory nitrate reductase at 1.9 Å solved by MAD methods. *Structure* 7(1): 65-79.
- Diaz, E. (2004) Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *Int Microbiol* 7: 173 - 180.
- Díaz, E., and Prieto, M.A. (2000) Bacterial promoters triggering biodegradation of aromatic pollutants. *Current Opinion in Biotechnology* 11: 467-475.

- Dombroski, A.J. (1997) Recognition of the -10 Promoter Sequence by a Partial Polypeptide of sigma 70 in Vitro. *Journal of Biological Chemistry* 272: 3487-3494.
- Dorner, E., and Boll, M. (2002) Properties of 2-Oxoglutarate:Ferredoxin Oxidoreductase from *Thauera aromatica* and Its Role in Enzymatic Reduction of the Aromatic Ring. *J. Bacteriol.* 184: 3975-3983.
- Dua, Singh, Sethunathan, and Johri (2002) Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59: 143-152.
- Dubbs, P., Dubbs, J.M., and Tabita, F.R. (2004) Effector-Mediated Interaction of CbbRI and CbbRII Regulators with Target Sequences in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* 186: 8026-8035.
- Dunwell, J.M., Purvis, A., and Khuri, S. (2004) Cupins: the most functionally diverse protein superfamily? *Phytochemistry* 65: 7-17.
- Durante-Rodriguez, G., Zamarro, M.T., Garcia, J.L., Diaz, E., and Carmona, M. (2006) Oxygen-Dependent Regulation of the Central Pathway for the Anaerobic Catabolism of Aromatic Compounds in *Azoarcus* sp. Strain CIB. *J. Bacteriol.* 188: 2343-2354.
- Durante-Rodriguez, G., Zamarro, M.T., Garcia, J.L., Diaz, E., and Carmona, M. (2008) New insights into the BzdR-mediated transcriptional regulation of the anaerobic catabolism of benzoate in *Azoarcus* sp. CIB. *Microbiology* 154: 306-316.
- Egland, P.G., and Harwood, C.S. (1999) BadR, a New MarR Family Member, Regulates Anaerobic Benzoate Degradation by *Rhodopseudomonas palustris* in Concert with AadR, an Fnr Family Member. *J. Bacteriol.* 181: 2102-2109.
- Egland, P.G., Pelletier, D.A., Dispensa, M., Gibson, J., and Harwood, C.S. (1997) A cluster of bacterial genes for anaerobic benzene ring biodegradation. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6484-6489.
- Fernández-Juárez, J. (2011) Caracterización de los genes *mbd* de *Azoarcus* sp. CIB: Descripción de una nueva ruta para la degradación anaeróbica de compuestos aromáticos. In *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Fernández, S., de Lorenzo, V., and Pérez-Martín, J. (1995) Activation of the transcriptional regulator XylR of *Pseudomonas putida* by release of repression between functional domains. *Mol Microbiol* 16: 205-213.
- Field, J.A., Stams, A.J.M., Kato, M., and Schraa, G. (1995) Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia. *Antonie van Leeuwenhoek* 67: 47-77.
- Forward, J.A., Behrendt, M.C., Wyborn, N.R., Cross, R., and Kelly, D.J. (1997) TRAP transporters: a new family of periplasmic solute transport systems encoded by the *dctPQM* genes of *Rhodobacter capsulatus* and by homologs in diverse gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 179: 5482-5493.
- Frank, R., Leeper, F., and Luisi, B. (2007) Structure, mechanism and catalytic duality of thiamine-dependent enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64: 892-905.
- Friedman, D.I. (1988) Integration host factor: A protein for all reasons. *Cell* 55: 545-554.
- Fuchs, G. (2008) Anaerobic Metabolism of Aromatic Compounds. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125: 82-99.
- Galvão, T.C., and de Lorenzo, V. (2006) Transcriptional regulators *À la carte*: engineering new effector specificities in bacterial regulatory proteins. *Current Opinion in Biotechnology* 17: 34-42.

- Gallegos, M.T., Cannon, W.V., and Buck, M. (1999) Functions of the sigma(54) region I in trans and implications for transcription activation. *J Biol Chem* 274: 25285-25290.
- Gallus, C., and Schink, B. (1994) Anaerobic degradation of pimelate by newly isolated denitrifying bacteria. *Microbiology* 140: 409-416.
- Gallus, C., and Schink, B. (1998) Anaerobic degradation of α -resorcyate by *Thauera aromatica* strain AR-1 proceeds via oxidation and decarboxylation to hydroxyhydroquinone. *Archives of Microbiology* 169: 333-338.
- Gallus, C., N, G., Ludwig, W., and B, S. (1997) Anaerobic degradation of α -resorcyate by a nitrate-reducing bacterium, *Thauera aromatica* strain AR-1. *System. Appl. Microbiol.* 20: 540-544.
- Genest, O., Méjean, V., and Iobbi-Nivol, C. (2009a) Multiple roles of TorD-like chaperones in the biogenesis of molybdoenzymes. *FEMS Microbiology Letters* 297: 1-9.
- Genest, O., Mejean, V., and Iobbi-Nivol, C. (2009b) Multiple roles of TorD-like chaperones in the biogenesis of molybdoenzymes. *FEMS Microbiol Lett* 297: 1-9.
- Genest, O., Neumann, M., Seduk, F., Stäcklein, W., Méjean, V., Leimkühler, S., and Iobbi-Nivol, C. (2008) Dedicated Metallochaperone Connects Apoenzyme and Molybdenum Cofactor Biosynthesis Components. *Journal of Biological Chemistry* 283: 21433-21440.
- Gibson, J., and Harwood, C.S. (2002) Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. *Annu Rev Microbiol* 56: 345 - 369.
- Gibson, J., Dispensa, M., Fogg, G.C., Evans, D.T., and Harwood, C.S. (1994) 4-Hydroxybenzoate-coenzyme A ligase from *Rhodospseudomonas palustris*: purification, gene sequence, and role in anaerobic degradation. *J. Bacteriol.* 176: 634-641.
- Goethals, K., Van Montagu, M., and Holsters, M. (1992) Conserved motifs in a divergent nod box of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 reveal a common structure in promoters regulated by LysR-type proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89: 1646-1650.
- Goodrich, J.A., Schwartz, M.L., and McClure, W.R. (1990) Searching for and predicting the activity of sites for DNA binding proteins: compilation and analysis of the binding sites for *Escherichia coli* integration host factor (IHF). *Nucleic Acids Res.* 18(17): 4993-5000.
- Goosen, N., and van de Putte, P. (1995) The regulation of transcription initiation by integration host factor. *Molecular Microbiology* 16: 1-7.
- Gorke, B., and Stulke, J. (2008) Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Micro* 6: 613-624.
- Gorny, N., and Schink, B. (1994a) Complete anaerobic oxidation of hydroquinone by *Desulfococcus* sp. strain Hy5: indications of hydroquinone carboxylation to gentisate. *Archives of Microbiology* 162: 131-135.
- Gorny, N., and Schink, B. (1994b) Anaerobic degradation of catechol by *Desulfobacterium* sp. strain Cat2 proceeds via carboxylation to protocatechuate. *Appl Environ Microbiol* 60: 3396-3340.
- Gorny, N., and Schink, B. (1994c) Hydroquinone degradation via reductive dehydroxylation of gentisyl-CoA by a strictly anaerobic fermenting bacterium. *Archives of Microbiology* 161: 25-32.

- Gorny, N., Wahl, G., Brune, A., and Schink, B. (1992) A strictly anaerobic nitrate-reducing bacterium growing with resorcinol and other aromatic compounds. *Arch Microbiol* 158(1): 48-53.
- Götz, S., García-Gómez, J., Terol, J., Williams, T., Nagaraj, S., Nueda, M. et al. (2008) High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Research* 36: 3420-3435.
- Haas, C., Rodionov, D., Kropat, J., Malasarn, D., Merchant, S., and de Crecy-Lagard, V. (2009) A subset of the diverse COG0523 family of putative metal chaperones is linked to zinc homeostasis in all kingdoms of life. *BMC Genomics* 10: 470.
- Haddock, J.D., and Ferry, J.G. (1989) Purification and properties of phloroglucinol reductase from *Eubacterium oxidoreducens* G-41. *Journal of Biological Chemistry* 264: 4423-4427.
- Harayama, S., Kok, M., and Neidle, E.L. (1992) Functional and Evolutionary Relationships Among Diverse Oxygenases. *Annual Review of Microbiology* 46: 565-601.
- Harrison, F.H., and Harwood, C.S. (2005) The pimFABCDE operon from *Rhodospseudomonas palustris* mediates dicarboxylic acid degradation and participates in anaerobic benzoate degradation. *Microbiology* 151: 727-736.
- Harwood, C.S., and Parales, R.E. (1996) THE β^2 -KETOADIPATE PATHWAY AND THE BIOLOGY OF SELF-IDENTITY. *Annual Review of Microbiology* 50: 553-590.
- Harwood, C.S., and Gibson, J. (1997) Shedding light on anaerobic benzene ring degradation: a process unique to prokaryotes? *J Bacteriol* 179: 301 - 309.
- Harwood, C.S., Burchhardt, G., Herrmann, H., and Fuchs, G. (1999) Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway. *FEMS Microbiol Rev* 22: 439 - 458.
- Hayaishi, O. (1994) Tryptophan, Oxygen, and Sleep. *Annual Review of Biochemistry* 63: 1-25.
- Hefti, M.H., François, K.J., de Vries, S.C., Dixon, R., and Vervoort, J. (2004) The PAS fold. A redefinition of the PAS domain based upon structural prediction. *Eur J Biochem* 271(6): 1198-1208.
- Heider, J. (2007) Adding handles to unhandy substrates: anaerobic hydrocarbon activation mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology* 11: 188-194.
- Heider, J., and Fuchs, G. (1997) Anaerobic Metabolism of Aromatic Compounds. *European Journal of Biochemistry* 243: 577-596.
- Heider, J., Boll, M., Breese, K., Breinig, S., Ebenau-Jehle, C., Feil, U. et al. (1998) Differential induction of enzymes involved in anaerobic metabolism of aromatic compounds in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *Archives of Microbiology* 170: 120-131.
- Hellstern, J.A. (2005) Anaerobic degradation of resorcinol (1,3-dihydroxybenzene) by *Azoarcus anaerobius*: Biochemical aspects of the degradation pathway and identification of involved genes. *PhD Thesis. University of Konstanz*.
- Henderson, N., Austin, S., and Dixon, R.A. (1989) Role of metal ions in negative regulation of nitrogen fixation by the *nifL* gene product from *Klebsiella pneumoniae*. *Molecular and General Genetics MGG* 216: 484-491.
- Henikoff, S., Haughn, G.W., Calvo, J.M., and Wallace, J.C. (1988) A large family of bacterial activator proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85: 6602-6606.

- Hermuth, K., Leuthner, B., and Heider, J. (2002) Operon structure and expression of the genes for benzylsuccinate synthase in *Thauera aromatica* strain K172. *Archives of Microbiology* 177: 132-138.
- Hernandez-Lucas, I., Gallego-Hernandez, A.L., Encarnacion, S., Fernandez-Mora, M., Martinez-Batallar, A.G., Salgado, H. et al. (2008) The LysR-Type Transcriptional Regulator LeuO Controls Expression of Several Genes in *Salmonella enterica* Serovar Typhi. *J. Bacteriol.* 190: 1658-1670.
- Heroven, A.K., and Dersch, P. (2006) RovM, a novel LysR-type regulator of the virulence activator gene *rovA*, controls cell invasion, virulence and motility of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Molecular Microbiology* 62: 1469-1483.
- Hester, K.L., Lehman, J., Najar, F., Song, L., Roe, B.A., MacGregor, C.H. et al. (2000) Crc Is Involved in Catabolite Repression Control of the *bkd* Operons of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 182: 1144-1149.
- Hill, S., Austin, S., Eydmann, T., Jones, T., and Dixon, R. (1996) *Azotobacter vinelandii* NIFL is a flavoprotein that modulates transcriptional activation of nitrogen-fixation genes via a redox-sensitive switch. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 2143-2148.
- Ho, Y.-S.J., Burden, L.M., and Hurley, J.H. (2000) Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. *Embo J* 19: 5288-5299.
- Hofmann, K., and Stoffel, W. (1993) TMbase - A database of membrane spanning proteins segments
Biol. Chem. Hoppe-Seyler 374,166.
- Holmquist, M. (2000) Alpha Beta-Hydrolase Fold Enzymes Structures, Functions and Mechanisms *Curr Protein Pept Sci* 1(2): 209-235.
- Hotelier, T., Renault, L., Cousin, X., Negre, V., Marchot, P., and Chatonnet, A. (2004) ESTHER, the database of the alpha/beta-hydrolase fold superfamily of proteins. *Nucleic Acids Res* 32: D145-147.
- Ilbert, M., Mejean, V., and Iobbi-Nivol, C. (2004) Functional and structural analysis of members of the TorD family, a large chaperone family dedicated to molybdoproteins. *Microbiology* 150: 935-943.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
- Ishihama, A. (2000) FUNCTIONAL MODULATION OF *ESCHERICHIA COLI* RNA POLYMERASE. *Annual Review of Microbiology* 54: 499-518.
- Jackson, B., Brocker, C., Thompson, D.C., Black, W., Vasiliou, K., Nebert, D.W., and Vasiliou, V. (2011) Update on the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH) superfamily. *Hum Genomics* 5(4): 283-303.
- Jacobs, C., Frère, J.-M., and Normark, S. (1997) Cytosolic Intermediates for Cell Wall Biosynthesis and Degradation Control Inducible β -Lactam Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Cell* 88: 823-832.
- Joerger, R.D., Jacobson, M.R., and Bishop, P.E. (1989) Two *nifA*-like genes required for expression of alternative nitrogenases by *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 171: 3258-3267.
- Joly, N., Engl, C., Jovanovic, G., Huvet, M., Toni, T., Sheng, X. et al. (2010) Managing membrane stress: the phage shock protein (Psp) response, from molecular mechanisms to physiology. *FEMS Microbiology Reviews* 34: 797-827.

- Jorgensen, C., and Dandanell, G. (1999) Isolation and Characterization of Mutations in the Escherichia coli Regulatory Protein XapR. *J. Bacteriol.* 181: 4397-4403.
- Kahsay, R.Y., Gao, G., and Liao, L. (2005) An improved hidden Markov model for transmembrane protein detection and topology prediction and its applications to complete genomes. *Bioinformatics* 21: 1853-1858.
- Kelley, L.A., and Sternberg, M.J.E. (2009) Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat. Protocols* 4: 363-371.
- Kelly, D.J., and Thomas, G.H. (2001) The tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters of bacteria and archaea. *FEMS Microbiol Rev.* 25: 405-424.
- Kessler, B., de Lorenzo, V., and Timmis, K.N. (1992) A general system to integrate lacZ fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of the Pm promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol Gen Genet* 233(1-2): 293-301.
- Key, J., Hefti, M., Purcell, E.B., and Moffat, K. (2007) Structure of the Redox Sensor Domain of Azotobacter vinelandii NifL at Atomic Resolution: Signaling, Dimerization, and Mechanism. *Biochemistry* 46: 3614-3623.
- Khoroshilova, N., Popescu, C., Månck, E., Beinert, H., and Kiley, P.J. (1997) Iron-sulfur cluster disassembly in the FNR protein of Escherichia coli by O₂: [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion with loss of biological activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94: 6087-6092.
- Kiefer, F., Arnold, K., Künzli, M., Bordoli, L., and Schwede, T. (2009) The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Research* 37: D387-D392.
- Kisker, C., Schindelin, H., Baas, D., Rétey, J., Meckenstock, R., and Kroneck, P. (1998) A structural comparison of molybdenum cofactor-containing enzymes. *FEMS Microbiol Rev* 22(5): 503-521.
- Kluge, C., Tschech, A., and Fuchs, G. (1990) Anaerobic metabolism of resorcylic acids (– dihydroxybenzoic acids) and resorcinol (1,3-benzenediol) in a fermenting and in a denitrifying bacterium. *Archives of Microbiology* 155: 68-74.
- Kreft, J.-U., and Schink, B. (1994) O²-Demethylation by the Homoacetogenic Anaerobe Holophaga Foetida Studied by a New Photometric Methylation Assay Using Electrochemically Produced Cob(I)Alamin. *European Journal of Biochemistry* 226: 945-951.
- Krumholz R., and Bryant M.P. (1988) Characterization of the pyrogallol-phloroglucinol isomerase of *Eubacterium oxidoreducens*. *J Bacteriol* 170: 2472-2479.
- Kustu, S., North, A.K., and Weiss, D.S. (1991) Prokaryotic transcriptional enhancers and enhancer-binding proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 16: 397-402.
- Law, C.J., Maloney, P.C., and Wang, D.-N. (2008) Ins and Outs of Major Facilitator Superfamily Antiporters. *Annual Review of Microbiology* 62: 289-305.
- Lee, S.Y., De La Torre, A., Yan, D., Kustu, S., Nixon, B.T., and Wemmer, D.E. (2003) Regulation of the transcriptional activator NtrC1: structural studies of the regulatory and AAA+ ATPase domains. *Genes & Development* 17(20): 2552-2563.
- Lindquist, S., Lindberg, F., and Normark, S. (1989) Binding of the Citrobacter freundii AmpR regulator to a single DNA site provides both autoregulation and activation of the inducible ampC beta-lactamase gene. *J. Bacteriol.* 171: 3746-3753.
- Little, R., Salinas, P., Slavny, P., Clarke, T.A., and Dixon, R. (2011) Substitutions in the redox-sensing PAS domain of the NifL regulatory protein define an inter-subunit pathway for redox signal transmission. *Molecular Microbiology* 82: 222-235.

- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta (CT)) Method. *Methods* 25: 402-408.
- Lochowska, A., Iwanicka-Nowicka, R., Zaim, J., Witkowska-Zimny, M., Bolewska, K., and Hryniewicz, M.M. (2004) Identification of activating region (AR) of Escherichia coli LysR-type transcription factor CysB and CysB contact site on RNA polymerase alpha subunit at the *cysP* promoter. *Molecular Microbiology* 53: 791-806.
- Lopez-Sanchez, A., Floriano, B., Andujar, E., Hernaez, M.J., and Santero, E. (2010) Tetralin-Induced and ThnR-Regulated Aldehyde Dehydrogenase and β -Oxidation Genes in *Sphingomonas macrogolita* Strain TFA. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 110-118.
- López-Sánchez, A. (2009) Expresión de los genes *thn*: organización transcripcional y activación mediada por el regulador tipo LysR ThnR. In *Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica*. Sevilla: Pablo de Olavide.
- López-Sánchez, A., Rivas-Marín, E., Martínez-Pérez, O., Floriano, B., and Santero, E. (2009) Co-ordinated regulation of two divergent promoters through higher-order complex formation by the LysR-type regulator ThnR. *Molecular Microbiology* 73: 1086-1100.
- López Barragan, M.J., Diaz, E., Garcia, J.L., and Carmona, M. (2004a) Genetic clues on the evolution of anaerobic catabolism of aromatic compounds. *Microbiology* 150: 2018 - 2021.
- López Barragan, M.J., Carmona, M., Zamarro, M.T., Thiele, B., Boll, M., Fuchs, G. et al. (2004b) The *bzd* gene cluster, coding for anaerobic benzoate catabolism, in *Azoarcus* sp. strain CIB. *J Bacteriol* 186: 5762 - 5774.
- Lovley, D.R. (2003) Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation. *Nat Rev Micro* 1: 35-44.
- Lupas, A.N., and Martin, J. (2002) AAA proteins. *Curr Opin Struct Biol* 12: 746-753.
- Llamas, M.a.A., Rodríguez-Herva, J.J., Hancock, R.E.W., Bitter, W., Tommassen, J., and Ramos, J.L. (2003) Role of *Pseudomonas putida* *tol-oprL* Gene Products in Uptake of Solutes through the Cytoplasmic Membrane. *Journal of Bacteriology* 185: 4707-4716.
- MacLean, A.M., Anstey, M.I., and Finan, T.M. (2008) Binding site determinants for the LysR-type transcriptional regulator PcaQ in the legume endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 190: 1237-1246.
- Macheroux, P., Hill, S., Austin, S., Eydmann, T., Jones, T., Kim, S.O. et al. (1998) Electron donation to the flavoprotein NifL, a redox-sensing transcriptional regulator. *Biochem. J.* 332: 413-419.
- Maddocks, S.E., and Oyston, P.C.F. (2008) Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* 154: 3609-3623.
- Magalon, A., Fedor, J.G., Walburger, A., and Weiner, J.H. (2011) Molybdenum enzymes in bacteria and their maturation. *Coordination Chemistry Reviews* 255: 1159-1178.
- Manoil, C., and Beckwith, J. (1985) *TnphoA*: a transposon probe for protein export signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82: 8129-8133.
- Marqu s, S., and Ramos, J.L. (1993) Transcriptional control of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid catabolic pathways. *Molecular Microbiology* 9: 923-929.

- Martinez-Argudo, I., Little, R., Shearer, N., Johnson, P., and Dixon, R. (2004) The NifL-NifA System: a Multidomain Transcriptional Regulatory Complex That Integrates Environmental Signals. *J. Bacteriol.* 186: 601-610.
- Martinez-Perez, O., Moreno-Ruiz, E., Floriano, B., and Santero, E. (2004) Regulation of Tetralin Biodegradation and Identification of Genes Essential for Expression of the Operons. *J. Bacteriol.* 186: 6101-6109.
- Martinez-Perez, O., Lopez-Sanchez, A., Reyes-Ramirez, F., Floriano, B., and Santero, E. (2007) Integrated Response to Inducers by Communication between a Catabolic Pathway and Its Regulatory System. *J. Bacteriol.* 189: 3768-3775.
- Matsunaga, T., Okamura, Y., Fukuda, Y., Wahyudi, A.T., Murase, Y., and Takeyama, H. (2005) Complete Genome Sequence of the Facultative Anaerobic Magnetotactic Bacterium *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1. *DNA Research* 12: 157-166.
- McFall, S.M., Parsek, M.R., and Chakrabarty, A.M. (1997a) 2-chloromuconate and ClcR-mediated activation of the clcABD operon: in vitro transcriptional and DNase I footprint analyses. *J. Bacteriol.* 179: 3655-3663.
- McFall, S.M., Klem, T.J., Fujita, N., Ishihama, A., and Chakrabarty, A.M. (1997b) DNase I footprinting, DNA bending and in vitro transcription analyses of ClcR and CatR interactions with the clcABD promoter: evidence of a conserved transcriptional activation mechanism. *Molecular Microbiology* 24: 965-976.
- McInerney, M.J., Rohlin, L., Mouttaki, H., Kim, U., Krupp, R.S., Rios-Hernandez, L. et al. (2007) The genome of *Syntrophus aciditrophicus*: Life at the thermodynamic limit of microbial growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 7600-7605.
- Méjean, V., Lobbi-Nivol, C., Lepelletier, M., Giordano, G., Chippaux, M., and Pascal, M.-C. (1994) TMAO anaerobic respiration in *Escherichia coli*: involvement of the tor operon. *Molecular Microbiology* 11: 1169-1179.
- Messerschmidt, A., Niessen, H., Abt, D., Einsle, O., Schink, B., and Kroneck, P.M.H. (2004) Crystal structure of pyrogallol-phloroglucinol transhydroxylase, an Mo enzyme capable of intermolecular hydroxyl transfer between phenols. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 11571-11576.
- Möglich, A., Ayers, R.A., and Moffat, K. (2009) Design and Signaling Mechanism of Light-Regulated Histidine Kinases. *Journal of Molecular Biology* 385: 1433-1444.
- Monferrer, D., Tralau, T., Kertesz, M.A., Panjikar, S., and Usón, I. (2008) High crystallizability under air-exclusion conditions of the full-length LysR-type transcriptional regulator TsaR from *Comamonas testosteroni* T-2 and data-set analysis for a MIRAS structure-solution approach. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 64(Pt 8): 764-769.
- Monferrer, D., Tralau, T., Kertesz, M.A., Dix, I., Solà, M., and Usón, I. (2010) Structural studies on the full-length LysR-type regulator TsaR from *Comamonas testosteroni* T-2 reveal a novel open conformation of the tetrameric LTTR fold. *Mol Microbiol* 75(5): 1199-1214.
- Monod, J. (1942) Recherches sur la Croissance des Cultures Bactériennes. *Thesis, Hermann et Cie, Paris (1942)*.
- Morales, G., Linares, J.F., Beloso, A., Albar, J.P., Martinez, J.L., and Rojo, F. (2004) The *Pseudomonas putida* Crc global regulator controls the expression of genes from several chromosomal catabolic pathways for aromatic compounds. *Journal of Bacteriology* 186: 1337-1344.
- Morett, E., and Buck, M. (1989) In vivo studies on the interaction of RNA polymerase- σ^{54} with the *Klebsiella pneumoniae* and *Rhizobium meliloti* nifH promoters: The role of

- NifA in the formation of an open promoter complex. *Journal of Molecular Biology* 210: 65-77.
- Morett, E., and Segovia, L. (1993) The sigma 54 bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains. *J. Bacteriol.* 175: 6067-6074.
- Mulder, N.J., Apweiler, R., Attwood, T.K., Bairoch, A., Bateman, A., Binns, D. et al. (2005) InterPro, progress and status in 2005. *Nucleic Acids Res* 33: D201 - 205.
- Müller, F.H., Bandejas, T.M., Urich, T., Teixeira, M., Gomes, C.M., and Kletzin, A. (2004) Coupling of the pathway of sulphur oxidation to dioxygen reduction: characterization of a novel membrane-bound thiosulphate:quinone oxidoreductase. *Molecular Microbiology* 53: 1147-1160.
- Mulligan, C., Kelly, D., and Thomas, G. (2007) Tripartite ATP-Independent Periplasmic Transporters: Application of a Relational Database for Genome-Wide Analysis of Transporter Gene Frequency and Organization. *J Mol Microbiol Biotechnol* 12(3-4): 218-226.
- Naponelli, V., Noiriél, A., Ziemak, M., Beverley, S., Lye, L., Plume, A. et al. (2008) Phylogenomic and functional analysis of pterin-4a-carbinolamine dehydratase family (COG2154) proteins in plants and microorganisms. *Plant Physiol* 146: 1515-1527.
- Nemeria, N.S., Chakraborty, S., Balakrishnan, A., and Jordan, F. (2009) Reaction mechanisms of thiamin diphosphate enzymes: defining states of ionization and tautomerization of the cofactor at individual steps. *FEBS Journal* 276: 2432-3446.
- Neuwald, A.F., Aravind, L., Spouge, J.L., and Koonin, E.V. (1999) AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res* 9: 27-43.
- Ng, L.C., Poh, C.L., and Shingler, V. (1995) Aromatic effector activation of the NtrC-like transcriptional regulator PhhR limits the catabolic potential of the (methyl)phenol degradative pathway it controls. *J. Bacteriol.* 177: 1485-1490.
- North, A., Klose, K., Stedman, K., and S, K. (1993) Prokaryotic enhancer-binding proteins reflect eukaryote-like modularity: the puzzle of nitrogen regulatory protein C. *J Bacteriol* 175(14): 4267-4273.
- Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M. et al. (1992) The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Engineering* 5: 197-211.
- Osipiuk, J., Zhou, M., Moy, S., Collart, F., and Joachimiak, A. (2009) X-Ray crystal structure of GarR—tartronate semialdehyde reductase from *Salmonella typhimurium*. *Journal of Structural and Functional Genomics* 10: 249-253.
- Ostrowski, J., and Kredich, N.M. (1990) In vitro interactions of CysB protein with the cysJIH promoter of *Salmonella typhimurium*: inhibitory effects of sulfide. *Journal of Bacteriology* 172: 779-785.
- Pao, S.S., Paulsen, I.T., and Saier, M.H. (1998) Major Facilitator Superfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 1-34.
- Parales, R.E., Ju, K.S., B., R.J., and L., D.J. (2008) Bioavailability, chemotaxis, and transport of organic pollutants. In E. Díaz (ed.), *Microbial biodegradation: genomics and molecular biology*. Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom: 145-187.
- Parsek, M.R., Shinabarger, D.L., Rothmel, R.K., and Chakraborty, A.M. (1992) Roles of CatR and cis,cis-muconate in activation of the catBC operon, which is involved in benzoate degradation in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 174: 7798-7806.

- Parsek, M.R., McFall, S.M., Shinabarger, D.L., and Chakrabarty, A.M. (1994a) Interaction of two LysR-type regulatory proteins CatR and ClcR with heterologous promoters: functional and evolutionary implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 12393-12397.
- Parsek, M.R., Ye, R.W., Pun, P., and Chakrabarty, A.M. (1994b) Critical nucleotides in the interaction of a LysR-type regulator with its target promoter region. catBC promoter activation by CatR. *Journal of Biological Chemistry* 269: 11279-11284.
- Pavel, H., Forsman, M., and Shingler, V. (1994) An aromatic effector specificity mutant of the transcriptional regulator DmpR overcomes the growth constraints of *Pseudomonas* sp. strain CF600 on para-substituted methylphenols. *J Bacteriol* 176(24): 7550-7557
- Pelletier, D.A., and Harwood, C.S. (2000) 2-Hydroxycyclohexanecarboxyl Coenzyme A Dehydrogenase, an Enzyme Characteristic of the Anaerobic Benzoate Degradation Pathway Used by *Rhodospseudomonas palustris*. *J Bacteriol* 182: 2753-2760.
- Peres, C., and Harwood, C.S. (2006) BadM is a transcriptional repressor and one of three regulators that control benzoyl coenzyme A reductase gene expression in *Rhodospseudomonas palustris*. *J Bacteriol* 188: 8662-8665.
- Pérez-Martín, J., Rojo, F., and de Lorenzo, V. (1994) Promoters responsive to DNA bending: a common theme in prokaryotic gene expression. *Microbiol Rev.* 58(2): 268-290.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* 8(10): 785-786.
- Pflugger, K., Ehrenreich, A., Salmon, K., Gunsalus, R.P., Deppenmeier, U., Gottschalk, G., and Muller, V. (2007) Identification of genes involved in salt adaptation in the archaeon *Methanosarcina mazei* Go1 using genome-wide gene expression profiling. *FEMS Microbiol Lett* 277: 79 - 89.
- Philipp, B., and Schink, B. (1998) Evidence of Two Oxidative Reaction Steps Initiating Anaerobic Degradation of Resorcinol (1,3-Dihydroxybenzene) by the Denitrifying Bacterium *Azoarcus anaerobius*. *J. Bacteriol.* 180: 3644-3649.
- Philipp, B., and Schink, B. (2000) Two distinct pathways for anaerobic degradation of aromatic compounds in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* strain AR-1. *Archives of Microbiology* 173: 91-96.
- Picossi, S., Belitsky, B.R., and Sonenshein, A.L. (2007) Molecular Mechanism of the Regulation of *Bacillus subtilis* gltAB Expression by GltC. *Journal of Molecular Biology* 365: 1298-1313.
- Ponting, C.P., and Aravind, L. (1997) PAS: a multifunctional domain family comes to light. *Curr Biol* 7(11): R674-677.
- Porrúa, O., García-Jaramillo, M., Santero, E., and Govantes, F. (2007) The LysR-type regulator AtzR binding site: DNA sequences involved in activation, repression and cyanuric acid-dependent repositioning. *Molecular Microbiology* 66: 410-427.
- Porter, S.C., North, A.K., and Kustu, S. (1995) Mechanism of transcriptional activation by NtrC (nitrogen regulatory protein C): requirement for oligomerization and phosphorylation. In *Two-component Signal Transduction*. Silhavy, T., and Hoch, J. (eds). *Washintong, DC: ASM Press*, pp.: 147-158.
- Porter, S.C., North, A.K., Wedel, A.B., and Kustu, S. (1993) Oligomerization of NTRC at the glnA enhancer is required for transcriptional activation. *Genes & Development* 7: 2258-2273.

- Quintero, M.J., Montesinos, M.L., Herrero, A., and Flores, E. (2001) Identification of Genes Encoding Amino Acid Permeases by Inactivation of Selected ORFs from the *Synechocystis* Genomic Sequence. *Genome Res* 11(12): 2034–2040
- Rabus, R., and Widdel, F. (1995) Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Arch Microbiol* 163(2): 96-103.
- Rabus, R., Kube, M., Heider, J., Beck, A., Heitmann, K., Widdel, F., and Reinhardt, R. (2005) The genome sequence of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Archives of Microbiology* 183: 27-36.
- Rajashankar, K.R., Bryk, R., Kniewel, R., Buglino, J.A., Nathan, C.F., and Lima, C.D. (2005) Crystal Structure and Functional Analysis of Lipoamide Dehydrogenase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry* 280: 33977-33983.
- Ramos, J.L., Marqués, S., and Timmis, K.N. (1997) Transcriptional control of the *Pseudomonas* TOL plasmid catabolic operons is achieved through an interplay of host factors and plasmid-encoded regulators. *Annu Rev Microbiol* 51: 341-373.
- Rappas, M., Bose, D., and Zhang, X. (2007) Bacterial enhancer-binding proteins: unlocking sigma54-dependent gene transcription. *Curr Opin Struct Biol* 17: 110-116.
- Rawlings, N.D., and Barrett, A.J. (1993) Evolutionary families of peptidases. *Biochemical J* 290 (Pt 1): 205-218.
- Rawlings, N.D., and Morton, F.R. (2008) The MEROPS batch BLAST: A tool to detect peptidases and their non-peptidase homologues in a genome. *Biochimie* 90: 243-259.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., and Bateman, A. (2010) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research* 38: D227-D233.
- Reams, A.B., and Neidle, E.L. (2004) Selection for gene clustering by tandem duplication. *Annu. Rev. Microbiol.* 58: 119-142.
- Reed, K.C., and Mann, D.A. (1985) Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. *Nucleic Acids Research* 13: 7207-7221.
- Reichenbecher, W., and Schink, B. (1999) Towards the reaction mechanism of pyrogallol-phloroglucinol transhydroxylase of *Pelobacter acidigallici*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1430: 245-253.
- Reichenbecher, W., Philipp, B., Suter, M.J.F., and Schink, B. (2000) Hydroxyhydroquinone reductase, the initial enzyme involved in the degradation of hydroxyhydroquinone (1,2,4-trihydroxybenzene) by *Desulfovibrio inopinatus*. *Archives of Microbiology* 173: 206-212.
- Reitzer, L.J., and Magasanik, B. (1986) Transcription of *glnA* in *E. coli* is stimulated by activator bound to sites far from the promoter. *Cell* 45: 785-792.
- Rieger, P.-G., Meier, H.-M., Gerle, M., Vogt, U., Groth, T., and Knackmuss, H.-J. (2002) Xenobiotics in the environment: present and future strategies to obviate the problem of biological persistence. *Journal of Biotechnology* 94: 101-123.
- Rost, B., and Liu, J. (2003) The PredictProtein server. *Nucleic Acids Res* 31(13): 3300-3304.
- Rost, B., Yachdav, G., and Liu, J. (2004) The PredictProtein server. *Nucleic Acids Research* 32: W321-W326.
- Rothmel, R.K., Shinabarger, D.L., Parsek, M.R., Aldrich, T.L., and Chakrabarty, A.M. (1991) Functional analysis of the *Pseudomonas putida* regulatory protein CatR: transcriptional studies and determination of the CatR DNA-binding site by hydroxyl-radical footprinting. *J. Bacteriol.* 173: 4717-4724.

- Rothmel, R.K., Aldrich, T.L., Houghton, J.E., Coco, W.M., Ornston, L.N., and Chakrabarty, A.M. (1990) Nucleotide sequencing and characterization of *Pseudomonas putida* catR: a positive regulator of the catBC operon is a member of the LysR family. *J. Bacteriol.* 172: 922-931.
- Rucktooa, P., Huvent, I., Antoine, R., Lecher, S., Jacob-Dubuisson, F., Villeret, V., and Bompardab, C. (2006) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of two extracytoplasmic solute receptors of the DctP family from *Bordetella pertussis* *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 62(Pt 10): 970–972.
- Rucktooa, P., Antoine, R., Herrou, J., Huvent, I., Loch, C., Jacob-Dubuisson, F. et al. (2007a) Crystal Structures of two *Bordetella pertussis* Periplasmic Receptors Contribute to Defining a Novel Pyroglutamic Acid Binding DctP Subfamily. *Journal of Molecular Biology* 370: 93-106.
- Rucktooa, P., Antoine, R., Herrou, J., Huvent, I., Loch, C., Jacob-Dubuisson, F. et al. (2007b) Crystal Structures of two *Bordetella pertussis* Periplasmic Receptors Contribute to Defining a Novel Pyroglutamic Acid Binding DctP Subfamily. *Journal of Molecular Biology* 370: 93-106.
- Saier, M.H. Regulatory interactions controlling carbon metabolism: an overview. *Research in Microbiology* 147: 439-447.
- Saier, M.H. (1996) Regulatory interactions controlling carbon metabolism: an overview. *Research in Microbiology* 147: 439-447.
- Saier, M.H., Beatty, J.T., Goffeau, A., Harley, K.T., Heijne, W.H., Huang, S.C. et al. (1999) The major facilitator superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1(2): 257-279.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Nueva York.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York.
- Sargent, F. (2007) The twin-arginine transport system: moving folded proteins across membranes. *Biochem Soc Trans.* 35(Pt 5): 835-847.
- Schell, M. (1993a) Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* 47: 597-626.
- Schell, M.A. (1993b) Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* 47: 597-626.
- Schink, B., and Pfennig, N. (1982) Fermentation of trihydroxybenzenes by *Pelobacter acidigallici* gen. nov. sp. nov., a new strictly anaerobic non-sporeforming bacterium. *Arch Microbiol* 133: 195-201.
- Schink, B., Philipp, B., and Müller, J. (2000) Anaerobic Degradation of Phenolic Compounds. *Naturwissenschaften* 87: 12-23.
- Schmitz, R.A., Klopprogge, K., and Grabbe, R. (2002) Regulation of nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae* and *Azotobacter vinelandii*: NifL, transducing two environmental signals to the nif transcriptional activator NifA. *J Mol Microbiol Biotechnol* 4(3): 235-242.
- Schnell, S., Bak, F., and Pfennig, N. (1989) Anaerobic degradation of aniline and dihydroxybenzenes by newly isolated sulfate-reducing bacteria and description of *Desulfobacterium anilini*. *Arch Microbiol* 152(6): 556-563.
- Schühle, K., Gescher, J., Feil, U., Paul, M., Jahn, M., Schägger, H., and Fuchs, G. (2003) Benzoate-Coenzyme A Ligase from *Thauera aromatica*: an Enzyme Acting in Anaerobic and Aerobic Pathways. 185 (16): 4920–4929.

- Schüler, K.H. (1997) Isolierung und mechanistische Untersuchung der Resorcin-Reduktase in *Clostridium* KN245. *Thesis, University of Constance*.
- Schumacher, J., Joly, N., Rappas, M., Zhang, X., and Buck, M. (2006) Structures and organisation of AAA+ enhancer binding proteins in transcriptional activation. *J Struct Biol* 156: 190-199.
- Schwarzenbacher, R., von Delft, F., Jaroszewski, L., Abdubek, P., Ambing, E., Biorac, T. et al. (2004) Crystal structure of a putative oxalate decarboxylase (TM1287) from *Thermotoga maritima* at 1.95 Å resolution. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 56: 392-395.
- Shingler, V. (1996) Signal sensing by sigma 54-dependent regulators: derepression as a control mechanism. *Molecular Microbiology* 19(3): 409-416.
- Shingler, V. (2003) Integrated regulation in response to aromatic compounds: from signal sensing to attractive behaviour. *Environmental Microbiology* 5: 1226-1241.
- Shingler, V., and Moore, T. (1994) Sensing of aromatic compounds by the DmpR transcriptional activator of phenol-catabolizing *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol.* 176: 1555-1560.
- Shingler, V., and Pavel, H. (1995) Direct regulation of the ATPase activity of the transcriptional activator DmpR by aromatic compounds. *Mol Microbiol* 17(3): 505-513.
- Shinoda, Y., Akagi, J., Uchihashi, Y., Hiraishi, A., Yukama, H., Yurimoto, H. et al. (2005) Anaerobic Degradation of Aromatic Compounds by Magnetospirillum Strains: Isolation and Degradation Genes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69: 1483-1491
- Slavny, P., Little, R., Salinas, P., Clarke, T.A., and Dixon, R. (2010) Quaternary structure changes in a second Per-Arnt-Sim domain mediate intramolecular redox signal relay in the NifL regulatory protein. *Molecular Microbiology* 75: 61-75.
- Snell, F.D., and Snell, C.T. (1949) Colorimetric methods of analysis. . In. Co, v.N. (ed). New York.
- Snider, J., and Houry, W.A. (2008) AAA+ proteins: diversity in function, similarity in structure. *Biochemical Society Transactions* 36(1): 72-77.
- Sprang, S.R. (1997) G PROTEIN MECHANISMS: Insights from Structural Analysis. *Annual Review of Biochemistry* 66: 639-678.
- Springer, N., Ludwig, W., Philipp, B., and Schink, B. (1998) *Azoarcus anaerobius* sp. nov., a resorcinol-degrading, strictly anaerobic, denitrifying bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 48: 953-956.
- Starmer, J., Stomp, A., Vouk, M., and Bitzer, D. (2006) Predicting Shine Dalgarno Sequence Locations Exposes Genome Annotation Errors. *PLoS Comput Biol* 2: e57.
- Staskawicz, B., Dahlbeck, D., Keen, N., and Napoli, C. (1987) Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Journal of Bacteriology* 169: 5789-5794.
- Stec, E., Witkowska-Zimny, M., Hryniewicz, M.M., Neumann, P., Wilkinson, A.J., Brzozowski, A.M. et al. (2006) Structural Basis of the Sulphate Starvation Response in *E. coli*: Crystal Structure and Mutational Analysis of the Cofactor-binding Domain of the Cbl Transcriptional Regulator. *Journal of Molecular Biology* 364: 309-322.
- Stock, J.B., Ninfa, A.J., and Stock, A.M. (1989) Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol Rev.* 53(4): 450-490.
- Stock, J.B., Stock, A.M., and Mottonen, J.M. (1990) Signal transduction in bacteria. *Nature* 344: 395-400.

- Studholme, D.J., and Dixon, R. (2003) Domain Architectures of σ^{54} -Dependent Transcriptional Activators. *Journal of Bacteriology* 185: 1757-1767.
- Sütfeld, R., Petereit, F., and Nahrstedt, A. (1996) Resorcinol in exudates of *Nuphar lutea*. *J. Chem. Ecol.* 22: 2221-2231.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*.
- Taylor, M., Butler, R., Chambers, S., Casimiro, M., Badii, F., and Merrick, M. (1996) The RpoN-box motif of the RNA polymerase sigma factor σ^N plays a role in promoter recognition. *Molecular Microbiology* 22: 1045-1054.
- Thiele, B.r., Rieder, O., Golding, B.T., Müller, M., and Boll, M. (2008) Mechanism of Enzymatic Birch Reduction: Stereochemical Course and Exchange Reactions of Benzoyl-CoA Reductase. *Journal of the American Chemical Society* 130: 14050-14051.
- Thomas, G.H., Southworth, T., LeÅ³n-Kempis, M.R., Leech, A., and Kelly, D.J. (2006) Novel ligands for the extracellular solute receptors of two bacterial TRAP transporters. *Microbiology* 152: 187-198.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., and Higgins, D.G. (2002) Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr Protoc Bioinformatics* Chapter 2.
- Thöny, B., and Hennecke, H. (1989) The -24/-12 promoter comes of age. *FEMS Microbiol Rev* 5(4): 341-357.
- Toledano, M.B., Kullik, I., Trinh, F., Baird, P.T., Schneider, T.D., and Storz, G. (1994) Redox-dependent shift of OxyR-DNA contacts along an extended DNA-binding site: A mechanism for differential promoter selection. *Cell* 78: 897-909.
- Tottey, S., Waldron, K.J., Firbank, S.J., Reale, B., Bessant, C., Sato, K. et al. (2008) Protein-folding location can regulate manganese-binding versus copper- or zinc-binding. *Nature* 455: 1138-1142.
- Tropel, D., and van der Meer, J.R. (2004) Bacterial Transcriptional Regulators for Degradation Pathways of Aromatic Compounds. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 474-500.
- Tschech, A., and Schink, B. (1985) Fermentative degradation of resorcinol and resorcylic acids. *Archives of Microbiology* 143: 52-59.
- Tschech, A., and Schink, B. (1986) Fermentative degradation of monohydroxybenzoates by defined syntrophic cocultures. *Arch Microbiol* 145: 396-402.
- Tschech, A., and Fuchs, G. (1987) Anaerobic degradation of phenol by pure cultures of newly isolated denitrifying pseudomonads. *Arch Microbiol* 148(3): 213-217.
- Tschech, A., and Fuchs, G. (1989) Anaerobic degradation of phenol via carboxylation to 4-hydroxybenzoate: in vitro study of isotopo exchange between $^{14}\text{CO}_2$ and 4-hydroxybenzoate. *Arch Microbiol* 152: 594-599.
- Turner, R.J., Papish, A.L., and Sargent, F. (2004) Sequence analysis of bacterial redox enzyme maturation proteins (REMPs). *Can J Microbiol* 50: 225-238.
- Ullrich, R., and Hofrichter, M. (2007) Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64: 271-293.
- van Keulen, G., Ridder, A.N.J.A., Dijkhuizen, L., and Meijer, W.G. (2003) Analysis of DNA Binding and Transcriptional Activation by the LysR-Type Transcriptional Regulator CbbR of *Xanthobacter flavus*. *J. Bacteriol.* 185: 1245-1252.

- van Spanning, R.J.M., Richardson, D.J., and Ferguson, S.J. (2007) Introduction to the Biochemistry and Molecular Biology of Denitrification. *Biology of the Nitrogen Cycle*. In *Biology of the Nitrogen Cycle*. Bothe, H., Ferguson, S.J., and Newton, W.E. (eds). Amsterdam: Elsevier, pp. 3-22.
- Vialaton, D., and Richard, C. (2002) Phototransformation of aromatic pollutants in solar light: Photolysis versus photosensitized reactions under natural water conditions. *Aquatic Sciences - Research Across Boundaries* 64: 207-215.
- Villemur, R. (1995) Coenzyme A ligases involved in anaerobic biodegradation of aromatic compounds. *Canadian Journal of Microbiology* 41: 855-861.
- Wackett, L.P. (2003) *Pseudomonas putida* [mdash] a versatile biocatalyst. *Nat Biotech* 21: 136-138.
- Wackett, L.P., and Hershberger, C.D. (2001) Biocatalysis and biodegradation: microbial transformation of organic compounds. *1st edn. ASM Press, Washington, DC*.
- Wagner, U.G., Stupperich, E., and Kratky, C. (2000) Structure of the Molybdate/Tungstate Binding Protein Mop from *Sporomusa ovata*. *Structure (London, England : 1993)* 8: 1127-1136.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., and Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO Journal* 1 945-951.
- Wang, L., and Winans, S.C. (1995a) The Sixty Nucleotide OccR Operator Contains a Subsite Essential and Sufficient for OccR Binding and a Second Subsite Required for Ligand-responsive DNA Bending. *Journal of Molecular Biology* 253: 691-702.
- Wang, L., and Winans, S.C. (1995b) High Angle and Ligand-induced Low Angle DNA Bends Incited by OccR Lie in the Same Plane with OccR Bound to the Interior Angle. *Journal of Molecular Biology* 253: 32-38.
- Wang, L., Helmann, J.D., and Winans, S.C. (1992) The *A. tumefaciens* transcriptional activator OccR causes a bend at a target promoter, which is partially relaxed by a plant tumor metabolite. *Cell* 69: 659-667.
- Weiss, D.S., Batut, J., Klose, K.E., Keener, J., and Kustu, S. (1991) The phosphorylated form of the enhancer-binding protein NTRC has an ATPase activity that is essential for activation of transcription. *Cell* 67: 155-167.
- Widdel, F., and Rabus, R. (2001) Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology* 12: 259-276.
- Wigneshweraraj, S., Bose, D., Burrows, P.C., Joly, N., Schumacher, J., Rappas, M. et al. (2008) Modus operandi of the bacterial RNA polymerase containing the σ 54 promoter-specificity factor. *Molecular Microbiology* 68: 538-546.
- Wilson, R.L., Urbanowski, M.L., and Stauffer, G.V. (1995) DNA binding sites of the LysR-type regulator GcvA in the *gcv* and *gcvA* control regions of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177: 4940-4946.
- Wischgoll, S., Heintz, D., Peters, F., Erxleben, A., Sarnighausen, E., Reski, R. et al. (2005) Gene clusters involved in anaerobic benzoate degradation of *Geobacter metallireducens*. *Molecular Microbiology* 58: 1238 - 1252.
- Wöhlbrand, L., Kallerhoff, B., Lange, D., Hufnagel, P., Thiermann, J., Reinhardt, R., and Rabus, R. (2007) Functional proteomic view of metabolic regulation in "Aromatoleum aromaticum" strain EbN1. *PROTEOMICS* 7: 2222-2239.

Wootton, J.C., and Drummond, M.H. (1989) The Q-linker: a class of interdomain sequences found in bacterial multidomain regulatory proteins. *Protein Engineering* 2: 535-543.

Young, D.M., Parke, D., and Ornston, L.N. (2005) OPPORTUNITIES FOR GENETIC INVESTIGATION AFFORDED BY ACINETOBACTER BAYLYI, A NUTRITIONALLY VERSATILE BACTERIAL SPECIES THAT IS HIGHLY COMPETENT FOR NATURAL TRANSFORMATION. *Annual Review of Microbiology* 59: 519-551.

Zambelli, B., Musiani, F., Savini, M., Tucker, P., and Ciurli, S. (2007) Biochemical Studies on Mycobacterium tuberculosis UreG and Comparative Modeling Reveal Structural and Functional Conservation among the Bacterial UreG Family. *Biochemistry* 46: 3171-3182.

Zhang, X., and Wiegel, J. (1994) Reversible conversion of 4-hydroxybenzoate and phenol by *Clostridium hydroxybenzoicum*. *Appl Environ Microbiol* 60: 4182-4185.

Zhang, X., Chaney, M., Wigneshweraraj, S.R., Schumacher, J., Bordes, P., Cannon, W., and Buck, M. (2002) Mechanochemical ATPases and transcriptional activation. *Molecular Microbiology* 45: 895-903.

