



UNIVERSIDAD DE GRANADA

PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOLOGÍA
FUNDAMENTAL Y DE SISTEMAS

**Caracterización molecular de las proteínas
FixK₂ y NnrR que controlan la desnitrificación
en *Bradyrhizobium diazoefficiens***

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos

Estación Experimental del Zaidín, CSIC – Granada



TESIS DOCTORAL

Andrea Jiménez Leiva

Granada, 2019



UNIVERSIDAD
DE GRANADA



UNIVERSIDAD DE GRANADA

PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOLOGÍA FUNDAMENTAL Y DE SISTEMAS

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos

Estación Experimental del Zaidín, CSIC – Granada

**Caracterización molecular de las proteínas FixK₂ y NnrR
que controlan la desnitrificación en *Bradyrhizobium
diazoefficiens***

Memoria de Tesis Doctoral presentada por la licenciada en Biología

Andrea Jiménez Leiva para aspirar al Grado de Doctor

Fdo. Andrea Jiménez Leiva

VºBº Las Directoras

Fdo. María Socorro Mesa Banqueri

Doctora en Farmacia

Científica Titula del CSIC

Fdo. María Jesús Delgado Igeño

Doctora en Biología

Investigadora Científica del CSIC

Granada, 2019

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Andrea Jiménez Leiva
ISBN: 978-84-1306-437-6
URI: <http://hdl.handle.net/10481/59614>

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

La publicación que presenta resultados obtenidos durante esta Tesis Doctoral es:

FixK₂ is the main transcriptional activator of *Bradyrhizobium diazoefficiens* nosRZDYFLX genes in response to low oxygen. Torres, M.J., Bueno, E., Jiménez-Leiva, A., Cabrera, J.J., Bedmar, E.J., Mesa, S., (2017). Front. Microbiol. 8, 1621. doi: 10.3389/fmicb.2017.01621. (IF:4.019, MICROBIOLOGY, Q2, 26% Microbiology).

También se presentan resultados en el siguiente manuscrito enviado a revisión el día 29 de abril de 2019, a la espera de ser aceptado.

Expanding the regulon of the *Bradyrhizobium diazoefficiens* NnrR transcription factor: New insights into denitrification pathway. Andrea Jiménez-Leiva, Juan J. Cabrera, Emilio Bueno, María J. Torres, Sergio Salazar, Eulogio J. Bedmar, María J. Delgado and Socorro Mesa. Submitted in Front.Microbiol. 2019 April 29. ID submitted: 468100. Impact factor: 4.019 (Journal Citation Reports, JCR, 2018) Q2, 26% Microbiology.

A continuación, se enumeran las participaciones en congresos y reuniones en los que se ha presentado resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral:

The *Bradyrhizobium diazoefficiens* denitrification regulator NnrR binds nitric oxide through a ferrous heme cofactor *in vitro*. Andrea Jiménez-Leiva, Juan J. Cabrera, María J. Torres, David J. Richardson, Eulogio J. Bedmar, Andrew J. Gates, María J. Delgado & Socorro Mesa. European Nitrogen Cycle Meeting, Alicante, Spain 19-21 September 2018. Oral communication.

Discriminatory determinants for FixK₂-DNA interaction. Juan J. Cabrera, **Andrea Jiménez-Leiva**, Laura Tomás-Gallardo, Sara Casado, María J. Torres, Eulogio J. Bedmar & Socorro Mesa. European Nitrogen Cycle Meeting, Alicante, Spain 19-21 September 2018. Oral communication.

CycA, a soluble cytochrome positively controlled by the FixK₂ and NnrR transcriptional factors, is required for nitrous oxide reductase activity in *Bradyrhizobium diazoefficiens*. Andrea Jiménez-Leiva, Juan J. Cabrera, Emilio Bueno, María J. Torres, Eulogio J. Bedmar, María J. Delgado &

Socorro Mesa. European Nitrogen Cycle Meeting, Alicante, Spain 19-21 September 2018. Oral communication.

Unravelling the controversial effects of the cysteine183 to aspartic acid Exchange in *Bradyrhizobium diazoefficiens* FixK₂ transcription factor. Sergio Parejo, Juan J. Cabrera, **Andrea Jiménez-Leiva**, Laura Tomás-Gallardo, María J. Torres, Eulogio J. Bedmar & Socorro Mesa. European Nitrogen Cycle Meeting, Alicante, Spain 19-21 September 2018. Oral communication.

Determinantes moleculares de la proteína FixK₂ de *Bradyrhizobium diazoefficiens*. Juan J. Cabrera, **Andrea Jiménez-Leiva**, Laura Tomás-Gallardo, Sara Casado, Sergio Parejo, María J. Torres, María J. Delgado, Eulogio J. Bedmar & Socorro Mesa. XIV Reunión Nacional Metabolismo Nitrógeno, Segovia, Spain, 16-18 May 2018. Oral communication.

Producción de óxido nítrico y óxido nitroso por bacterias endosimbióticas de leguminosas. María J. Delgado, María J. Torres, Juan J. Cabrera, Ana Salas, Alba Hidalgo-García, **Andrea Jiménez-Leiva**, Germán Tortosa, Socorro Mesa & Eulogio J. Bedmar. XIV Reunión Nacional Metabolismo Nitrógeno, Segovia, Spain, 16-18 May 2018. Oral communication.

Identification of novel direct targets of the *Bradyrhizobium diazoefficiens* transcriptional activator FixK₂ involved in denitrification. Andrea Jiménez-Leiva, María J. Torres, Andrea Lindemann, Hans-Martin Fischer, Eulogio J. Bedmar, María J. Delgado & Socorro Mesa. 22nd European Nitrogen Cycle Meeting, Cordoba, Spain 24-27 September 2017. Oral communication.

Molecular basis for the negative control of the *Bradyrhizobium diazoefficiens* transcriptional regulator FixK₂. Juan J. Cabrera, Mariette Bonnet, Laura Tomás-Gallardo, **Andrea Jiménez-Leiva**, María J. Torres, Noemí Fernández, Blanca de Alarcón-Gómez, Hauke Hennecke, Eulogio J. Bedmar & Socorro Mesa. 22nd European Nitrogen Cycle Meeting, Cordoba, Spain 24-27 September 2017. Poster communication.

Molecular insights into *Bradyrhizobium diazoefficiens* FixK₂ protein-DNA interaction using functional mutagenesis. Juan J. Cabrera, Sara Casado, Laura Tomás-Gallardo, **Andrea Jiménez-Leiva**, María J. Torres, Eulogio J. Bedmar & Socorro Mesa. 22nd European Nitrogen Cycle Meeting, Cordoba, Spain 24-27 September 2017. Poster communication.

Does exchange of Cys183 to aspartic acid in *Bradyrhizobium diazoefficiens* transcription factor FixK₂ mimic its oxidation-mediated

posttranslational control? Sergio Parejo, Juan J. Cabrera, **Andrea Jiménez-Leiva**, María J. Torres, Laura Tomás-Gallardo, Eulogio J. Bedmar & Socorro Mesa. 22nd European Nitrogen Cycle Meeting, Cordoba, Spain 24-27 September 2017. Poster communication.

Comprehensive definition of the direct regulon of the *Bradyrhizobium diazoefficiens* transcription factor FixK₂. **Andrea Jiménez-Leiva**, María J. Torres, Andrea Lindemann, Hans-Martin Fischer, Eulogio J. Bedmar, María J. Delgado & Socorro Mesa. 20th International Congress on Nitrogen Fixation, Granada, Spain 3-7 September 2017. Poster communication.

Dissection of *Bradyrhizobium diazoefficiens* FixK₂ protein-DNA interaction. Juan J. Cabrera, Sara Casado, Laura Tomás-Gallardo, **Andrea Jiménez-Leiva**, María J. Torres, Eulogio J. Bedmar, Socorro Mesa. 20th International Congress on Nitrogen Fixation, Granada, Spain 3-7 September 2017. Poster communication.

New insights into the oxidation-mediated posttranslational control of the *Bradyrhizobium diazoefficiens* FixK₂ regulatory protein. Sergio Parejo, Juan J. Cabrera, **Andrea Jiménez-Leiva**, María J. Torres, Laura Tomás-Gallardo, Eulogio J. Bedmar & Socorro Mesa. 20th International Congress on Nitrogen Fixation, Granada, Spain 3-7 September 2017. Poster communication.

A C-terminal region of the *Bradyrhizobium diazoefficiens* transcription factor FixK₂ plays a key role in protease recognition, DNA binding and activity. Juan J. Cabrera, Mariette Bonnet, Laura Tomás-Gallardo, **Andrea Jiménez-Leiva**, María J. Torres, Noemí Fernández, Blanca de Alarcón-Gómez, Hauke Hennecke, Eulogio J. Bedmar & Socorro Mesa. 20th International Congress on Nitrogen Fixation, Granada, Spain 3-7 September 2017. Oral communication.

FixK₂ is the transcriptional activator of *Bradyrhizobium diazoefficiens* nosRZDYFLX genes in response to low oxygen. María J. Torres, Emilio Bueno, **Andrea Jiménez-Leiva**, Juan J. Cabrera, Eulogio J. Bedmar, Socorro Mesa, María J. Delgado. 20th International Congress on Nitrogen Fixation, Granada, Spain 3-7 September 2017. Oral communication.

Identificación de nuevas dianas directas de la proteína FixK₂ de *Bradyrhizobium diazoefficiens* implicadas en la desnitrificación. **Andrea Jiménez-Leiva**, María J. Torres, Andrea Lindemann, Hans-Martin Fischer, Eulogio J. Bedmar, María J. Delgado, Socorro Mesa. II Jornadas de Investigadores en Formación: Fomentando la Interdisciplinariedad. Escuela Internacional de Posgrado. University of Granada, Granada Spain 17-19 May 2017. Oral communication.

Direct control of denitrification genes in *Bradyrhizobium diazoefficiens* by protein FixK₂. Andrea Jiménez-Leiva, María. J. Torres, Eulogio J. Bedmar, María J. Delgado, Socorro Mesa. Young Researchers-Science Symposium. Estación Experimental del Zaidín - CSIC (Granada) Spain 19 December 2016. Oral communication.

El doctorando / *The doctoral candidate* **Andrea Jiménez Leiva** y las directoras de la tesis / *and the thesis supervisor*: **María Socorro Mesa Banqueri** y **María Jesús Delgado Igeño**

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

/

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

Lugar y fecha / *Place and date*:

Granada, 30 de mayo de 2019

Directoras de la Tesis / *Thesis supervisor*;

Doctorando / *Doctoral candidate*:

Firma / *Signed*

Firma / *Signed*

María Socorro Mesa Banqueri

Andrea Jiménez Leiva

María Jesús Delgado Igeño

1. RESUMEN/SUMMARY.....	11
2. INTRODUCCIÓN.....	23
2.1. Ciclo del Nitrógeno	23
2.1.1. Fijación simbiótica de nitrógeno	25
2.1.2. Desnitrificación.....	28
2.2. Factores implicados en la regulación de la desnitrificación	37
2.2.1. Oxígeno	37
2.2.2. Nitrato/nitrito	39
2.2.3. Óxido nítrico	40
2.2.4. Balance redox	41
2.2.5. pH	43
2.2.6. Iones metálicos	44
2.3. Reguladores transcripcionales CRP/FNR.....	45
2.3.1. Fnr y FixK	46
2.3.2. Dnr, NNR y NnrR	49
2.4. Regulación de la desnitrificación en rizobios	51
2.4.1. <i>B. diazoefficiens</i> como modelo	54
2.4.1.1. Cascadas FixLJ-FixK ₂ -NnrR	56
2.4.1.2. Cascada RegRS-NifA	57
2.4.1.3. Control diferencial por FixK ₂ y NnrR	58
3. OBJETIVOS.....	63
4. MATERIALES Y MÉTODOS	67
4.1. Materiales	67
4.1.1. Cepas bacterianas	67
4.1.2. Plásmidos.....	70
4.1.3. Oligonucleótidos.....	76
4.1.4. Medios de cultivo.....	81
4.1.5. Antibióticos	82

4.1.6. Soluciones	83
4.1.7. Síntesis de óxido nítrico (NO)	85
4.2. Métodos microbiológicos	86
4.2.1. Conservación de cepas bacterianas	86
4.2.2. Cultivo de células de <i>B. diazoefficiens</i>	86
4.2.2.1. Cultivos de rutina en medio sólido y líquido.....	86
4.2.2.2. Cultivos óxicos.....	87
4.2.2.3. Cultivos microóxicos.....	87
4.2.2.4. Cultivos anóxicos	87
4.2.2.5. Incubación de células en condiciones microóxicas y anóxicas en presencia de nitrato.....	88
4.2.2.6. Cultivos para la extracción de ARN	88
4.2.3. Obtención de fracciones solubles (citosol) y de membranas de <i>B. diazoefficiens</i>	88
4.3. Métodos analíticos.....	89
4.3.1. Determinación de actividad óxido nítrico reductasa.....	89
4.3.2. Determinación de actividad β -galactosidasa	90
4.3.3. Determinación de concentración de proteína	92
4.3.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS)	92
4.3.5. Transferencia a membranas de nitrocelulosa	93
4.3.6. Detección de citocromos tipo <i>c</i>	94
4.3.7. Ensayo de inmunodetección (Western-Blot)	94
4.3.8. Visualización de proteínas en geles de poliacrilamida con Azul de Coomassie	95
4.4. Métodos de Biología Molecular	95
4.4.1. Obtención de ADN total de <i>B. diazoefficiens</i>	95
4.4.1.1. Lisados por calor	95
4.4.1.2. Método comercial	95
4.4.2. Obtención de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	96
4.4.2.1. Método TENS.....	96

4.4.2.2. Métodos comerciales	97
4.4.2.2.1. “Minipreps”	97
4.4.2.2.2. “Midipreps”	98
4.4.3. Obtención de ADN plasmídico de <i>B. diazoefficiens</i>	99
4.4.4. Aislamiento de ARN total de células de <i>B. diazoefficiens</i>	100
4.4.5. Determinación de la concentración de ADN y ARN	101
4.4.6. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción.....	102
4.4.7. Amplificación de ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	104
4.4.8. Mutación puntual dirigida (“QuikChange”)	105
4.4.9. Electroforesis de ADN y ARN en geles de agarosa.....	106
4.4.10. Purificación de fragmentos de PCR.....	107
4.4.10.1. A partir de la reacción de PCR	107
4.4.11. A partir de geles de agarosa	108
4.4.12. Secuenciación de ADN	108
4.4.13. Síntesis de fragmentos de ADN.....	109
4.4.14. Ligación de fragmentos de restricción en vectores de clonación	109
4.4.15. Transferencia de ADN a células de <i>E. coli</i>	109
4.4.15.1. Preparación de células competentes con RbCl.....	109
4.4.15.2. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	110
4.4.16. Transferencia de ADN a células de <i>B. diazoefficiens</i> mediante conjugación	111
4.4.17. Generación de cepas mutantes por delección en fase sin marcador	112
4.4.18. Tratamiento con ADNasa de muestras de ARN.....	113
4.4.19. Reverso transcripción	115
4.4.20. PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).....	116
4.4.21. Experimentos con “microarrays”	116
4.5. Sobre-expresión y purificación de proteínas	119

4.5.1. Sobre-expresión y purificación de la proteína NnrR mediante el empleo del sistema IMPACT (Intein-Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag).....	119
4.5.1.1. Inducción de las células para purificación a escala media	120
4.5.1.2. Fraccionamiento celular.....	120
4.5.1.3. Cromatografía de afinidad.....	120
4.5.1.4. Regeneración de columna.....	121
4.5.2. Sobre-expresión y purificación de la proteína FixK ₂ -His ₆	121
4.5.2.1. Inducción de las células para purificación a escala media	122
4.5.2.2. Fraccionamiento celular.....	122
4.5.2.3. Cromatografía de afinidad (sistema Ni-NTA).....	123
4.5.3. Filtración en gel (columnas PD-10)	124
4.5.4. Purificación de la ARN polimerasa nativa de <i>B. diazoefficiens</i>	124
4.6. Ensayos de transcripción e interacción proteína-ADN.....	127
4.6.1. Ensayo de transcripción <i>in vitro</i> específico de ronda múltiple (IVT).....	127
4.6.1.1. Preparación de ADN molde	127
4.6.1.2. Reacción de transcripción	130
4.6.1.3. Marcadores de ARN	131
4.6.1.4. Electroforesis en gel de secuenciación urea/acrilamida	132
4.6.1.5. IVT con UTP- ³ H (ensayo de transcripción general)	133
4.6.2. Resonancia de plasmón de superficie (Biacore).....	134
4.7. Caracterización molecular de la proteína NnrR.....	136
4.7.1. Titulación de NnrR con hemina.....	136
4.7.1.1. Preparación de solución de hemina	137
4.7.2. Reconstitución de NnrR con hemina	137

4.7.2.1. Unión del complejo NnrR:hemo ferroso a NO	138
4.8. Métodos Bioinformáticos	138
5. RESULTADOS	145
5.1. Chapter 1: Expanding the regulon of the <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> NnrR transcription factor: New insights into denitrification pathway	145
5.1.1. Abstract.....	145
5.1.2. Strains and plasmids construction	146
5.1.3. Global transcriptional profiling of the <i>nnrR</i> mutant cultured in anoxic denitrifying conditions.....	147
5.1.4. NnrR and FixK ₂ are required for the anoxic induction of CycA.....	153
5.1.5. FixK ₂ directly controls <i>cycA</i> , <i>nnrR</i> and <i>nnrS</i> genes transcription	155
5.1.6. CycA is involved in nitrous oxide reductase activity	156
5.2. Chapter 2: FixK ₂ is the main transcriptional activator of <i>Bradyrhizobium diazoefficiens nosRZDFYLX</i> genes in response to low oxygen.....	161
5.2.1. Abstract.....	161
5.2.2. Plasmids and bacterial strains construction.....	161
5.2.3. Transcriptional organization of the <i>B. diazoefficiens nosRZDFYLX</i> genes.....	162
5.2.4. Low oxygen is the main signal which induces expression of the <i>nosRZDFYLX</i> operon	165
5.2.5. Selective regulation of <i>nosRZDFYLX</i> genes by FixK ₂ but not by NnrR	169
5.2.6. The <i>nosRZDFYLX</i> operon is a novel direct target of FixK ₂	173
5.3. Capítulo 3. Unravelling the molecular mechanism of the <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> NnrR transcription factor: Influence of heme in NO sensing.....	177

5.3.6.2.	Titulación de NnrR con hemina	191
5.3.6.3.	Reconstitución de NnrR con hemina	193
5.4.	Determinantes moleculares implicados en la interacción diferencial de las proteínas FixK₂ y NnrR con ADN.....	197
5.4.1.	Análisis comparativo de las cajas tipo FixK ₂ presentes en los promotores de las dianas directas de esta proteína	197
5.4.2.	Estudio <i>in vitro</i> de la interacción de FixK ₂ con derivados de las cajas FixK ₂ y NnrR presentes en los promotores de los genes <i>fixNOQP</i> y <i>norCBQD</i> , respectivamente	200
5.4.2.1.	Efecto de la mutación en las posiciones 4, 10 y 11 en la interacción FixK ₂ -ADN por RPS.....	200
5.4.2.2.	Efecto de la mutación en las posiciones 4, 10 y 11 en la activación de la transcripción mediada por FixK ₂	204
5.4.2.2.1.	Mutagénesis de la caja FixK ₂ de <i>fixNOQP</i>	204
5.4.2.2.2.	Mutagénesis de la caja NnrR de <i>norCBQD</i>	206
5.4.2.2.3.	Construcción de plásmidos empleados en ensayos de IVT. 206	
5.4.2.2.4.	Ensayos de IVT en presencia de FixK ₂ de los derivados de los promotores de <i>fixNOQP</i> y <i>norCBQD</i>	207
5.4.3.	Estudio <i>in vivo</i> del efecto de las mutaciones de las cajas FixK ₂ y NnrR en la expresión de los genes <i>fixNOQP</i> y <i>norCBQD</i> , respectivamente	210
5.4.3.1.	Construcción de fusiones <i>fixN-lacZ</i> y <i>norC-lacZ</i> con mutaciones en las cajas FixK ₂ y NnrR	210
5.4.3.2.	Determinación de la expresión de los derivados de las fusiones <i>fixN-lacZ</i> y <i>norC-lacZ</i> en células de <i>B. diazoefficiens</i>	211
6.	DISCUSION	215
7.	CONCLUSIONES.....	233
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	237

9. ANEXOS.....	255
9.1. Supplementary material Chapter 5.1.....	255
9.2. Abreviaturas y símbolos.....	263
9.3. Abreviaturas de especies	267
9.4. Índice de figuras	268
9.5. Índice de tablas.....	270

1

RESUMEN/
SUMMARY

1. RESUMEN / SUMMARY

El nitrógeno (N) es un componente esencial de los seres vivos y el elemento más abundante en la atmósfera (alrededor del 78%), sin embargo, el N biológicamente disponible es un factor limitante tanto para el crecimiento de los organismos vivos como para la producción de biomasa. Dentro del ciclo del N, la fijación biológica del nitrógeno molecular (N_2) constituye el proceso más importante de aporte de N a los ecosistemas, mientras que la desnitrificación es el proceso biológico mayormente implicado en devolver N_2 a la atmósfera.

La desnitrificación consiste en una forma de respiración que llevan a cabo bacterias, arqueas y hongos bajo condiciones limitantes de oxígeno, en la cual tiene lugar la reducción de nitrato (NO_3^-) o nitrito (NO_2^-) hasta N_2 . Durante este proceso se generan como intermediarios el óxido nítrico (NO) y el óxido nitroso (N_2O). El NO es un gas citotóxico a altas concentraciones, aunque a bajas, actúa como molécula señal. Por otro lado, el N_2O es un potente gas de efecto invernadero. Tanto el NO como el N_2O juegan un papel negativo en la atmósfera, contribuyendo a la destrucción de la capa de ozono.

El proceso de desnitrificación consiste en cuatro reacciones enzimáticas secuenciales catalizadas por las enzimas nitrato-, nitrito-, óxido nítrico- y óxido nitroso reductasa, las cuales están codificadas por los genes *nar/nap*, *nir*, *nor* y *nos*, respectivamente (revisado en van Spanning et al., 2007; Kraft et al., 2011; Richardson et al., 2011 y Torres et al., 2016). La desnitrificación está ampliamente distribuida en el dominio *Bacteria* y la mayoría de los desnitrificantes se encuentran en el filo *Proteobacteria* (Shapleigh, 2006). En ese filo se encuentra la α -proteobacteria Gram-negativa, *Bradyrhizobium diazoefficiens* (Delamuta et al., 2013) que pertenece al orden *Rhizobiales*. Esta bacteria es capaz de establecer simbiosis con plantas de soja, dando lugar a la formación en sus raíces de unas estructuras especializadas, los nódulos, en cuyo interior tiene lugar el proceso de fijación de N_2 . En el nódulo, los rizobios invaden el citoplasma de las células infectadas y allí se diferencian en bacteroides, los cuales reducen el N_2 a amonio, por acción de la enzima nitrogenasa. Además de fijar N_2 , *B. diazoefficiens* es capaz de desnitrificar, tanto en vida libre como en simbiosis, mediante la acción secuencial de las enzimas nitrato reductasa periplásmica (Nap), nitrito reductasa de Cu (NirK),

óxido nítrico reductasa (cNor) y óxido nitroso reductasa (Nos), codificadas por los genes *napEDABC*, *nirK*, *norCBQD*, y *nosRZDFYLX*, respectivamente (revisado en Bedmar et al., 2005, 2013).

En *B. diazoefficiens* existe una compleja red de regulación formada por dos cascadas interconectadas entre sí, FixLJ-FixK₂-NnrR y RegSR-NifA, que controla la expresión de genes implicados en el metabolismo microóxico de esta bacteria tanto en vida libre como en simbiosis (revisado en Fernández et al., 2016 y Torres et al., 2016). La cascada de regulación FixLJ-FixK₂-NnrR se activa a una concentración $\leq 5\%$ O₂, señal que es detectada y transducida por el sistema de regulación de dos componentes FixLJ que activa la transcripción de *fixK₂*. La proteína FixK₂ juega un papel clave en esta red de regulación, ya que no sólo constituye el nexo de unión con la cascada RegSR-NifA, sino que está implicada en la activación de aproximadamente 300 genes necesarios para el metabolismo microóxico, anóxico y simbiótico de esta bacteria (Mesa et al., 2008). Entre los genes regulados por FixK₂ se encuentra el operón *fixNOQP* que codifica la oxidasa terminal *cbb₃* de alta afinidad por oxígeno, esencial para la respiración microóxica del bacteroide, o genes que codifican otros reguladores (*p. ejem. rpoN₁, fixK₁ y nnrR*) (Mesa et al., 2008). El gen *nnrR* codifica la proteína NnrR, un regulador transcripcional que induce la expresión de los genes de la desnitrificación en respuesta a óxidos de nitrógeno (NO_x) (Mesa et al., 2003; Bueno et al., 2017; Torres et al., 2017).

FixK₂ y NnrR pertenecen a la familia de proteínas de tipo CRP/FNR, factores transcripcionales bacterianos que responden a un amplio rango de señales intracelulares y medioambientales (revisado en Körner et al., 2003). Estas proteínas constan de 4 dominios funcionales: un dominio de unión a efector en la región amino terminal, una estructura de lámina- β que se une a la ARN polimerasa, una hélice α involucrada en la dimerización y un dominio de unión a ADN. Este dominio interacciona con una secuencia conservada de ADN, la cual se localiza en la región promotora de los genes regulados por estas proteínas. En el caso concreto de FixK₂, la secuencia de reconocimiento de ADN es un palíndromo de 14 pares de bases (TTGA/C-N₆-T/GCAA; caja FixK₂) (Bonnet et al., 2013).

NnrR pertenece al clado NnrR que engloba a proteínas que modulan la expresión de los genes *nir* y *nor*, con el objeto de mantener la concentración de

nitrito y NO por debajo de niveles citotóxicos (revisado en Körner et al., 2003). Otro subgrupo de proteínas CRP/FNR lo constituyen las de tipo DNR. Estudios espectroscópicos de DNR de *Pseudomonas aeruginosa* revelaron que esta proteína es capaz de unirse a NO como complejo DNR-hemo ferroso (Giardina et al., 2008). También se ha demostrado un mecanismo similar para la proteína DnrF de la bacteria marina *Dinoroseobacter shibae* (Ebert et al., 2017).

En la región promotora de los genes de la desnitrificación y del gen *nnrR* de *B. diazoefficiens* existe una secuencia palindrómica similar a la caja FixK₂, a la que *a priori*, podrían unirse FixK₂ y/o NnrR. De hecho, la proteína FixK₂ es capaz de activar *in vitro* la transcripción de los genes *napEDABC* y *nirK*, pero no la de los genes *norCBQD* (Bueno et al., 2017). Por el contrario, mediante calorimetría isotérmica de titulación, se observó que NnrR purificada en condiciones óxicas es capaz de interaccionar con el palíndromo presente en la región promotora de los genes *norCBQD*, exclusivamente cuando se aplicaron condiciones anóxicas a los experimentos (Bueno et al., 2017). Sin embargo, independientemente de las condiciones experimentales, NnrR no interaccionó con las secuencias palindrómicas presentes en las regiones 5' de los genes *napEDABC* y *nirK*.

Resultados previos del Grupo de Investigación del Metabolismo del Nitrógeno (EEZ-CSIC, Granada) habían demostrado la implicación de la proteína NnrR en el control directo o indirecto de los genes *napEDABC*, *nirK*, *norCBQD* y *nosRZDFYLX* (Mesa et al., 2003; Robles et al., 2006; Bueno et al., 2017 y Torres et al., 2017). Sin embargo, no se conocían otros genes implicados en el proceso de desnitrificación bajo el control de la proteína NnrR. En esta Tesis Doctoral se han identificado más de 170 genes simultáneamente inducidos en condiciones desnitrificantes y bajo el control positivo de NnrR. Entre ellos, se identificó el gen *cycA*, que codifica el citocromo soluble *c*₅₅₀, previamente descrito como donador de electrones intermediario entre el complejo de membrana *bc*₁ y la NirK. En este trabajo, se ha podido demostrar también la implicación de CycA en la actividad de la enzima óxido nítrico reductasa (Nos). Cuando se profundizó en la regulación del gen *cycA*, además del control por NnrR, se observó un control por la proteína FixK₂ en condiciones de anoxia con nitrato, tanto a nivel transcripcional como traduccional. Es más, en ensayos de transcripción *in vitro* se pudo demostrar que la

activación de la transcripción del gen *cycA* está controlada de forma directa por FixK₂. Igualmente, en este trabajo se han identificado *nnrR* y *nnrS*, un gen localizado de forma divergente a *nnrR*, como dianas directas de FixK₂.

En el regulón de NnrR también se han identificado los genes *nosRZDFYLX* de cuya regulación se conoce muy poco. Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral indicaron que estos genes constituyen una unidad transcripcional única, cuya expresión depende principalmente del promotor presente en la región 5' del gen *nosR*, donde se identificaron dos inicios de la transcripción, TSS₁ y TSS₂ a 84 y 57 nt del ATG, respectivamente. Como se ha comentado anteriormente, en la región promotora de los genes *nosRZDFYLX* existe una secuencia palindrómica imperfecta que es parecida a la caja consenso de FixK₂. Estudios de actividad β-galactosidasa de una fusión transcripcional *nosR-lacZ* y de expresión y actividad de la enzima Nos han demostrado que las condiciones limitantes de oxígeno constituyen la principal señal que induce la expresión de estos genes, siendo la proteína FixK₂ la que controla y activa directamente la transcripción del operón *nosRZDFYLX in vitro*.

La caracterización bioinformática de la proteína NnrR en base a su secuencia aminoacídica y a la estructura resuelta de DNR de *P. aeruginosa* han permitido predecir una estructura secundaria, terciaria y cuaternaria que revela la presencia de los cuatro dominios típicos de las proteínas CRP/FNR, además de una cavidad hidrofóbica en la parte amino terminal, constituida por varios residuos de histidina que podrían actuar como ligandos de un posible cofactor.

Estudios *in vivo* llevados a cabo con el objeto de profundizar en el mecanismo molecular de NnrR revelaron que el NO es la molécula señal para la máxima inducción de los genes *norCBQD*, ya que sus niveles de expresión disminuyeron considerablemente cuando se cultivaron las células en presencia de un secuestrador de NO. Además, NnrR es capaz de regular a los genes *norCBQD* en respuesta a NO de manera independiente a FixK₂ de acuerdo a los resultados obtenidos en estudios de complementación de las cepas mutantes *nnrR* y *fixK₂* con el gen *nnrR* expresado *in trans* de forma constitutiva.

Para demostrar la posible implicación del hemo como cofactor de NnrR, se realizaron estudios de expresión de una fusión *norC-lacZ* en una cepa mutante

hemN₂, la cual está afectada en la síntesis de hemo. Los datos de actividad β -galactosidasa indicaron la dependencia de hemo para la inducción por NO de los genes *norCBQD*, lo cual sugiere que el hemo es un posible cofactor de NnrR.

La implicación del hemo como cofactor de NnrR también se estudió en ensayos *in vitro*. En primer lugar, se realizó una titulación de proteína NnrR recombinante con una solución de hemina en condiciones anóxicas, cuyos resultados proponen una unión entre NnrR y hemo con una estequiometría 1:1 (monómero NnrR:hemo). Además, el espectro UV-Vis de proteína NnrR reconstituida con hemo mostró un pico a 411 nm para la forma férrica y a 425 nm para el derivado reducido (ferroso), datos compatibles con las propiedades espectroscópicas de una unión NnrR-hemo. El complejo NnrR-hemo ferroso reaccionó con NO en condiciones anóxicas dando lugar al cambio del pico de 425 nm por 389 nm. De acuerdo con estos resultados, se puede proponer que el hemo es el cofactor más probable de NnrR que interviene en el mecanismo de detección de NO.

Finalmente, en esta Tesis se han identificado los determinantes moleculares de la interacción discriminatoria de las proteínas FixK₂ y NnrR con sus secuencias de reconocimiento (caja FixK₂, caja NnrR). El intercambio de una timina por una adenina en posición 11 de la caja FixK₂ presente en el promotor de los genes *fixNOQP* disminuyó, tanto la capacidad de interacción de FixK₂ con esta caja como la de activación de la transcripción de dichos genes *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, el intercambio inverso (timina en lugar de adenina) del nucleótido 11 en la caja NnrR presente en el promotor de los genes *norCBQD* resultó, a diferencia de lo observado con la caja NnrR genuina, en una interacción efectiva de la proteína FixK₂ con esta caja. Así mismo, dicha mutación permitió la activación de los genes *norCBQD* por FixK₂ y la inducción de su expresión en condiciones de limitación de oxígeno en ausencia de nitrato. Teniendo en cuenta que NnrR es capaz de unirse directamente a la caja genuina NnrR presente en el promotor de los genes *norCBQD*, se considera el nucleótido 11 un factor clave en la discriminación entre la interacción de FixK₂ y NnrR con ADN.

En conjunto, los resultados de esta Tesis Doctoral contribuyen a aumentar el conocimiento relacionado con la regulación de la desnitrificación en *B. diazoefficiens*, rizobio modelo para el estudio de dicho proceso. Concretamente, se

ha avanzado en el mecanismo molecular implicado en el control de la desnitrificación mediado por las proteínas FixK₂ y NnrR.

Summary

Nitrogen (N) is an essential component of living organisms and the most abundant element in the atmosphere (around 78%); however, biologically available N is a limiting factor for both, growth of living organisms as for biomass production. Within the N cycle, biological nitrogen (N₂) fixation is the most important process of N contribution to ecosystems, while denitrification is the biological process mostly involved in returning N₂ to the atmosphere.

Denitrification is an alternative form of respiration carried out by bacteria, archaea and fungi under oxygen-limiting conditions, in which nitrate (NO₃⁻) or nitrite (NO₂⁻) is reduced to N₂. During this process, nitric oxide (NO) and nitrous oxide (N₂O) are generated as intermediates. NO is a cytotoxic gas at high concentrations, although at low, it acts as a signal molecule. Besides, N₂O is a potent greenhouse gas. Both NO and N₂O play a negative role in the atmosphere, contributing to the ozone layer depletion.

The denitrification process consists of four sequential enzymatic reactions catalyzed by the enzymes nitrate-, nitrite-, nitric oxide- and nitrous oxide reductase, which are encoded by *nar/nap*, *nir*, *nor* and *nos* genes, respectively (reviewed in van Spanning et al, 2007; Kraft et al., 2011; Richardson et al., 2011; Torres et al., 2016). Denitrification is widely distributed in the domain *Bacteria* and most denitrifiers are found in the phylum *Proteobacteria* (Shapleigh, 2006). Within this phylum is the Gram-negative α -proteobacteria *Bradyrhizobium diazoefficiens* (Delamuta et al., 2013) that belongs to the order *Rhizobiales*. This bacterium is also able to establish a symbiotic interaction with soybeans, leading to the formation of plant root nodules where N₂ fixation takes place. In the nodule, rhizobia invade the cytoplasm of the infected cells and they differentiate into bacteroids, which reduce N₂ to ammonium, by the nitrogenase enzyme. In addition to fixing N₂, *B. diazoefficiens* is able to denitrify, both in free-living and symbiotic conditions, through the sequential action of the periplasmic nitrate reductase (Nap), Cu-type nitrite reductase (NirK), nitric oxide reductase (cNor) and nitrous oxide reductase (Nos) enzymes encoded by the

napEDABC, *nirK*, *norCBQD*, and *nosRZDFYLX* genes, respectively (reviewed in Bedmar et al., 2005, 2013).

In *B. diazoefficiens* a complex regulatory network comprised by two linked coordinated cascades, FixLJ-FixK₂-NnrR and RegSR-NifA, controls the expression of genes involved in the microoxic metabolism in this bacterium both in free-living and symbiotic conditions (reviewed in Fernández et al., 2016; Torres et al., 2016). The FixLJ-FixK₂-NnrR cascade is activated at a concentration $\leq 5\%$ O₂, which is detected and transduced by the two-component regulatory system FixLJ that activates the transcription of *fixK₂*. The FixK₂ protein plays a key role in this regulatory network, since it constitutes the link with the RegSR-NifA cascade, and is also involved in the activation of around 300 genes necessary for the microoxic, anoxic and symbiotic metabolism of this bacterium (Mesa et al., 2008). Among the genes regulated by FixK₂ are the *fixNOQP* operon that encodes the high-affinity terminal oxidase *cbb₃*, essential for microoxic bacteroidal respiration inside root nodules, or regulatory genes (eg *rpoN₁*, *fixK₁* and *nnrR*) (Mesa et al., 2008). The *nnrR* gene encodes the NnrR protein, a transcriptional regulator that induces the expression of denitrification genes in response to nitrogen oxides (NO_x) (Mesa et al., 2003; Bueno et al., 2017; Torres et al., 2017).

FixK₂ and NnrR belong to the CRP/FNR-type protein family, bacterial transcriptional factors that respond to a wide range of intracellular and environmental stimuli (reviewed by Körner et al., 2003). These proteins consist of 4 functional domains: an effector binding domain in the amino-terminal region, a β -sheet structure that interacts with the RNA polymerase, an α -helix involved in dimerization and a C-terminal DNA binding domain. This domain interacts with a conserved DNA sequence, which is located in the promoter region of regulated genes. In the case of FixK₂, the DNA recognition sequence is an imperfect 14-base pairs palindrome (TTGA/C-N₆-T/GCAA, FixK₂ box) (Bonnet et al., 2013).

NnrR belongs to the NnrR clade that comprises proteins that modulate the expression of the *nir* and *nor* genes, in order to keep nitrite and NO concentration below cytotoxic levels (reviewed in Körner et al., 2003). Another CRP/FNR-type protein subgroup is the DNR-type regulators. Spectroscopic studies of *Pseudomonas aeruginosa* DNR revealed that this protein is able to bind NO as a DNR-ferrous heme complex (Giardina et al., 2008). A similar mechanism has also been demonstrated

for the DnrF protein of the marine bacterium *Dinoroseobacter shibae* (Ebert et al., 2017).

In the promoter region of the denitrification genes and *nnrR* gene of *B. diazoefficiens*, there is a palindromic sequence similar to the FixK₂ box to which, both FixK₂ and NnrR could bind. In fact, FixK₂ is able to activate *in vitro* transcription of the *napEDABC* and *nirK* genes, but not of the *norCBQD* genes (Bueno et al., 2017). By contrast, by isothermal titration calorimetry, oxically NnrR purified was able to interact with the palindrome present at the *norCBQD* genes promoter, exclusively when anoxic conditions were applied to the experiments (Bueno et al., 2017). However, independently of the experimental conditions, NnrR did not interact with the palindromic sequences present within the 5' regions of the *napEDABC* and *nirK* genes.

The Nitrogen Metabolism Research Group (EEZ-CSIC, Granada) has previously shown the involvement of NnrR in the direct or indirect control of *napEDABC*, *nirK*, *norCBQD* and *nosRZDFYLX* genes (Mesa et al., 2003; Robles et al., 2006; Bueno et al., 2017 and Torres et al., 2017). However, the identification of other genes under NnrR control involved in the denitrification process has not yet been unraveled. In this Doctoral Thesis, we found that more than 170 genes were simultaneously induced by denitrifying conditions and under the positive control of NnrR. Among them, we identified *cycA* which codes for the soluble cytochrome *c*₅₅₀, previously described as an intermediate electron donor between the membrane complex *bc*₁ and NirK. In this work, it was also demonstrated the involvement of CycA in the activity of the nitrous oxide reductase (Nos) enzyme. Apart from NnrR control, expression of *cycA* is also regulated by FixK₂ under denitrifying conditions, both at transcription and protein levels. Moreover, *in vitro* transcription assays demonstrated that *cycA* is directly activated by FixK₂. These assays also allowed to identify *nnrR* and its divergently oriented gene *nnrS* as direct targets for FixK₂.

The *nosRZDFYLX* gene cluster encoding the Nos, was also identified as a member of the NnrR regulon. These genes constitute a single transcriptional unit, whose expression mainly depends on a promoter present in the 5' region of the *nosR* gene, where two transcription start sites, TSS₁ and TSS₂ located respectively at 84 and 57 nucleotides upstream of the putative ATG were identified. In line with previous results, the *nosR* promoter harbours an imperfect palindromic sequence

with similarity to the consensus FixK₂ box. β -galactosidase activity from a *nosR-lacZ* transcriptional fusion and Nos expression and activity showed that oxygen-limiting conditions (microoxia) is the main signal that induces the expression of *nosRZDFYLX* genes, being FixK₂ the main regulator involved in such control. Further, purified FixK₂ directly activated the transcription of the *nosRZDFYLX* operon *in vitro*.

Bioinformatics characterization of NnrR based on its primary sequence and the *P. aeruginosa* DNR structure allowed us to make predictions of its secondary, tertiary and quaternary structure. These models revealed, apart from the four typical domains of the CRP/FNR proteins, an N-terminal hydrophobic cavity constituted by several histidine residues that could act as ligands of a possible cofactor.

In order to investigate the molecular mechanism of NnrR we carried out *in vivo* studies that revealed that NO is the signal molecule for the maximum induction of the *norCBQD* genes, since their expression levels decreased considerably when the cells were cultured in the presence of an NO scavenger. In addition, we demonstrated that NnrR is able to regulate the *norCBQD* genes in response to NO independently of FixK₂ based on experiments performed with *nnrR* and *fixK₂* mutant strains complemented *in trans* with a constitutively expressed *nnrR* gene.

The putative involvement of heme as a cofactor for NnrR *in vivo* was addressed by analyzing the expression of a *norC-lacZ* fusion in a *hemN₂* mutant strain, which is affected in heme biosynthesis. β -galactosidase activity values pointed out a heme-dependent induction in response to NO of the *norCBQD* genes, suggesting that heme could be the cofactor for NnrR. This inference was also studied *in vitro*. Firstly, a titration of recombinant NnrR with a solution of hemin was carried out under anoxic conditions. These experiments showed that NnrR binds heme with a 1:1 stoichiometry (monomer NnrR:heme). Secondly, the UV-Vis spectrum of heme-reconstituted NnrR protein showed a peak at 411 nm for the ferric form and a peak at 425 nm for the reduced (ferrous) derivative, which is compatible with the spectroscopic properties of a NnrR-heme complex. Further, the ferrous NnrR-heme complex reacted with NO under anoxic conditions, resulting in a change of the peak from 425 nm to 389 nm. Taking together, we propose that heme is likely the cofactor for NnrR-mediated NO sensing mechanism in *B. diazoefficiens*.

In the last section of this Thesis, we studied the molecular determinants for the discriminatory interaction of the FixK₂ and NnrR proteins with their cognate recognition sequences (FixK₂ box, NnrR box). The exchange of a T for an A at position eleven within the FixK₂ box at the *fixNOQP* promoter impaired both FixK₂-DNA interaction ability and *in vitro* and *in vivo* activation mediated by FixK₂ of the *fixNOQP* genes. Conversely, in the NnrR box at the *norCBQD* promoter, the exchange of an A for a T at position eleven resulted in an effective FixK₂-NnrR box interaction, unlike to that observed with the genuine NnrR box. Likewise, this T *versus* A exchange within the NnrR box allowed FixK₂-mediated activation *in vitro* of the *norCBQD* genes and induction of their expression under microoxic conditions in the absence of nitrate. Considering that NnrR is capable to bind the genuine NnrR box, the nucleotide eleven is considered the most prominent discriminatory determinant for FixK₂ and NnrR interaction with their target DNA.

Altogether, the results of this Doctoral Thesis contribute to expand the understanding of the regulation of denitrification in *B. diazoefficiens*, the model to study this process in rhizobial species. A special focus was made on the molecular mechanism unraveling the control of denitrification mediated by FixK₂ and NnrR.

2



INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Ciclo del nitrógeno

El nitrógeno (N) es el elemento más abundante en la atmósfera y componente esencial de proteínas, ácidos nucleicos y numerosos cofactores. Está presente en el medio ambiente en diferentes estados de oxidación y en una amplia variedad de compuestos químicos, como son: amonio (NH_4^+), hidroxilamida (NH_2OH), nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O) y nitrógeno molecular (N_2) (Richardson y Watmough, 1999). El crecimiento de todos los organismos depende de la disponibilidad de nitrógeno, y la ausencia de nitrógeno biológicamente disponible es a menudo un factor limitante para el crecimiento y la producción de biomasa.

La mayor reserva de nitrógeno de la tierra es la atmósfera, donde aproximadamente el 78% es N_2 , sin embargo, no puede ser usado por la mayoría de los organismos ya que el tripe enlace existente entre los dos átomos de N hace a la molécula prácticamente inerte. Sin embargo, el N_2 atmosférico se puede convertir en nitrógeno biológicamente disponible siendo los microorganismos los principalmente implicados en este proceso, los cuales también participan en los demás procesos que constituyen el ciclo del nitrógeno (revisado por Martínez-Espinosa et al., 2011). La interconversión de las diferentes especies de nitrógeno, en sus diferentes estados oxidados y reducidos, constituye el ciclo biogeoquímico del nitrógeno (N) (Figura 2.1), que representa uno de los más importantes ciclos presente en los ecosistemas terrestres (Martínez-Espinosa et al., 2011). Sin embargo, las actividades humanas, como es el uso de fertilizantes nitrogenados en la agricultura, las combustiones del petróleo, la gestión de aguas residuales y los procesos industriales provocan el desequilibrio del ciclo del N lo que da lugar a un importante impacto medioambiental (Canfield et al., 2010).

Las reacciones que constituyen el ciclo del N pueden ser de carácter asimilativo o estar implicadas en rutas respiratorias para la conservación de energía. Las reacciones asimilativas incluyen, fijación de nitrógeno (conversión de N_2 a amonio, tanto en condiciones de vida libre como simbióticas) (Newton, 2007) y asimilación de nitrato (reducción de nitrato a amonio) (Figura 2.1; Moreno-Vivián

y Flores, 2007). Ambas rutas producen amonio que es incorporado a los esqueletos carbonados para el crecimiento de los organismos.

La fijación biológica de N_2 atmosférico es el proceso más importante de entrada de N en los ecosistemas, constituyendo el 60% del total. Es llevada a cabo por microorganismos diazotrofos, tanto bacterias como arqueas, los cuales poseen la enzima nitrogenasa, cuya actividad tiene lugar en ausencia de oxígeno y requiere elevadas cantidades de energía (Newton, 2007). La invención del proceso Haber-Bosch ha aumentado la presencia de nitrógeno (N) en los suelos agrícolas debido a la aplicación de fertilizantes nitrogenados sintéticos en la denominada "revolución verde".

A parte de la reducción de nitrato a amonio, existen otros procesos de oxidación como es el caso de la nitrificación que consiste en la oxidación del amonio (NH_4) a nitrito (NO_2^-) y de NO_2^- a nitrato (NO_3^-) (Figura 2.1). Durante décadas, se pensó que la oxidación de NH_4 y NO_2^- era llevada a cabo por separado por bacterias o arqueas oxidantes de NH_4 (BOA y AOA), y por bacterias oxidantes de nitrito (BON). Sin embargo, estudios recientes han demostrado la existencia de oxidantes completos de NH_4 a NO_3^- (comammox) (Figura 2.1) en el género *Nitrospira* (Kits et al., 2017). Otro proceso de oxidación de amonio es el que ocurre en condiciones anaeróbicas que consiste en la oxidación anaeróbica del amonio (anammox) que

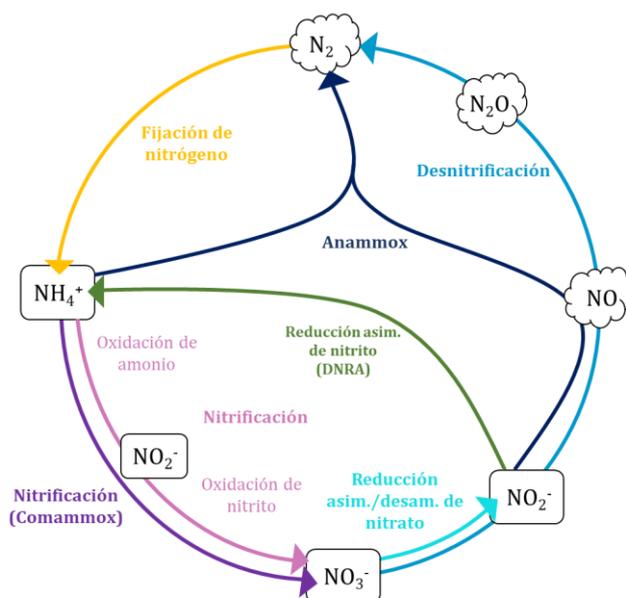


Figura 2.1. Ilustración esquemática del ciclo biogeoquímico del nitrógeno. Adaptada de Daims et al., 2016. asim., asimilatoria, disam., desasimilatoria. DNRA, reducción desasimilativa de nitrito a amonio. Anammox, oxidación anaeróbica del amonio.

produce N_2 por reducción de nitrito. (Figura 2.1; Strous et al., 1999 y Jetten et al., 2009). El amonio es incorporado al ciclo del N por la fertilización directa o por el proceso de amonificación que llevan a cabo los microorganismos del suelo los cuales convierten compuestos nitrogenados orgánicos en amonio. Por último, en condiciones limitantes de oxígeno también tiene lugar la reducción de nitrato a N_2 u otros gases intermediarios como son el óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N_2O) en el proceso de desnitrificación (ver apartado 2.1.2; Figura 2.1; Zumft, 1997).

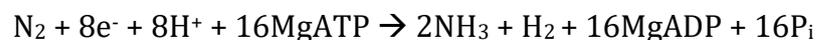
2.1.1. Fijación simbiótica de nitrógeno

La fijación simbiótica del N_2 (FSN) constituye uno de los procesos biológicos más importantes de entrada a la biosfera de nitrógeno biodisponible, ya que inyecta aproximadamente 122 Tg de nitrógeno cada año, de las cuales 50-70 millones de toneladas provienen de los sistemas agrícolas (Herridge et al., 2008). Esa entrada de N a los ecosistemas agrícolas disminuye la necesidad de aporte de fertilizantes nitrogenados sintéticos, favoreciendo así el equilibrio natural del ciclo del nitrógeno y contribuyendo al desarrollo de una agricultura sostenible y respetuosa con el medio ambiente. En la FSN, la reducción de N_2 a amonio ocurre en el interior de unas estructuras especializadas existentes en las raíces de las leguminosas (a veces también en los tallos), llamadas nódulos. La formación de los nódulos es el resultado de una compleja interacción entre la planta hospedadora y la bacteria (revisado por Poole et al., 2018). Una de las interacciones planta-microorganismo mejor estudiadas que llevan a cabo la FSN es la simbiosis entre rizobios y leguminosas. Filogenéticamente los rizobios se clasifican dentro de los grupos de α y β -proteobacterias, y engloban a géneros como: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium*. Sin embargo, también existen otras relaciones simbióticas que contribuyen, aunque en muy bajo porcentaje, a la fijación de nitrógeno a los ecosistemas, como es el caso de las asociaciones entre plantas no leguminosas con bacterias del género *Frankia*, o con cianobacterias (Herridge et al., 2008). Dentro de las leguminosas se incluyen una gran diversidad de especies muy importantes para la nutrición humana y animal, como: alubias, lentejas, cacahuetes, alfalfa, trébol, guisante y soja. Los cultivos de soja son de los más extendidos globalmente y la leguminosa más cultivada actualmente, contribuyendo su cultivo a

la fijación del 77% del N₂ total fijado en suelo agrícola y el 11% del fijado biológicamente en el planeta (Herridge et al., 2008).

Para el establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa, las bacterias deben competir por la infección de las raíces de las plantas e iniciar un diálogo de señalización con la leguminosa hospedadora que permita la formación del nódulo. La forma más común de infección implica la entrada del rizobio a través de un pelo radicular, dando lugar a un cordón de infección, el cual le permite establecerse en la planta. Los rizobios invaden el citoplasma de las células infectadas y allí se diferencian en bacteroides que se rodean de una membrana derivada de la planta y forman el simbiosoma. En esta simbiosis, la célula vegetal proporciona carbono y energía en forma de ácidos dicarboxílicos a los bacteroides, los cuales reducen el N₂ a amonio, por acción de la enzima nitrogenasa, que lo utiliza la planta para sintetizar aminoácidos (ver revisiones Udvardi y Poole, 2013; Sulieman y Tran, 2014 y Poole et al., 2018).

La nitrogenasa es una compleja metaloenzima que contiene grupos Fe-S y lleva a cabo la siguiente reacción:



Existen tres tipos de nitrogenasas, que principalmente se diferencian en la presencia o ausencia de un heterometal en su centro activo [Molibdeno (Mo) o Vanadio (V)]. Las Mo-dependientes (Nif) son las más comunes mientras que las V-dependientes (Vnf) o independientes de metal, también llamadas Fe-dependientes, son a menudo nitrogenasas alternativas (revisado por Mus et al., 2019). Las Nif son las que se encuentran en los rizobios y son las mejores caracterizadas. Consisten en dos componentes proteicos separados, denominados MoFe-proteína. Un componente es el heterotetrámero NifDK que recibe los electrones desde la Fe-proteína, la cual es un homodímero formado por NifH (revisado por Eady et al., 2016).

Los grupos Fe-S de la nitrogenasa la convierten en una enzima con una alta sensibilidad a O₂, inactivándose a concentraciones superiores a 30 nM, una concentración de O₂ muy por debajo de la atmosférica (250 μM). Es por ello clave la protección de la nitrogenasa frente al oxígeno, y para ello se han desarrollado tres

mecanismos en los nódulos de las leguminosas. Por un lado, la existencia en el córtex del nódulo de una barrera de resistencia a la difusión de O₂, la cual es variable modificando su grosor dependiendo de las condiciones ambientales y está formada por una o varias capas de células cuyos espacios intercelulares están rellenos de glicoproteínas (revisado por Minchin et al., 2008). El poco oxígeno que atraviesa la barrera de difusión es capturado y transportado hacia los bacteroides por la leghemoglobina (Lb), proteína monomérica con alta afinidad por O₂ que contienen un grupo hemo, gracias al cual captan una molécula de O₂ (Downie, 2005). El tercer mecanismo es la síntesis en los bacteroides de la oxidasa terminal *cbb₃* con alta afinidad por O₂, que está codificada por los genes *fixNOQP* del bacteroide y permite la respiración microaeróbica durante la fijación de N₂, generando así la energía necesaria para la actividad de la nitrogenasa (Delgado et al., 1989).

Bradyrhizobium diazoefficiens, es una α -proteobacteria del suelo capaz de vivir tanto en vida libre como en simbiosis con leguminosas, principalmente *Glicine max* (soja), aunque también puede nodular a *Cajanus cajan* (guandú) (Alaswad et al., 2019), *Macroptilium atropurpureum* (siratro), *Vigna unguiculata* (caupí) y *Vigna radiata* (soja verde) (Gottfert et al., 1990). *B. diazoefficiens*, es el rizobio más utilizado actualmente como bioinoculante comercial para cultivos de soja (Barros-Carvalho et al., 2019). Además, ha sido ampliamente estudiado como sistema modelo en el estudio de la biología molecular, fisiología y ecología de rizobios. El genoma de *B. diazoefficiens* USDA 110 [designada hasta 2013 como *B. japonicum* USDA110 (Delamuta et al., 2013)] consta de un único cromosoma circular de 9,1 millones de pares de bases de longitud, no posee plásmidos, aunque presenta una región de 410 kb donde se concentran genes relacionados con la fijación biológica del N₂, denominada isla simbiótica (Kaneko et al., 2002). Es destacable, que los estudios más recientes sobre perfiles génicos y genómicos de *B. diazoefficiens* se han realizado sobre una cepa derivada de USDA 110, con resistencia espontánea a espectinomicina, *B. diazoefficiens* 110*spc4* (Regensburger y Hennecke, 1983). El genoma de este derivado ha sido recientemente secuenciado, lo que ha revelado una deleción de \approx 202 kb conteniendo 223 genes, comparado con el genoma de la cepa USDA 110. Sin embargo, la cepa delecionada no mostró cambios fenotípicos significativos durante la simbiosis con varias plantas hospedadoras (Fernández et al., 2019).

2.1.2. Desnitrificación

El nitrógeno es introducido en la biosfera por la fijación biológica y química de nitrógeno molecular (N_2) y devuelto a la atmósfera, principalmente por el proceso de la desnitrificación, siendo este el mayor proceso biológico a través del cual las formas de nitrógeno oxidadas se convierten en N_2 . La reducción del NO_3^- o NO_2^- a formas nitrogenadas no útiles para los cultivos como N_2O , NO o N_2 , representa un problema en la agricultura porque contribuye a disminuir la efectividad de los fertilizantes químicos. No obstante, esta eliminación de nitrato y nitrito es vital en el tratamiento de aguas residuales y contaminadas, ya que la presencia de estos compuestos nitrogenados en los ecosistemas acuáticos provoca problemas de proliferación de algas como la eutrofización. El NO que se genera como intermediario durante este proceso es un gas citotóxico a altas concentraciones (micromoles), aunque a bajas concentraciones (nanomoles) actúa como molécula señal que desencadena la activación de genes específicos en bacterias, plantas y animales, además de participar en mecanismos de defensa frente a patógenos en eucariotas (Toledo y Augusto, 2012). El NO juega además un papel importante en la atmósfera al influir en la destrucción del ozono y, por lo tanto, en la capacidad oxidante de la atmósfera. Además, contribuye por sus productos de oxidación a la formación de lluvia ácida. El N_2O es un potente gas de efecto invernadero (GEI) y una de las principales causas del agotamiento de la capa de ozono con una vida útil en la atmósfera de 114 años y un potencial de calentamiento 300 veces mayor en comparación con el del CO_2 , debido a su capacidad radiativa (Panel Intergubernamental sobre Cambio Climático, IPCC, 2014).

Los procariotas, principalmente eubacterias, son los únicos capaces de usar óxidos de nitrógeno solubles, como son el nitrato (NO_3^-) y el nitrito (NO_2^-) como aceptores finales de electrones en presencia de bajo oxígeno. Por lo tanto, se entiende como desnitrificación a una forma de respiración bacteriana en condiciones limitantes de oxígeno, donde se lleva a cabo la reducción desasimilatoria de nitrato o nitrito a nitrógeno molecular, generando como intermediarios óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N_2O) (Figura 2.2) (Zumft, 1997). La reducción secuencial de los diferentes óxidos de nitrógeno tiene lugar entre el periplasma y el citoplasma bacteriano. El transporte electrónico a las enzimas

implicadas en el proceso da lugar a la generación de una fuerza protón motriz en la membrana de la célula, que desencadena la síntesis de ATP, lo que permite la supervivencia y el crecimiento de la bacteria en condiciones microaeróbicas y anaeróbicas (revisado por Zumft, 1997; van Spanning et al., 2007; Richardson, 2011; Kraft et al., 2011; Torres et al., 2016).

La distribución de la desnitrificación entre los procariotas no sigue un patrón definido, pero se encuentra extendida por todo el dominio *Bacteria*, siendo dominante dentro del phylum *Proteobacteria* (Shapleigh, 2006). Sin embargo, se ha evidenciado que algunas arqueas (Treusch et al., 2005) y hongos (Takaya, 2002, Prendergast-Miller et al., 2011) también desnitrifican. La mayoría de los estudios sobre desnitrificación se han centrado en bacterias Gram-negativas que ocupan nichos terrestres, usando la α -proteobacteria *Paracoccus denitrificans* y las γ -proteobacterias *Pseudomonas aeruginosa* y *stutzeri* como organismos modelos (revisado por Zumft, 1997; van Spanning et al., 2007; Richardson, 2011; Kraft et al., 2011; Torres et al., 2016).

La desnitrificación requiere cuatro reacciones enzimáticas independientes para llevar a cabo la reducción completa de NO_3^- a N_2 , catalizadas por las enzimas nitrato reductasa periplásmica (Nap) o de membrana (Nar), nitrito reductasa (NirK o NirS), óxido nítrico reductasa (cNor, qNor o Cu_ANor) y óxido nitroso reductasa (Nos), que están codificadas por los genes *nap/nar*, *nirK/nirS*, *nor* y *nos*, respectivamente (Figura 2.2).

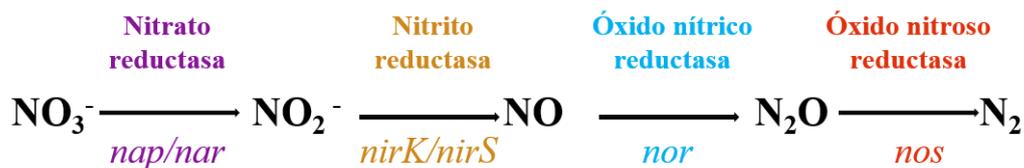


Figura 2.2. Secuencia de etapas enzimáticas que constituyen el proceso de desnitrificación. Compuestos, enzimas y genes implicados en el proceso.

Las nitrato reductasas catalizan la reducción de NO_3^- a NO_2^- y todas ellas pertenecen a la familia de las molibdopterinas oxidoreductasas. Existen tres tipos de NO_3^- reductasas diferentes en bacterias desnitrificantes: la nitrato reductasa citoplásmica asimilativa (Nas), la nitrato reductasa respiratoria de membrana (Nar) y la nitrato periplásmica desasimilativa (Nap). Respecto a Nap, esta se emplea con

finas respiratorias para promover la desnitrificación o como sumidero de electrones en la disipación del exceso de poder reductor para mantener el balance redox. Estas enzimas han sido estudiadas a nivel bioquímico y molecular, y reciben los electrones del pool de ubiquinonas (revisado por González et al., 2006; Potter et al., 2001; Richardson, 2011; Richardson et al., 2007; Kraft et al., 2011; Simon y Klotz, 2013, Gonzalez et al., 2017).

La Nar es un complejo enzimático trimérico (NarGHI) de membrana, ampliamente estudiado en *Escherichia coli* y se expresa únicamente en condiciones de limitación de oxígeno. La subunidad NarG posee 140 kDa, se orienta hacia el citoplasma y contiene en el sitio activo un cofactor de molibdeno o factor Mo-bis-MGD, en el cual un átomo de molibdeno está unido a un dinucleótido de molibdenopterina guanina. NarI es la subunidad que ancla la enzima a la membrana, recibe electrones del pool de quinonas que se encuentra en la membrana. Los electrones son transferidos vía dos hemos *b* a NarH, la subunidad de 60 kDa que une NarI con NarG (Blasco et al., 1990). A través de NarH, los electrones son transportados vía 4 grupos Fe-S. NarG también contiene un grupo Fe-S que recibe electrones desde NarH y los transfiere al sitio activo de la enzima. (Figura 2.3). NarGHI es codificada por los genes *narK1K2GHIJ*, los cuales también son responsables de la síntesis de NarJ, una proteína de 26,5 kDa, implicada en la maduración del complejo. Estudios recientes han demostrado en *P. denitrificans*, que NarJ sirve no sólo como chaperona de la Nar, sino también de la nitrato reductasa asimilativa (NasC) (Pinchbeck et al., 2019). Los genes *narK1K2* codifican para transportadores transmembrana que pertenecen a la superfamilia facilitadora principal (MFS) de proteínas, formando una subfamilia distinta conocida como NarK. NarK₁ es un simportador NO₃⁻/H⁺ y NarK₂ un antiportador NO₃⁻/NO₂⁻ (Goddard et al., 2008). Recientemente, se ha demostrado mediante ensayos de complementación en *P. denitrificans* que el dominio similar a NarK₁ de una proteína fusionada NarK₁-NarK₂ funciona básicamente como transportador de nitrato, mientras que el dominio similar a NarK₂ está más especializado en antiporte nitrato/nitrito (Goddard et al., 2017).

El operon *narKGHIJ* se encuentra conservado en distintas especies, como es el caso de, *P. denitrificans* (Berks et al., 1995), *Pseudomonas fluorescens* (Philippot et

al., 1997), *P. stutzeri* (Hartig et al., 1999) y *Bacillus subtilis* (Hoffmann et al., 1995). Organizaciones similares se han descrito para las nitrato reductasas respiratorias de *Thermus thermophilus* (Ramirez-Arcos et al., 1998), *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptomyces coelicolor* y *Staphylococcus carnosus* (Philippot y Højberg, 1999) . En *T. thermophilus*, la secuencia del operón *narCGHJIKT* incluye *narC* que codifica un citocromo *c* que es responsable de transferir los electrones hacia las enzimas desnitrificantes Nir, Nor y Nos (Cava et al., 2008). Los genes *narK* y *narT* codifican transportadores tipo MFS de las familias NarK1 y NarK2 (Ramirez et al., 2000). El análisis de los genomas de algunas cepas desnitrificantes de *Thermus* spp. han identificado un solo miembro de la familia NarK, llamado NarO, que muestra una baja identidad con NarK1 o NarK2, constituyendo un grupo separado de transportadores tipo MSF (Alvarez et al., 2019). Excepcionalmente, se han identificado en algunas arqueas y bacterias una Nar con el sitio activo en el exterior de la membrana citoplasmática (Martinez-Espinosa et al., 2007).

Existen bacterias en las que la reducción de nitrato a nitrito en el proceso de desnitrificación no requiere la presencia de NarGHI, ya que es llevado a cabo por una nitrato reductasa periplásmica (Nap). Por ejemplo, *B. diazoefficiens* carece del operón *nar*, pero sin embargo es capaz de desnitrificar, debido a la presencia de Nap codificada por el operón *napEDABC* (Bedmar et al., 2005). NapA es la subunidad catalítica del complejo NapAB, con 90 kDa, contiene un cofactor de molibdeno y un centro [4Fe-4S] (Figura 2.3). NapB, de 15 kDa, es un citocromo tipo *c* con dos grupos hemo. NapC, consiste en un citocromo con cuatro grupos hemo, unido a la membrana, encargado de la transferencia de electrones a la subunidad NapB (Moreno-Vivian et al., 1999). El resto de genes del operón *napEDABC* codifican proteínas adicionales necesarias para la síntesis, maduración y actividad enzimática de Nap. Este tipo de nitrato reductasas también han sido descritas y estudiadas bioquímica y genéticamente en *P. denitrificans*, *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans*, *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes eutrophus*, *E. coli*, *Sulfurimonas denitrificans* y *Haemophilus influenzae* (revisado por Gonzalez et al., 2006; Potter et al., 2001; Richardson, 2011; Richardson et al., 2007; Simon y Klotz, 2013; Torres et al., 2016). En la mayoría de las Nap, la transferencia de electrones desde el pool de quinonas al complejo NapAB requiere NapC. Sin embargo, en *E. coli* y *Wolinella succinogenes* se ha identificado una segunda quinol oxidasa, NapGH que es

codificada en el operón *napFDAGHBC* y *napAGHBFLLD*, respectivamente, en el que NapH actuaría como una quinol deshidrogenasa unida a la membrana, y NapG es una proteína periplasmática que contiene centros Fe-S y transfiere los electrones a NapB.

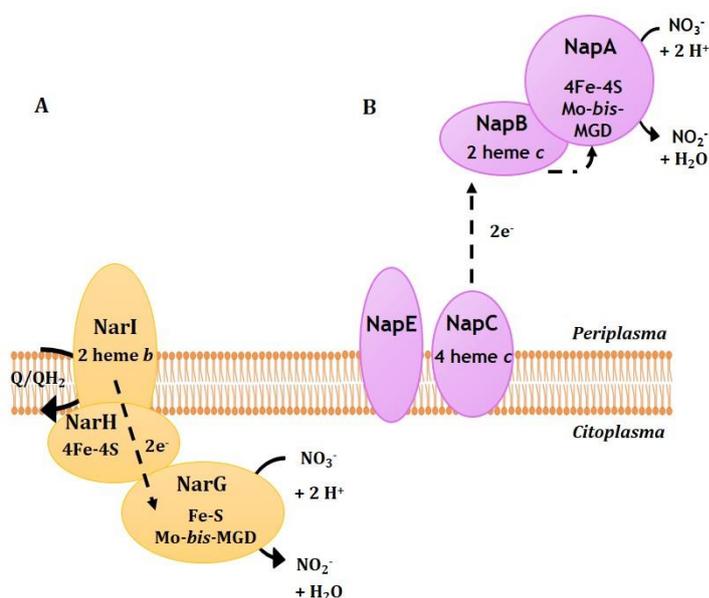


Figura 2.3. Comparación de la organización de nitrato reductasas bacterianas. A. Nitrato reductasa de membrana (Nar). B. Nitrato reductasa periplásmica (Nap). Modificada de Kraft *et al.*, 2011.

Las nitrito reductasas respiratorias catalizan la conversión de NO_2^- a NO mediante la siguiente reacción:



En bacterias desnitrificantes se han descrito dos tipos de enzimas nitrito reductasas, las que contienen un tetrahemo cd_1 (NirS, tipo cd_1) y las que poseen cobre (Cu) (NirK, tipo Cu) en el centro activo de la enzima. Ambas están localizadas en el espacio periplásmico y reciben los electrones del complejo de membrana bc_1 a través de un citocromo c y/o una pseudoazurina. La mayoría de los desnitrificantes poseen únicamente NirK o NirS, sin embargo, recientemente se ha demostrado que *Bacillus nitroreducens* sp. nov (Jang *et al.*, 2018) y *Bradyrhizobium oligotrophicum* (Sanchez y Minamisawa, 2018) portan genes para ambas nitrito reductasas.

NirS es una enzima homodimérica que contiene hemo c y d_1 , y en las diferentes bacterias se encuentra codificada en grandes grupos de genes. Las NirS mejores caracterizadas son la de *P. aeruginosa* (*nirSMCFDLGHJEN*), *P. denitrificans*

(*nirXISECFDLGHJN*) o *P. stutzeri* que presenta dos grupos de genes *nir* (*nirSTBMCFDLGH* y *nirJEN*) separados por los genes *nor*. El gen *nirS* es el que codifica la subunidad funcional de NirS, el resto de genes son necesarios para la síntesis y ensamblaje de los grupos hemo requeridos para la funcionalidad de NirS (revisado por van Spanning, 2011; Bali et al., 2014; Rinaldo et al., 2017).

La mayoría de las NirK son complejos homotriméricos. Cada monómero de 37 kDa contiene un centro de cobre tipo I, con un átomo de cobre, y otro de tipo II con una estructura de coordinación tipo cuadrada plana. El nitrito se une a los sitios tipo II, reemplazando a un ligando exógeno (agua o ion cloruro), y ahí es reducido a NO por la transferencia electrónica desde el sitio de cobre tipo I. Las enzimas NirK mejor caracterizadas son las que se designan como de clase I y II, dependiendo del color de su centro tipo I de Cu. Las de clase III han sido descubiertas recientemente y poseen un dominio de unión a Cu tipo I adicional (Ellis et al., 2007; Opperman et al., 2019). Las características bioquímicas, espectroscópicas, cinéticas y estructurales de las NirK han sido recientemente revisadas en Eady et al., 2016; Horrel et al., 2017 y Nojiri, 2017. Contrastando con la compleja organización de los genes que codifican las proteínas NirS, NirK sólo requiere la expresión del gen *nirK*, aunque a veces aparece acompañado de la expresión de una segunda proteína llamada NirV, la cual puede ser requerida para la inserción del cobre en el centro activo de NirK (revisado por van Spanning, 2011).

La siguiente etapa de la desnitrificación la catalizan las óxido nítrico reductasas (Nor). Son metaloenzimas de membrana pertenecientes a la superfamilia de las oxidasas hemo-cobre. Reducen el NO a N₂O, en la cara externa de la membrana citoplasmática, mediante la siguiente reacción:



Actualmente se han caracterizado tres tipos de Nor: cNor, qNor y Cu_ANor (revisado por Zumft, 2005; de Vries et al., 2007; Richardson, 2011; Tosha y Shiro, 2017; Figura 2.4). La Nor dependiente de citocromo c (cNor) consta de dos subunidades, NorB y NorC (Figura 2.4A). La Nor dependiente de quinol (qNor) es una enzima de subunidad única y utiliza electrones provenientes del pool de quinonas (Figura 2.4B). Estas proteínas contienen una extensión N-terminal que muestra similitud a la subunidad NorC de las cNor, excepto en el motivo de unión a

hemo *c*, que no está presente en esa extensión. La estructura de la qNor de *Geobacillus stearothermophilus* revela un canal de agua desde el citoplasma que podría ser utilizado para la traslocación de protones, por lo que podría ocurrir la oxidación de quinol acoplada a la reducción de NO por la qNor de manera electrogénica (Matsumoto et al., 2012). CuANor son las menos usuales y contienen un centro de di-cobre (centro de Cu_A) en la región hidrofílica (Figura 2.4C). Se

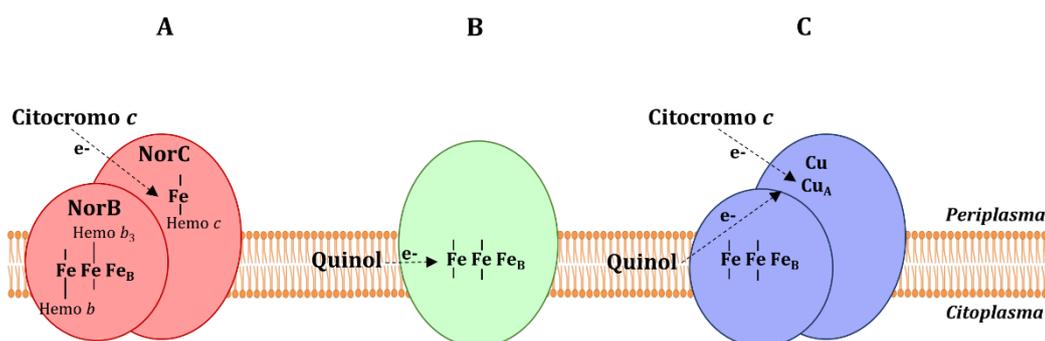


Figura 2.4. Comparación de las óxido nítrico reductasas bacterianas. A. cNor. B. qNor. C. CuANor. Modificada de Tosha & Shiro, 2017.

sugirió originalmente que CuANor recibía electrones tanto del citocromo *c* como del quinol. Sin embargo, un estudio reciente demostró que en el género *Bacillus* las qCuANor no poseen actividad oxidasa de menaquinonas, es por ello que se ha optado por el cambio de denominación de qCuANor a CuANor (Al-Attar y de Vries, 2015).

Las cNor son las más extensamente estudiadas, consisten en heterodímeros formados por la subunidad NorB y NorC, codificadas a su vez por los genes *norB* y *norC*, los cuales se cotranscriben con los genes accesorios *norD* y *norQ*, ocasionalmente también con los genes *norE* y *norF* (Zumft, 2005). En los órdenes *Thermales* y *Aquificales* los genes *norC* y *norB* van seguidos por un tercer gen (*norH*) que codifica una proteína de membrana pequeña importante para una desnitrificación eficiente (Bricio et al., 2014). NorB posee 12 hélices transmembrana y contiene hemo *b* y un centro activo binuclear (hemo *b*₃ y Fe_B) (Figura 2.4A). NorC, es una proteína anclada a membrana que contiene hemo *c* en un dominio hidrofílico y transfiere los electrones desde el complejo *bc*₁ a NorB a través de citocromos *c* o pseudoazurinas (las propiedades estructurales de cNor han sido revisadas ampliamente por Hino et al., 2010; Shiro et al., 2012; Daskalakis et al., 2015; Tosha y Shiro, 2017; Mahinthichaichan et al., 2018). NorD y NorE son proteínas de

membrana que intervienen en el adecuado ensamblaje del complejo NorCB (Butland et al., 2001). Además, NorE pertenece a una familia de citocromos c oxidasas, y la mutación de los genes *norE* y *norF* disminuye la actividad NO reductasa en *P. denitrificans* y *R. sphaeroides* (de Boer et al., 1996; Hartsock y Shapleigh, 2010). Los electrones necesarios para la reducción de NO son transferidos desde el lado periplásmico de la membrana, sin embargo, estudios basados en la estructura de la cNor de *P. aeruginosa* no detectaron ningún canal de protones transmembrana, por lo que cNor no actuaría como bomba de protones y por lo tanto no se produce conservación de energía (Pisliakov et al., 2012).

La N₂O reductasa (N₂OR) es la última enzima implicada en el proceso de desnitrificación, reduciendo el N₂O a N₂ a través de la reacción:



La N₂OR aislada por primera vez es una proteína periplásmica con cobre tipo Z, codificada por el gen *nosZ*, procedente de *Alcaligenes faecalis*, la cual se le denominó N₂OR de clado I (Matsubara y Iwasaki, 1972). Posteriormente se han caracterizado N₂OR pertenecientes a ese clado tanto de α -, β - y γ - proteobacterias (revisado por Zumft y Kroneck, 2007; van Spanning, 2011; Torres et al., 2016; Carreira et al., 2017; Pauleta et al., 2017).

Las N₂OR bacterianas son homodímeros estables con un peso molecular de entre 120 – 160 kDa, contienen 12 átomos de Cu y 2 iones sulfido (S²⁻) por cada dímero (Rasmussen et al., 2000), ordenados en dos centros de Cu, CuA y CuZ. El centro de CuA contiene dos iones de cobre que están unidos por dos residuos de Cys conservados y coordinados por metionina, histidina y triptófano para formar un sitio que se asemeja mucho al CuA presente en la subunidad II del citocromo c oxidasa. El sitio CuA también actúa como una lanzadera de electrones, para la reducción del N₂O que ocurre en el sitio CuZ el cual posee cuatro átomos de cobre y un tetranúcleo de sulfuros que se unen a siete residuos de histidinas, donde tendría lugar la unión y reducción del N₂O. Existen dos formas distintas de centro CuZ, CuZ* (4Cu1S), forma inactiva, y CuZ (4Cu2S) activa (revisado por Eady et al., 2016; Carreira et al., 2017 y Pauleta et al., 2017).

El centro Cu_A tiene la capacidad de aceptar electrones de pequeñas proteínas, normalmente citocromos tipo *c* o cupredoxinas. Estudios llevados a cabo en *Rhodobacter capsulatus*, *R. sphaeroides* y *P. denitrificans* propusieron la implicación de un citocromo en la reducción del N₂O (Boogerd et al., 1980 y Itoh et al., 1989). Células enteras de *R. capsulatus*, en las cuales había sido eliminado el citocromo *c*₂, no eran capaces de reducir el N₂O (Richardson et al., 1991). Por otro lado, estudios *in vitro* indicaron que el citocromo *c*₅₅₂ es el candidato más fuerte a ser el donador de electrones fisiológico de la N₂OR de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (Dell'Acqua et al., 2008), mientras que en el caso de *Achromobacter cycloclastes*, la pseudoazurina fue asignada como el probable donador fisiológico (Fujita et al., 2012). Aunque estas proteínas pueden donar electrones a la N₂OR *in vitro*, y por ello se sugiere un posible papel fisiológico como donadores de electrones, su actuación *in vivo* aún no ha sido demostrada y la posibilidad de la existencia de otras proteínas con la misma función no puede ser excluida.

La expresión, maduración y mantenimiento de la subunidad catalítica de la N₂OR (NosZ) requiere varias proteínas auxiliares siendo todas ellas codificadas juntas por un grupo de seis genes (*nosRZDFYL*) en bacterias que contienen N₂OR de clado I. A este grupo de genes está asociado, en algunos casos, el gen *nosX* y el gen *nosC*. Los genes *nosDFY* codifican un transportador de tipo ABC que está probablemente involucrado en el suministro de sulfuro para el ensamblaje del centro de CuZ. Recientes estudios genéticos y bioquímicos realizados en *P. denitrificans* han demostrado que NosL es una proteína de unión a Cu (I) que se requiere para el ensamblaje eficiente del sitio CuZ (Bennett et al., 2019). NosR y NosX no participan en la biogénesis del CuZ pero juegan un papel en la reducción *in vivo* del N₂O participando en el mantenimiento del estado reducido del centro de CuZ. (Wunsch y Zumft, 2005). A NosR también se le atribuye un papel regulador, ya que es necesario para la transcripción de los genes *nosZ* y *nosD* en *P. stutzeri* (Honisch y Zumft, 2003).

En la ϵ -proteobacteria *W. succinogenes* se expresa una N₂OR “atípica”, clasificada actualmente en el clado II de N₂OR. Los genes *nosZ*, *-B*, *-D*, *-G*, *-C1*, *-C2*, *-H*, *-F*, *-Y* y *-L* son los responsables de la síntesis de esta enzima. La presencia de los genes *nosB*, *-G*, *-H*, *-C1* y *-C2*, así como la ausencia de genes *nosR* y *-X* son

características de este grupo de N₂OR atípica. Las proteínas NosG, -C1, -C2 y -H constituyen una vía de transporte de electrones del menaquinol a la NosZ. En concreto, NosGH es un complejo menaquinol deshidrogenasa y NosC1, C2 dos citocromos c (Sanford et al., 2012 y Simon et al., 2004). La existencia de esta N₂OR atípica se ha descrito en otras ϵ -proteobacterias donde la presencia y disposición de los genes nosB, -G, -H, -C1 y -C2 está estrictamente conservada. En bacterias Gram-positivas aún no se han aislado N₂OR, aunque probablemente sean enzimas asociadas a membrana y codificadas por un grupo de genes *nos* diferente, que se ordena como *nosCZ-ORF-nosDYF-ORF*, este tipo de N₂OR también formarían parte del clado II (revisado por Torres et al., 2016 y Carreira et al., 2017).

2.2. Factores implicados en la regulación de la desnitrificación

En general, los factores medioambientales más importantes para la expresión de todos los genes de la desnitrificación son; (i) condiciones limitantes de oxígeno; (ii) presencia de un óxido de nitrógeno (NO_x) como aceptor final de electrones y (iii) disponibilidad de donadores de electrones, como son los compuestos carbonados. Es por ello, que las moléculas principales que actúan como señales para la regulación de los genes de la desnitrificación son: el oxígeno, un NO_x (nitrato, nitrito o NO) y el estado redox de la célula. Sin embargo, en los últimos años se ha propuesto la implicación de nuevos factores ambientales como el pH o la disponibilidad de metales en el control de la desnitrificación. Estas señales medioambientales son percibidas por un diverso número de reguladores transcripcionales, moléculas de ARN de pequeño tamaño (sRNAs) y factores sigma, que las integran en complejas redes reguladoras (revisado por Shapleigh, 2011; van Spanning, 2011; Spiro, 2011, 2012, 2017; Gaimster et al., 2018).

2.2.1. Oxígeno

La disminución de oxígeno es el principal factor que induce la expresión de los genes de la desnitrificación. De hecho, en la mayoría de las bacterias desnitrificantes, la expresión de los genes *nar*, *nir* y *nor* está estrictamente controlada, sólo tiene lugar bajo condiciones microóxicas y en presencia de un NO_x. Sin embargo, la expresión de los genes *nap* es bastante variable, siendo incluso en algunas bacterias expresada en sus niveles máximos en condiciones aeróbicas. Algo parecido ocurre con los genes *nos*, dado que, aunque NosZ, se considera la enzima más sensible al oxígeno

de la desnitrificación, hay estudios que sugieren que la expresión de los genes *nos* ocurre en condiciones aeróbicas (Miyahara et al., 2010). Además, en *P. stutzeri* (Desloover et al., 2014) y *P. denitrificans* (Bergaust et al., 2012) se ha demostrado la reducción de N₂O en condiciones aeróbicas.

Los sensores más importantes de O₂ implicados en la regulación de la desnitrificación son FixL y FNR. FixL es un sensor de O₂ típico de bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. En el caso de *B. diazoefficiens*, FixL es una proteína citoplásmica con actividad quinasa (en algunos rizobios está unida a la membrana) que detecta la concentración de oxígeno a través de un grupo hemo. Cuando la tensión de oxígeno es baja, FixL se auto-fosforila y transfiere el grupo fosfato a la proteína FixJ, su regulador de respuesta, con la que constituye un sistema de regulación de dos componentes. En *B. diazoefficiens*, FixJ fosforilado por FixL, activa la transcripción de la proteína reguladora FixK₂, siendo ésta la que desencadena la activación de la expresión de los genes implicados en desnitrificación entre otros (información más detallada en el apartado 2.4.1.1). FNR (del inglés, fumarate-nitrate reduction regulator) es un regulador de respuesta a oxígeno que pertenece a un subgrupo de la superfamilia de reguladores transcripcionales bacterianos receptores de AMP cíclico (CRP/FNR), los cuales son extensamente descritos en el apartado 2.3.1. Proteínas ortólogas de FNR en otros organismos, como FnrP de *P. denitrificans*, actúan del mismo modo, activando los genes *nar* y *nos* en respuesta a oxígeno y también a NO (Bergaust et al., 2012). Otro ortólogo es el regulador Anr de *P. aeruginosa*, que activa la transcripción del operón *narK1K2GHJ*, implicado en la síntesis de Nar y el transportador de nitrato (NarK) en respuesta a bajo oxígeno (Schreiber et al., 2007). Además de estos genes, ANR controla la expresión de un gran número de genes, algunos de los cuales no están relacionados con desnitrificación o tienen funciones accesorias en este proceso como es el caso del gen *azu*, que codifica una pequeña proteína de cobre que funciona como donador de electrones a la Nir. ANR también activa la transcripción del gen que codifica DNR, un segundo miembro de la familia FNR/CRP (Arai et al., 1997). DNR funciona como un sensor de NO (ver apartado 2.3.2) que activa la transcripción de los genes *nir* y *nor* en respuesta a NO (Arai et al., 1997). En la bacteria marina, *Dinoroseobacter shibae*, se ha identificado el regulador FnrL que contiene unos residuos de cisteína potencialmente implicados en la formación de

centros Fe- S y podría jugar un papel crucial como activador sensible a oxígeno de los genes de la desnitrificación (Ebert et al., 2017).

2.2.2. Nitrato/nitrito

Las bacterias desnitrificantes deben ser capaces de detectar y responder tanto al nitrato como el nitrito disponible, ya que usan ambos compuestos como aceptores finales de electrones en el proceso de desnitrificación. Existen varios tipos de sistemas reguladores en respuesta a nitrato/nitrito descritos, entre ellos encontramos NarXL, NarQP, NarR y DrpAB.

NarXL y NarQP son sistemas reguladores de dos componentes, siendo NarX y NarQ las proteínas sensoras, mientras que NarL y NarP son los componentes de respuesta. Estudios basados en la estructura de NarX han permitido establecer el mecanismo de detección de esta proteína sensora (Cheung y Hendrickson, 2009; Stewart y Chen, 2010). Hasta la fecha, los genes *narXL* y *narQP* se han descrito en especies que se engloban dentro de las γ - y β -proteobacterias, como son *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Yersinia*, *Ralstonia*, *Pseudomonas*, entre otras (revisado por Torres et al., 2016). En *E. coli* NarL y NarP se unen a ADN para controlar la inducción o represión de los operones *nar* y *nap* (Stewart, 2003; Stewart y Bledsoe, 2005). En *P. aeruginosa*, NarL junto a los reguladores Anr y Dnr y una proteína tipo IHF (Integration Host Factor) activa la transcripción del operón *narK1K2GHJI* en respuesta a la limitación de oxígeno, nitrato y NO_x (Schreiber et al., 2007). Recientemente, se ha demostrado en *M. hydrocarbonoclasticus*, que la expresión de los genes *nar* está bajo el control de NarXL (Carreira et al., 2018).

NarR (regulador de nitrato reductasa) forma parte de la familia de reguladores transcripcionales CRP/FNR, pero carece del grupo [4Fe-4S]. Los genes que codifican NarR se encuentran en algunas α -proteobacterias como *Brucella suis*, *Brucella melitensis*, *P. denitrificans* y *Paracoccus pantotrophus*. En *P. pantotrophus* NarR controla la expresión de los genes *narKGHJI* en respuesta a nitrato y / o nitrito (Wood et al., 2001). No se han encontrado secuencias en NarR que informen sobre el posible mecanismo de detección de nitrato/nitrito por lo que no se conoce el mecanismo implicado en la interacción de NarR con nitrato/nitrito. Dado que todas las bacterias en las que se ha descrito este sistema son α -proteobacterias, es posible que sustituya al sistema NarXL en ese grupo de proteobacterias.

Recientemente, se ha propuesto un nuevo sistema sensor de nitrato en la bacteria *T. thermophilus* y otras especies del género *Thermus*, el sistema DrpAB. Se ha demostrado que la ausencia de ambas proteínas DrpA y DrpB provoca que la expresión del operón *nar* sea independiente de nitrato. Se postula que DrpA sería el detector de nitrato en el periplasma, mientras que DrpB jugaría un papel en la transducción de la señal desde la membrana a la región promotora del operón *nar* (Chahlafi et al., 2018).

2.2.3. Óxido nítrico (NO)

Mantener las concentraciones de NO y de nitrito por debajo de niveles citotóxicos requiere un control estricto. En este contexto, el NO se ha propuesto como molécula clave implicada en la regulación de los genes de la desnitrificación. Se conocen varios factores de transcripción implicados en la respuesta a NO; NorR, NsrR, NnrR, NNR y DNR.

NorR es un miembro de la familia de proteínas EBP (del inglés, Enhancer-Binding Protein) dependientes de σ^{54} . Se caracterizan por poseer una estructura de tres dominios, que incluyen un dominio de unión a ADN en el extremo C-terminal, un dominio central de la familia AAA⁺ que posee una actividad ATPasa e interacciona con el σ^{54} de la ARN polimerasa (ARNP). En el extremo N-terminal posee un dominio GAF (del inglés, cGMP-specific phosphodiesterases, Adenylyl cyclases and FhlA) que contiene un centro de hierro no hémico que puede reversiblemente unir NO. Esa unión a NO activa la ATPasa, lo que desencadena la activación de la transcripción por la ARNP (D'Autréaux et al., 2005). Experimentos de mutagénesis dirigida demostraron que el hierro se encuentra coordinado por las cadenas laterales de residuos de arginina, aspartato y cisteína (Klink et al., 2007 y Tucker et al., 2008) NorR fue descrita por primera vez en *Ralstonia eutropha*, la cual posee dos copias del gen *norR*, ambos localizados en dirección 5' de los genes *norAB*. *norB* codifica la única subunidad NorB de la qNor. En respuesta a anaerobiosis y en presencia de NO, NorR activa específicamente la transcripción de los promotores *norAB*, que son σ^{54} dependientes (Pohlmann et al., 2000). En *E. coli*, cuando NorR es activada por NO se induce la expresión de los genes *norVW*, responsables de la síntesis de una flavorubredoxina que posee actividad NO reductasa (Gardner et al., 2003).

NsrR es un represor transcripcional sensible a NO perteneciente a la superfamilia Rrf2 de reguladores transcripcionales homodiméricos. En *B. subtilis* y *S. coelicolor* se ha demostrado que NsrR se une a un grupo [4Fe-4S], el cual funciona como módulo detector de NO. La reacción del regulador con el NO provoca la pérdida de un grupo [Fe-S] y la formación de especies nitrosilo, lo que da lugar a la disminución de afinidad por el sitio de unión a ADN y como consecuencia se activan los genes que estaban previamente reprimidos (Yukl et al., 2008 y Crack et al., 2015). El análisis de la estructura de NsrR de *S. coelicolor* ha permitido establecer el mecanismo implicado en la inactivación de NsrR por NO (revisado por Volbeda et al., 2017). Además, el uso de espectrometría de masas no desnaturizante ha permitido muy recientemente dilucidar y distinguir claramente los mecanismos de nitrosilación de NsrR (Crack y Brun, 2019). En estudios transcriptómicos se ha demostrado que NsrR de *E. coli* regula al menos 60 genes, entre los cuales se incluyen flavohemoglobinas implicadas en la detoxificación de NO, como Hmp, que convierte el NO a nitrato (Stevanin et al., 2007). En *B. subtilis*, NsrR en respuesta a NO, regula a los genes del operón *nasDEF*, que codifican la nitrito reductasa asimilatoria (Nakano et al., 2006). Aunque NsrR es expresada desde un promotor fuerte, la eficiencia de su traducción es extremadamente baja, produciendo bajos niveles de proteínas NsrR en el interior de la célula, por lo que sitios de unión con baja afinidad a NsrR pueden escapar parcialmente a la represión de esta proteína reguladora (Chhabra y Spiro, 2015).

Las proteínas DNR, NNR y NnrR se analizan en detalle en el apartado 2.3.2.

2.2.4. Balance redox

Los cambios en el balance redox también pueden regular la expresión de genes implicados en desnitrificación. Un gran número de proteobacterias presentan sistemas reguladores de dos componentes que responden al estado redox. En *R. capsulatus*, *Rhodovulum sulfidophilum* y *Roseobacter denitrificans* se ha descrito a RegBA como reguladores de este tipo. En *R. sphaeroides* encontramos a PrrBA, en *Ensifer meliloti* y *Agrobacterium tumefaciens* a ActSR, RegSR en *B. diazoefficiens* y RoxSR en *P. aeruginosa* (revisado por Wu y Bauer, 2008 y Bueno et al., 2012).

En especies del género *Rhodobacter*, los genes controlados por las proteínas RegBA y PrrBA están implicados en numerosos procesos de generación y utilización

de energía, como fotosíntesis, fijación de carbono, fijación de nitrógeno, utilización de hidrógeno, respiración aeróbica y desnitrificación, entre otros. Tanto RegBA como PrrBA constituyen sistemas de dos componentes, con una proteína histidina-kinasa asociada a membrana, RegB y PrrB, que detecta los cambios en el estado redox de la célula y RegA/PrrA como regulador de respuesta. Cuando se incrementa la entrada de compuestos reductores al sistema celular (presencia de fuentes de carbono reducido) o disminuyen los aceptores finales de electrones respiratorios (falta de oxígeno) se genera un exceso de potencial reductor que altera el estado redox de la célula. En estas condiciones, la actividad kinasa de RegB/PrrB se estimula, lo cual hace que aumente la fosforilación del regulador de respuesta RegA/PrrA, que se une al ADN activando o reprimiendo la expresión de sus genes diana.

En *Brucella abortus*, PrrBA regula directamente la transcripción de los genes de la desnitrificación y de los genes *ntrYX* en respuesta a condiciones microaeróbicas. NtrY es una histidina-kinasa asociada a la membrana que es activa a bajas tensiones de O₂, transfiriendo fosfato a su regulador de respuesta NtrX. Mutantes *ntrYX* inhiben la inducción de la desnitrificación en respuesta a bajas concentraciones de oxígeno, lo que sugiere que NtrYX es un sistema regulador de los genes de la desnitrificación (Carrica et al., 2012 y Carrica et al., 2013). En *B. suis* RegBA también se requiere para la expresión de las enzimas de la desnitrificación (Abdou et al., 2013). En *B. diazoefficiens*, RegSR induce la expresión del operon *fixR-nifA* (Barrios et al., 1995). Además, análisis transcriptómicos de una cepa mutante en RegR demuestran que esta proteína reguladora controla los genes de la desnitrificación, como son los genes *nor* y *nos*. También controla la expresión de proteínas de transporte electrónico implicadas en desnitrificación como son los citocromos CycA (gen *cycA*) y cy2 (gen *cy2*) (ver en más detalle en el apartado 2.4.1.2; Torres et al., 2014).

2.2.5. pH

Estudios realizados en suelos han demostrado que el pH es un factor importante en la relación N₂O:N₂ dado que la reducción de N₂O a N₂ por la enzima Nos es menor en suelos ácidos que en suelos neutros o alcalinos. Por ello, se sugiere el encalado de los suelos como estrategia para reducir las emisiones de N₂O. En suelos ácidos, la

tasa de transcripción de *nosZ* fue mayor que la observada en suelos alcalinos. Por lo que se sugirió, que la mayor emisión de N_2O a pH bajo es un fenómeno postranscripcional (Liu et al., 2010). Estudios realizados en células de *P. denitrificans* han demostrado que el pH tiene poco efecto en la transcripción del gen *nosZ* (Bergaust et al., 2010), por lo que se confirma el posible efecto post-traducciona del pH ácido que afectaría a la actividad de NosZ. De hecho, experimentos con bacterias extraídas de los suelos e incubadas a diferentes pHs han demostrado que el bajo pH del suelo disminuye la reducción de N_2O , principalmente al impedir el ensamblaje exitoso de la N_2O reductasa funcional (Liu et al., 2014). *E. meliloti* 1021 posee y expresa todos los genes de la desnitrificación, sin embargo, es incapaz de crecer a través de la respiración de nitrato en condiciones anóxicas. Estudios realizados utilizando un sistema de incubación robotizado demostraron que esta bacteria puede crecer a través de la respiración anaeróbica de N_2O a N_2 . Cuando las células se incubaron a pH 6, *E. meliloti* fue incapaz de reducir el N_2O , lo que corroboró las observaciones previas encontradas tanto en las bacterias del suelo extraídas como en los cultivos puros de *P. denitrificans*, donde la expresión de la N_2OR funcional es difícil a un pH bajo (Bueno et al., 2015).

La mayoría de bacterias patógenas sobreviven y proliferan en ausencia de oxígeno, dentro de su huésped utilizando NO_3^- como aceptador de electrones y reduciéndolo a nitrito, por la Nar, el cual es reducido por una Nir. *Vibrio cholerae*, carece de Nir por lo que acumula nitrito durante la reducción de nitrato. Estudios recientes han demostrado que en condiciones alcalinas, *V. cholerae* puede utilizar la enzima Nap para crecer en anoxia con nitrato, sin embargo, en condiciones ácidas, la acumulación de NO_2^- limita el crecimiento y preserva la viabilidad celular. Curiosamente, este mecanismo es bastante común entre los patógenos entéricos que pueden crecer utilizando sólo la NR respiratoria dependiendo del pH ambiental fluctuante (Bueno et al., 2018).

2.2.6. Iones metálicos

Las enzimas implicadas en desnitrificación son proteínas complejas que poseen metales (hierro, molibdeno y cobre) en sus centros activos, por lo que es posible que existan mecanismos de regulación de los genes de la desnitrificación dependientes de metales. En concreto, el cobre forma parte de la enzima NosZ por lo que es

esencial para la actividad de la misma. En *P. denitrificans* se ha demostrado que células cultivadas en limitación de cobre en el medio acumulan grandes cantidades de N₂O en la atmósfera gaseosa (Felgate et al., 2012). En esta bacteria, la limitación de cobre provoca una inhibición de la expresión de los genes *nosRZDFYLX*, y en ésta represión participan NosC y NosR, pero el mecanismo por el cual el cobre induce la expresión de estos genes se desconoce (Sullivan et al., 2013). La acumulación de N₂O provocada por la disminución de la actividad de NosZ conduce a que la bacteria cambie de las vías biosintéticas dependientes de la vitamina B12 a las independientes de la vitamina B12, a través de la modulación transcripcional de los genes controlados por la vitamina B12 riboswitches (Sullivan et al., 2013). Estudios sobre el efecto del cobre en la transcripción y actividad de la Nir, Nor y Nos de *P. stutzeri* confirman el papel clave del cobre en la regulación de las emisiones de N₂O, mediante su efecto en la expresión de los genes implicados tanto en la producción como en el consumo de N₂O (Black et al., 2016).

Además del cobre, el zinc es otro metal clave en la regulación de la desnitrificación puesto que estudios recientes sobre el efecto de la disminución del zinc en el transcriptoma de *P. denitrificans* revelaron que los genes que codifican la óxido nítrico reductasa (*norCB*) y la nitrito reductasa (*nirS*) están regulados positivamente por la presencia de este ion metálico. Cabe destacar que, *nosC* también muestra una regulación positiva casi de 10 veces por zinc. Además, los datos sugieren que los genes *norCB* están directamente regulados por Zur, un regulador implicado en la asimilación de zinc en la célula. Sin embargo, el mecanismo implicado en el control del zinc sobre la desnitrificación se desconoce por el momento (Neupane et al., 2017).

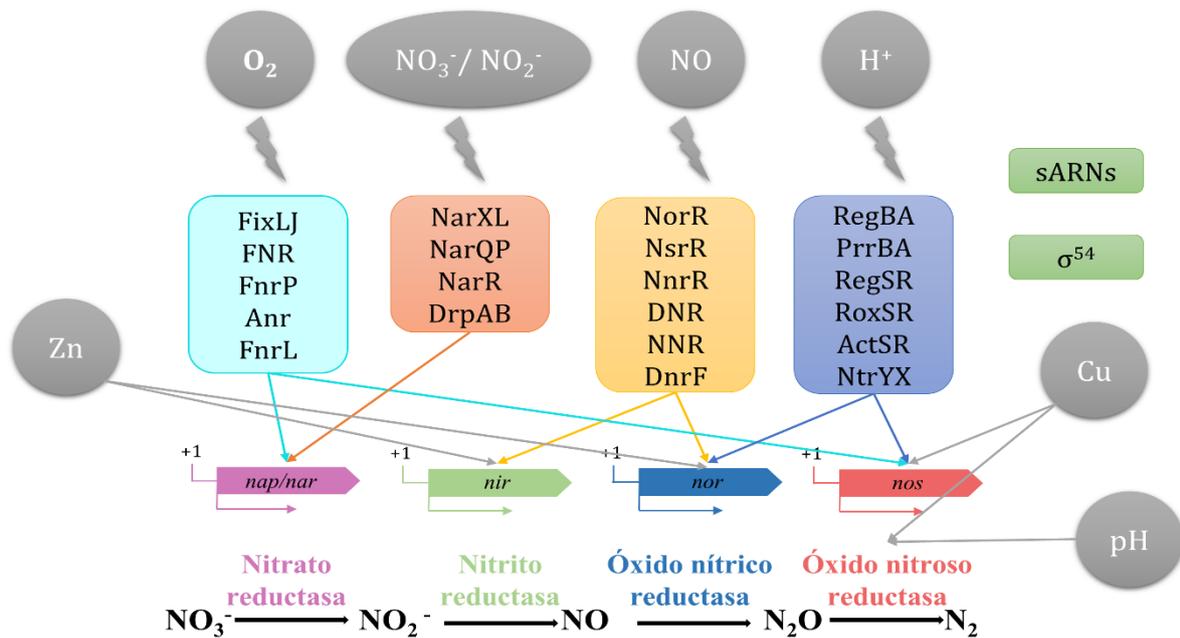


Figura 2.5. Representación de los factores medioambientales y reguladores transcripcionales que participan en la regulación del proceso de desnitrificación. Las flechas indican la regulación de las proteínas reguladoras sobre cada uno de los genes o enzimas de la desnitrificación. Modificado de Gaimster et al., 2017.

2.3. Reguladores transcripcionales CRP/FNR

La superfamilia de factores transcripcionales CRP/FNR comprende un amplio grupo de reguladores ampliamente distribuidos en el dominio *Bacteria*. El nombre de este grupo de reguladores se debe a las dos primeras proteínas de esta familia que fueron identificadas: CRP (del inglés, cAMP Receptor Protein) y FNR (del inglés, Fumarate and Nitrate reductase Regulator). Los miembros incluidos en esta familia son muy versátiles y responden, tanto directa como indirectamente, a una gran cantidad de metabolitos y factores medio ambientales. Por ello, están implicados en la regulación de un gran número de funciones, como es la utilización de sustratos carbonados, virulencia, fijación de nitrógeno, fotosíntesis y varios tipos de respiración (Körner et al., 2003 y Bonnet et al., 2013).

Casi todas las proteínas que pertenecen a esta familia están formadas por entre 230 y 250 aminoácidos, son activas como homodímeros y se unen a una secuencia consenso de ADN palindrómica localizada a distintas distancias en las regiones promotoras de los genes que regulan (Figura 2.6). Además, todas ellas presentan en

su estructura cuatro dominios funcionales. En el extremo amino terminal, poseen un dominio sensor, de unión a cofactor, que consta de unos 170 residuos, de composición variable, donde radica la versatilidad de estos reguladores para responder a los diferentes estímulos ambientales. La parte central de la proteína posee una estructura en barril β , cuya función es la interacción con la ARNP, le sigue una hélice α , gracias a la cual dimerizan. Por último, en el extremo C-terminal poseen un motivo hélice-giro-hélice (H-T-H), a través del cual interaccionan con su ADN diana (Figura 2.6; Brennan y Matthews, 1989; Busby y Ebright, 1999 y Körner et al., 2003).

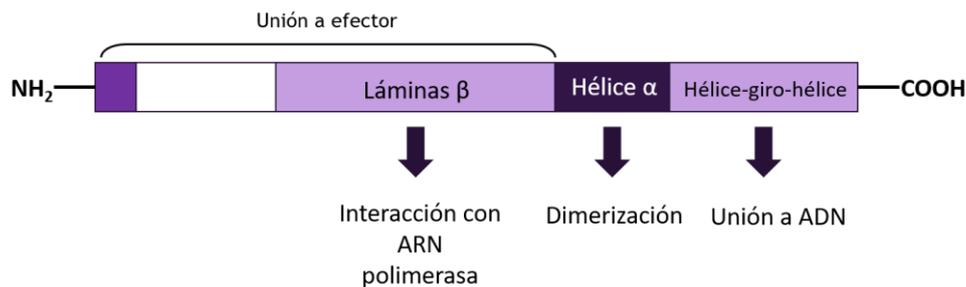


Figura 2.6. Representación gráfica de los dominios presentes en las proteínas tipo CRP/FNR.

Los miembros CRP/FNR han sido clasificados en 21 subgrupos, atendiendo a las estructuras primarias de los dominios de unión a ADN y de unión a efector (revisado por Körner et al., 2003; Mesa et al., 2006 y Fernández et al., 2016). La mayoría de estos reguladores funcionan como activadores de la transcripción y es menos frecuente que actúen como represores. Dentro de esta familia de reguladores transcripcionales encontramos las proteínas FNR, FixK₂, DNR, NNR y NnrR.

2.3.1. FNR y FixK₂

FNR y FixK₂ son reguladores transcripcionales de respuesta a O₂, que coordinan la transición del metabolismo aerobio al anaeróbico.

La concentración de proteína FNR intracelular se mantiene estable tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, sin embargo, sólo es en anoxia cuando FNR es activada por la unión de un grupo prostético [4Fe-4S]²⁺ a tres residuos de cisteína (Cys 20, 23 y 29) que posee en su extremo N-terminal y uno en el dominio central (Cys 122). La unión de un grupo [4Fe-4S]²⁺ por cada monómero promueve la dimerización de FNR, lo que conduce a su unión a las regiones promotoras de genes que poseen secuencia tipo FNR en su región promotora (Jordan et al., 1997;

Green et al., 2001). En presencia de oxígeno el grupo prostético pasa a ser $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$, inactivándose así FNR ya que se vuelve a su estado monomérico. Si el oxígeno persiste en el ambiente, el grupo $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ se desacopla de la proteína y se obtiene la apoforma monomérica de FNR (Sutton et al., 2004). FNR se une específicamente a lo que se denominan cajas de anaerobiosis, la secuencia consenso de éstas es el palíndromo: 5'-TTGAT-N₄-ATCAA-3' (Caja FNR, Spiro y Guest, 1990). El motivo TTGA es el encargado de interactuar con los residuos de E209 y S212 de cada monómero de la proteína. Las cajas FNR se encuentran en la posición -41,5 respecto al inicio de la transcripción, aunque se dan muchas excepciones (revisado por Körner et al., 2003 y Fernández et al., 2016).

FixK₂ pertenece al subgrupo FixK de la superfamilia CRP/FNR, cuyos miembros son muy similares a las proteínas FNR, pero carecen de una o más cisteínas necesarias para la unión del cofactor $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$. El análisis de su secuencia aminoacídica indica que esta proteína no posee ningún sitio típico de unión a cofactor. FixK₂ funciona como homodímero (Figura 2.7) y no requiere de cofactor para ser activa en ensayos de transcripción *in vitro* (Mesa et al., 2005). En cuanto a la secuencia de reconocimiento de ADN consenso de la proteína FixK₂ es un palíndromo de 14 pares de bases (TTGA/C-N₆-T/GCAA; caja FixK₂), en el que las

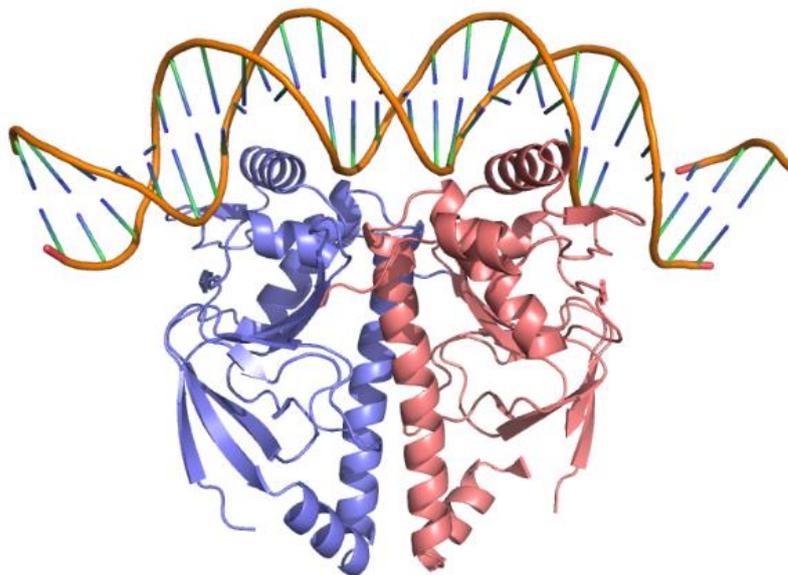


Figura 2.7. Estructura de la proteína reguladora FixK₂ unida a ADN. Resolución 1,77 Å. En diferente color, azul y rojo, se muestra cada uno de los monómeros que la constituyen (Bonnet et al., 2013).

bases 1, 12, 3/11 interaccionan específicamente con los residuos L195, E196 y R200 del dominio de unión a ADN de la proteína FixK₂ (Bonnet et al., 2013).

El gen *fixK₂* está localizado a 3' de los genes *fixL* y *fixJ*, que codifican el sistema de respuesta a oxígeno FixLJ, el cual a bajas concentraciones de oxígeno activa la expresión de *fixK₂* (ver apartado 2.2.1). Además del control transcripcional del gen *fixK₂* por el regulador FixJ, FixK₂ posee una regulación post-traducciona compleja. En primer lugar, sólo posee una cisteína en la posición 183, cerca del dominio de H-T-H de unión a ADN. La oxidación de esa cisteína con agentes oxidantes *in vitro* da lugar a la formación de un puente disulfuro intermolecular reversible. *In vivo*, sin embargo, es más probable que el mecanismo de oxidación sea la conversión irreversible del grupo tiol de la cisteína a ácido sulfónico o sulfínico, inactivando a la proteína, aunque en el primer caso la oxidación es parcialmente reversible después del tratamiento con agentes reductores. Análisis transcriptómicos muestran que la mayoría de los genes diana regulados positivamente por FixK₂ reducen su expresión en presencia de agentes oxidantes, como el peróxido de hidrógeno en la cepa silvestre de *B. diazoefficiens*, sin embargo, este efecto no se produce cuando se complementa una cepa mutante del gen *fixK₂* con una variante insensible a oxidación de la proteína FixK₂, con la cisteína 183 reemplazada por una alanina (Mesa et al., 2009). *In vivo*, esa oxidación puede ser causada por las especies reactivas de oxígeno (ROS) que se producen durante los procesos de infección, respiración endosimbótica o senescencia de los nódulos, en todos esos casos la actividad de la proteína FixK₂ no es necesaria ni deseable (Mesa et al., 2009).

En segundo lugar, en FixK₂ se ha descrito una regulación por proteólisis, concretamente, proteólisis inespecífica por la chaperona ClpAP₁ (Bonnet et al., 2013), aunque también se sugiere que podría tener una proteólisis específica en el extremo C-terminal de la proteína, concretamente en los últimos 12 aminoácidos. En el caso de la proteína FNR de *E. coli*, también está controlada por proteólisis por una chaperona-proteasa, que sólo la degrada en su forma inactiva, por lo que podría ser un mecanismo para regular la cantidad de proteína FixK₂ en la célula, ya que, a pesar de la evidente inducción de la expresión del gen *fixK₂* en condiciones microóxicas, los niveles de proteína FixK₂ permanecen constantes

independientemente de las condiciones de crecimiento (Nellen-Anthamatten et al., 1998 y Mesa et al., 2009).

Otra regulación añadida a las ya mencionadas, es la posible autorregulación negativa del gen *fixK₂* por la propia proteína FixK₂. Existen evidencias de que la expresión del gen *fixK₂* está más inducida en una cepa mutante *fixK₂* que en la cepa parental (Mesa et al., 2008), y que la actividad β -galactosidasa de una fusión traduccional *fixK₂-lacZ*, es más alta en una cepa mutante *fixK₂* que en la cepa parental, ambas crecidas en microoxia (Nellen-Anthamatten et al., 1998). Estudios realizados con posterioridad, han confirmado que esa retroalimentación negativa de la expresión de *fixK₂*, no sólo ocurre en condiciones de microoxia sino, también en oxia, donde se supone que la proteína FixK₂ no es activa. Además, esa represión del gen *fixK₂* parece ser dependiente de la fase de crecimiento, tanto en oxia como en microoxia (revisado por Fernández et al., 2016).

FixK₂ se considera una proteína clave en la expresión de los genes de fijación de nitrógeno y de respiración de nitrato dado que una cepa mutante en *fixK₂* no es capaz de fijar nitrógeno en simbiosis con plantas de soja y no crece anaeróbicamente con nitrato como aceptor final de electrones (Nellen-Anthamatten et al., 1998). Estudios transcriptómicos de una mutante *fixK₂*, permitieron la identificación de más de 300 genes controlados por esta proteína e implicados en el metabolismo microóxico de *B. diazoefficiens* tanto en vida libre como en simbiosis con soja (Mesa et al., 2008).

2.3.2. DNR, NNR y NnrR

NnrR (del inglés, Nitrite and nitric oxide reductase Regulator), NNR (Nitrite reductase and Nitric oxide reductase Regulator) y DNR (del inglés, Dissimilatory Nitrate respiration Regulator) son también miembros de la familia de factores de transcripción CRP/FNR. Sin embargo, a diferencia de FNR y al igual que en el caso de las proteínas de tipo FixK, carecen de cisteínas para poder unir grupos [4Fe-4S]. Estos reguladores transcripcionales se encargan de orquestar la expresión de los genes *nor* y *nir* (revisado por Rodionov et al., 2005; van Spanning, 2011; Torres et al., 2016; Spiro, 2017). Los promotores de estos operones contienen sitios de unión que se asemejan a la secuencia consenso de la caja FNR. El mecanismo para detectar NO por estas proteínas está menos descrito que para NorR y NsrR. Hasta el

momento, la estructura de DNR de *P. aeruginosa* solamente ha sido resuelta sin grupo prostético, pero sí revela la presencia un bolsillo hidrofóbico que podría albergar un sitio de unión a hemo, además la apoproteína DNR es capaz de unir hemo (Giardina et al., 2008). El modelo que se propone para que DNR sea capaz de unir ADN sugiere que previamente la proteína debe de haber unido hemo y este a su vez haberse nitrosilado con NO, por lo tanto, los cambios que se produzcan en la síntesis de hemo por el metabolismo celular provocan perturbaciones en la capacidad de DNR de activar la transcripción de los genes *nor* (Castiglione et al., 2009). Recientemente se ha demostrado que la forma hemo-nitrosil de DNR se une a ADN con elevada afinidad (Lobato et al., 2014). Estudios realizados en la bacteria marina *D. shibae*, han demostrado, que al igual que lo observado en DNR, el cofactor hemo y el NO son necesarios para aumentar la afinidad de DnrF al promotor del gen *napD* (Ebert et al., 2017).

En *P. denitrificans*, es NNR la proteína reguladora implicada en el control por NO, que al igual que los demás reguladores de este grupo, activa la transcripción de los genes *nir* y *nor* (Van Spanning et al., 1995). Estudios posteriores sugieren que NNR también regula la transcripción de los genes *nos* (Bergaust et al., 2012), aunque experimentos de proteómica no permitieron identificar a estos genes en el regulón de NNR (Bouchal et al., 2010). NNR se considera un sensor dual de O₂ y NO, ya que es inactivo en condiciones aeróbicas. Experimentos *in vivo* sugirieron que NNR responde directamente a NO (van Spanning et al., 1999; Hutching et al., 2000). Se ha propuesto, que la detección de NO por NNR ocurre a través de un grupo hemo, al igual que se descrito en DNR (Lee et al., 2006,). Sin embargo, el mecanismo de detección de NO por NNR es por el momento desconocido.

En cuanto a NnrR, en *R. sphaeroides*, se propuso como activador transcripcional de los genes *nir* y *nor* (Tosques et al., 1996). *B. diazoefficiens* también posee una proteína reguladora denominada NnrR, una cepa mutante en el gen que la codifica, *nnrR*, es incapaz de crecer en condiciones anaeróbicas con nitrato o nitrito. Además, NnrR controla la expresión de los genes de la desnitrificación en respuesta a NO (ver apartado 2.4.1.1; Mesa et al., 2003; Bueno et al., 2017).

2.4. Regulación de la desnitrificación en rizobios

La desnitrificación entre los rizobios es un proceso raro, ya que la mayoría de las especies no contienen el set completo de genes de la desnitrificación. Son los rizobios de crecimiento lento (*Bradyrhizobium*) donde la capacidad de desnitrificación está más extendida, mientras que en los de crecimiento rápido es menos usual. *B. diazoefficiens*, es un desnitrificante completo que se estudia como modelo dentro de los rizobios (información en detalle en el apartado 2.4.1). Dentro de los rizobios de crecimiento rápido encontramos la especie *E. meliloti*, que comprende una considerable proporción de cepas desnitrificantes (Chan et al., 1989; Garcia-Plazaola et al., 1993). Sin embargo, *E. meliloti* se considera un desnitrificante parcial debido a su incapacidad de crecer en condiciones anóxicas con nitrato o nitrito como aceptor final de electrones (Torres et al., 2011, 2014; Bueno et al., 2015), aunque posee el set completo de genes que codifican las enzimas desnitrificantes (Barnett et al., 2001). Sin embargo, esta bacteria puede crecer a expensas de la respiración de nitrato cuando las células se incuban con una concentración inicial de O₂ del 2%. Además, posee la capacidad de expresar los genes *napA*, *nirK*, *norC* y *nosZ* tanto en condiciones microóxicas como anóxicas con nitrato (Torres et al., 2014). Curiosamente, exceptuando el caso de *napA* que sólo se induce 4 veces por anoxia, los genes *nirK*, *norC* y *nosZ* se indujeron más de 30 veces (Torres et al., 2014). Experimentos recientes con una cepa de *E. meliloti* que sobreexpresa los genes *napEFDABC* (Nap⁺) han permitido demostrar la capacidad de esta cepa de crecer anaeróbicamente a través de la respiración de nitrato (Torres et al., 2018). Además, la cepa Nap⁺ también mostró un aumento en la expresión de las enzimas Nap, Nir y cNor así como una mayor capacidad para producir NO y N₂O en comparación con la cepa parental. Estos resultados sugieren que la incapacidad de *E. meliloti* para crecer en condiciones anaeróbicas usando nitrato como aceptador de electrones podría atribuirse a una limitación en la expresión de la nitrato reductasa periplásmica.

E. meliloti es una bacteria del suelo que establece asociaciones simbióticas fijadoras de N₂ atmosférico, con plantas de los géneros *Medicago*, *Melilotus* y *Trigonella*. El estudio del genoma de *E. meliloti* 1021 muestra una composición en tres replicones con distinta funcionalidad y estructura, un cromosoma de 3,36 Mb y

dos megaplásmidos, pSymA (1,35 Mb) y pSymB (1,68 Mb) (Galibert et al., 2001). pSymA contiene un segmento de 53 kb particularmente rico en genes codificantes de proteínas relacionadas con el metabolismo del nitrógeno, incluyendo los genes de la desnitrificación *napEFDABC*, *nirK*, *norECBQD* y *nosRZDFYLX*. Análisis transcriptómicos mostraron que la inducción de los genes de la desnitrificación en respuesta a condiciones de microoxia está coordinada por el sistema de regulación de dos componentes FixLJ. La histidina-quinasa FixL es una proteína de membrana que percibe la señal de bajo oxígeno y se autofosforila, a continuación, transfiere el grupo fosforilo a FixJ, el cual activa la transcripción de los reguladores FixK y NifA, que son los responsables de la activación de los genes *fix* (respiración) y *nif* (fijación de N₂), respectivamente (Figura 2.8; Becker et al., 2004; Bobik et al., 2006). En *E. meliloti*, FixLJ responde, tanto a condiciones de microoxia, como a presencia de NO, ya que FixL puede unir otros ligandos aparte de O₂, como son el NO y el CO. Aunque la afinidad de FixL por NO es mucho mayor que por O₂, la única molécula capaz de anular la actividad kinasa de FixL es el O₂ (Gilles-Gonzalez et al., 2008). La proteína reguladora NnrR también está implicada en la respuesta a NO en *E. meliloti* (Figura 2.8). En presencia de NO, NnrR regula la expresión de los genes *nirK* y *norC*, además de otros relacionados con la desnitrificación, como son *azu1*, *hemN*, *nnrU* y *nnrS* (Meilhoc et al., 2010). Sin embargo, las proteínas FixK y NnrR pertenecen a dos diferentes cascadas reguladoras, al contrario de lo que ocurre en *Rhizobium etli* y *B. diazoefficiens*, donde ambos reguladores pertenecen a la misma vía de regulación (Figura 2.8; revisado por Cabrera et al., 2011).

Otro rizobio que tampoco es capaz de usar el nitrato como aceptor final de electrones es *R. etli* CFN42, ya que carece de actividad nitrato reductasa respiratoria. Sin embargo, posee genes relacionados con la desnitrificación, *norCBQD*, que codifican una óxido nítrico reductasa y *nirKnirVnnrRnnrU*, responsables de la síntesis de diferentes proteínas implicadas en desnitrificación, entre ellas una nitrito reductasa NirK (Gomez-Hernandez et al., 2011). *R. etli* también establece asociaciones simbióticas con plantas, en este caso con el género *Phaseolus* (judía). El genoma de *R. etli* CNF42 contiene un cromosoma y seis grandes plásmidos, cuyos tamaños oscilan desde 184,4 kb a 642,5 kb (Gonzalez et al., 2006). La región que codifica los genes *nor* y *nir* se encuentra en uno de los seis plásmidos, concretamente en el pCFN42f el cual también incluye genes para proteínas reguladoras, como *fixK*,

fixL y *nnrR* (Girard et al., 2000; Granados-Baeza et al., 2007). Al contrario que en *E. meliloti* y *B. diazoefficiens*, el activador transcripcional con función homóloga a FixJ está ausente en *R. etli*. Se ha identificado a la proteína FxkR como el regulador que permite la transducción de la señal microaeróbica para la activación del regulón FixKf (Figura 2.8; Zamorano-Sanchez et al., 2012). El gen *nnrR* codifica el regulador NnrR. Aunque, *R. etli* es incapaz de llevar a cabo la ruta completa de la desnitrificación, la presencia de las regiones codificantes de NirK y Nor sugiere un papel de estas enzimas en la detoxificación de NO, previniendo la acumulación de NO en el interior de las células o en los nódulos (Bueno et al., 2005; Gomez-Hernandez et al., 2011). La expresión de *nirK* y *nor* requiere de una proteína FixKf funcional, donde la respuesta a NO está mediada por NnrR, siendo la expresión anaeróbica de *nnrR* también controlada por FixKf. Al igual que en *E. meliloti* y *B. diazoefficiens*, *R. etli* también posee el regulador de la fijación de N₂, NifA, el cual tiene un efecto diferente sobre la transcripción del operón *nirK*, ya que disminuye su expresión, mientras que en *B. diazoefficiens*, NifA está implicado en la máxima expresión de los genes de la desnitrificación *nap*, *nirK* y *norC* (Bueno et al., 2010)

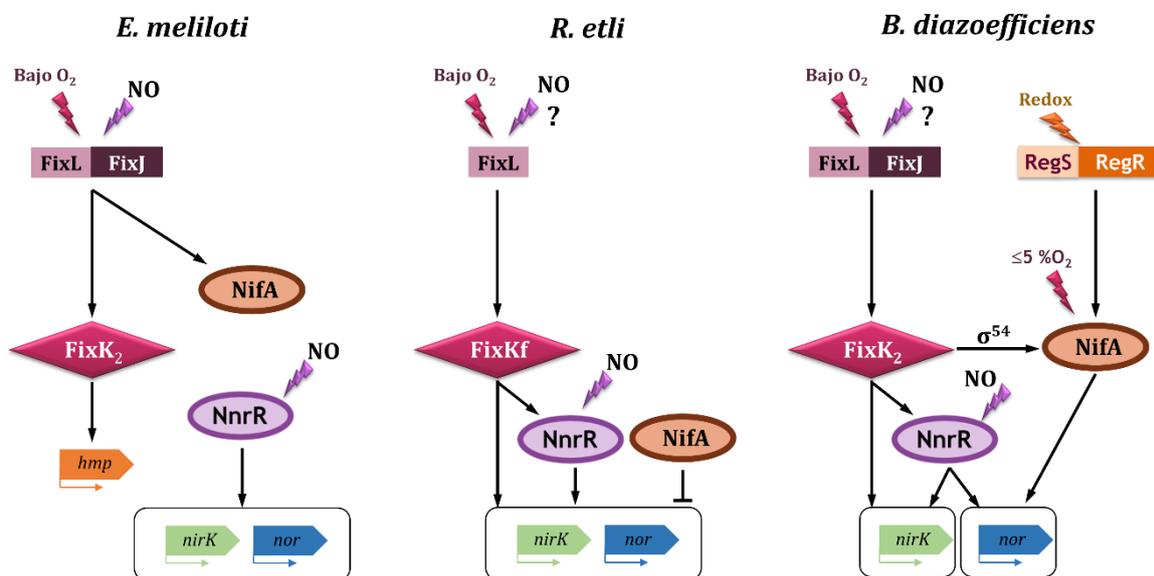


Figura 2.8. Cascadas reguladoras en *E. meliloti*, *R. etli* y *B. diazoefficiens*. Adaptada de Cabrera et al., 2011.

Como se menciona anteriormente, *R. etli* CFN42, no puede crecer en condiciones anóxicas a expensas de la respiración de nitrato, ni de llevar a cabo una desnitrificación completa. Esta bacteria carece de los genes *nap*, *nar* y *nos* pero contiene genes que codifican NirK y cNor. Estudios recientes han demostrado que esta bacteria es capaz de crecer con nitrato como única fuente de nitrógeno en condiciones aeróbicas y microóxicas (Hidalgo-García et al., 2019). Esta reducción asimilatoria de nitrato a nitrito la lleva a cabo la enzima NarB, la cual también es responsable de la producción de NO y N₂O en células cultivadas en microoxia con nitrato como única fuente de N. Estos resultados sugieren que el nitrito, producido en el citosol por NarB a partir de la reducción asimilatoria de nitrato, puede ser transportado al periplasma y reducido a NO y N₂O por las enzimas NirK y cNor, respectivamente (Hidalgo-García et al., 2019).

2.4.1. *B. diazoefficiens* como organismo modelo

Como se ha mencionado anteriormente, *B. diazoefficiens* es el único rizobio que posee la ruta completa de la desnitrificación y que es usada por la bacteria para la obtención de energía en condiciones de limitación de oxígeno usando el NO₃⁻ o NO₂⁻ como aceptor final de electrones. *B. diazoefficiens* posee una enzima nitrato reductasa periplásmica (Nap), una nitrito reductasa de cobre (NirK), una óxido nítrico reductasa tipo *c* (cNor) y una óxido nitroso reductasa (Nos) codificadas por los genes *napEDABC*, *nirK*, *norCBQD* y *nosRZDFYLX*, respectivamente (Velasco et al., 2001, 2004; Mesa et al., 2002; Delgado et al., 2003; Bedmar et al., 2005, 2013).

La Nap de *B. diazoefficiens* está codificada por los genes que forman parte del operón *napEDABC*, el cual es responsable de la expresión de cinco proteínas de 7, 12, 95, 17 y 24 kDa, respectivamente (Figura 2.9). NapA es la subunidad catalítica de la enzima, contiene un cofactor de molibdopterina guanina, y un centro [4Fe-4S] y es de localización periplásmica. NapB, es un citocromo localizado en el periplasma con dos grupos hemo *c*, que recibe los electrones desde NapC, un citocromo de membrana con cuatro grupos hemo *c*, y los transfiere a la Nap. NapE es una proteína que posee dominios transmembrana, pero hasta el momento es de función desconocida. Por último, NapD es una proteína soluble que podría estar implicada en la maduración del complejo NapAB (más información en el apartado 2.1.2). Nap es la única nitrato reductasa respiratoria que posee *B. diazoefficiens*, ya que en su

genoma no se han podido localizar los genes *nar* responsables de la síntesis de la nitrato reductasa de membrana (Kaneko et al., 2002). Además, una cepa deficiente en el gen *napA* es incapaz de crecer anaeróbicamente con nitrato y carece de actividad nitrato reductasa periplásmica (Delgado et al., 2003).

El gen *nirK* de *B. diazoefficiens*, es el responsable de la síntesis de una proteína de 34 kDa, correspondiente a una CuNir (Figura 2.9), que fue identificada por Velasco et al., (2001). La secuencia de esa proteína posee en el extremo N-terminal un péptido señal (S/T)RRXFLK propio de metaloproteínas periplásmicas que se exportan mediante el sistema Tat (del inglés, Twin arginine translocation). Una cepa mutante en *nirK* carece de actividad nitrito reductasa respiratoria, acumula nitrito en el medio y es incapaz de crecer en anaerobiosis con nitrato o nitrito (Velasco et al., 2001). La transferencia de electrones desde el complejo *bc₁* a NirK ocurre a través del citocromo *c₅₅₀*, codificado por el gen *cycA* (Bueno et al., 2008).

cNor de *B. diazoefficiens* es codificada por los genes *norCBQD*, que dan lugar a la síntesis de cuatro proteínas de 17, 41, 29 y 70 kDa, respectivamente (Figura 2.9). La proteína NorC es un citocromo *c* asociado a membrana, que se une a NorB, subunidad homóloga a la subunidad I (FixN) de la oxidasa terminal *cbb₃* de distintas bacterias. NorC y NorB corresponden a las subunidades estructurales, mientras que NorQ y NorD tienen funciones desconocidas hasta el momento, aunque se relacionan con la maduración y ensamblaje de la enzima (más información en el apartado 2.1.2). Cepas deficientes en *norC* o *norB* son incapaces de crecer en condiciones desnitrificantes y además acumulan NO (Mesa et al., 2002).

En *B. diazoefficiens* la Nos es codificada por el operón *nosRZDFYLX*. Los seis primeros genes son fundamentales para la reducción del N₂O a N₂, y se encuentran en la mayoría de los procariotas que poseen esa capacidad (Zumft y Kroneck, 2007). La proteína NosZ actúa de subunidad catalítica agrupándose en homodímeros, contiene dos centros de cobre, Cu_A y Cu_Z, donde este último es el que une el N₂O para llevar a cabo la reducción (Figura 2.9). Las proteínas NosR y NosX son flavoproteínas que se relacionan con el transporte electrónico desde las quinonas a NosZ. Los genes *nosDFL* codifican un transportador tipo ABC que es necesario para la biosíntesis del grupo Cu_Z. Finalmente, NosL es una chaperona que está implicada en el transporte y ensamble de Cu_Z a NosZ (más información en el apartado 2.1.2). Cepas de *B.*

diazoefficiens deficientes en las proteínas NosR y NosZ crecen en condiciones desnitrificantes, pero acumulan grandes cantidades de N_2O (Velasco et al., 2004).

En *B. diazoefficiens* existe una compleja red de regulación formada por dos cascadas interconectadas entre sí, FixLJ-FixK₂-NnrR y RegSR-NifA (Figura 2.10), que controla la expresión de los genes implicados en el metabolismo microóxico de esta bacteria tanto en vida libre como en simbiosis (revisado por Bueno et al., 2012 y Torres et al., 2016).

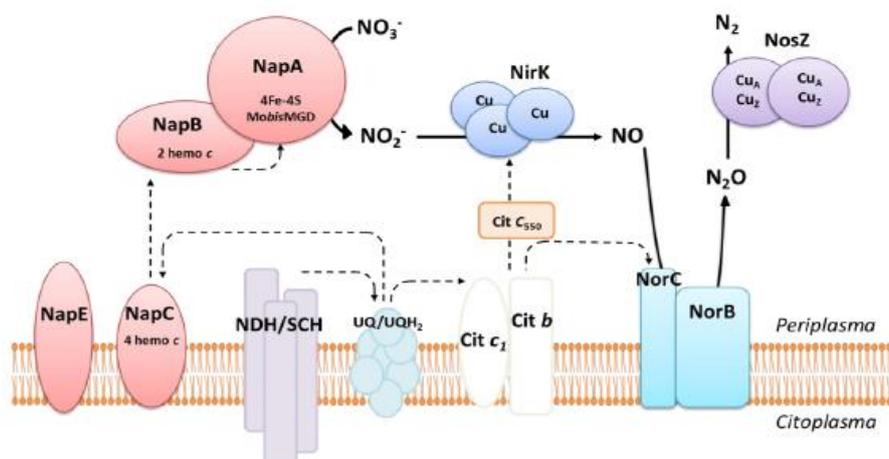


Figura 2.9. Representación esquemática del proceso de desnitrificación en *B. diazoefficiens*. UQ, uiquinona, UQH₂, ubihidroquinona; NDH, NADH deshidrogenas; SCH, succinato deshidrogenasa. Las flechas discontinuas indican el flujo de electrones. Tesis Juan Cabrera.

2.4.1.1. Cascada FixLJ-FixK₂-NnrR

Una disminución moderada en la concentración de oxígeno en la fase gaseosa ($\leq 5\%$) es suficiente para activar la expresión de los genes dependientes de FixLJ-FixK₂. Como se ha descrito anteriormente (apartado 2.4), FixL detecta la señal de bajo oxígeno, se autofosforila y transfiere el grupo fosforilo a FixJ, que transduce la señal a la activación de la transcripción del gen *fixK₂*. La proteína reguladora FixK₂ induce la expresión de más de trescientos genes, entre los cuales se encuentran genes reguladores (*rpoN₁*, *fixK₁* y *nnrR*), genes asociados al metabolismo microóxico (*fixNOQP*) o genes implicados en desnitrificación (*napEDABC*, *nirK*, *norCBQD* y *nosRZDFYLX*) (Nellen-Anthamatten et al., 1998; Mesa et al., 2003, 2005; Bedmar et al., 2005; Robles et al., 2006 y Mesa et al., 2008). Entre los genes controlados por FixK₂, *nnrR* codifica el regulador NnrR, necesario para la máxima expresión de los genes de la desnitrificación en respuesta a NO, de manera que expande la cascada

como FixLJ-FixK₂-NnrR (Figura 2.10 y 2.8). Se desconoce, hasta la fecha, si FixK₂ actúa sobre la expresión del gen *nnrR* de forma directa o indirecta, así como los genes que forman parte del regulón de NnrR, y el mecanismo molecular por el cual NnrR controla sus dianas en respuesta a NO.

2.4.1.2. Cascada RegSR-NifA

La inducción de los genes controlados por la cascada RegSR-NifA requiere muy baja concentración de oxígeno ($\leq 0,5\%$) debido a la alta sensibilidad de NifA al oxígeno (Figura 2.10). El regulador de respuesta RegR del sistema regulador de dos componentes RegSR (ver apartado 2.2.4) induce la expresión del operón *fixR-nifA*, el cual está precedido de dos promotores solapantes, P1 y P2 (Barrios et al., 1995 y Bauer et al., 1998). RegR activa la transcripción desde el P2 independientemente de la concentración de oxígeno. En condiciones anaeróbicas, NifA junto con la ARNP que contiene RpoN (σ^{54}) induce su propia síntesis activando el promotor P1 de *fixR-nifA*. RpoN de *B. diazoefficiens* está codificado por dos genes muy similares y funcionalmente equivalentes (*rpoN₁* y *rpoN₂*) (Kullik et al., 1991). El gen *rpoN₁* está bajo el control de la proteína FixK₂, es por ello que se considera el nexo de unión entre las dos cascadas reguladoras. RegR también está implicada en la máxima inducción de los genes de la desnitrificación, y es capaz de interactuar directamente con la región promotora de los genes *norCBQD* y *nosRZDFYLX* (Torres et al., 2014). NifA, además de ser el regulador transcripcional de los genes *nif* y *fix*, también está implicada en la máxima inducción de la expresión de los genes *napEDABC*, *nirK* y *norCBQD* (Figura 2.10, Bueno et al., 2010).

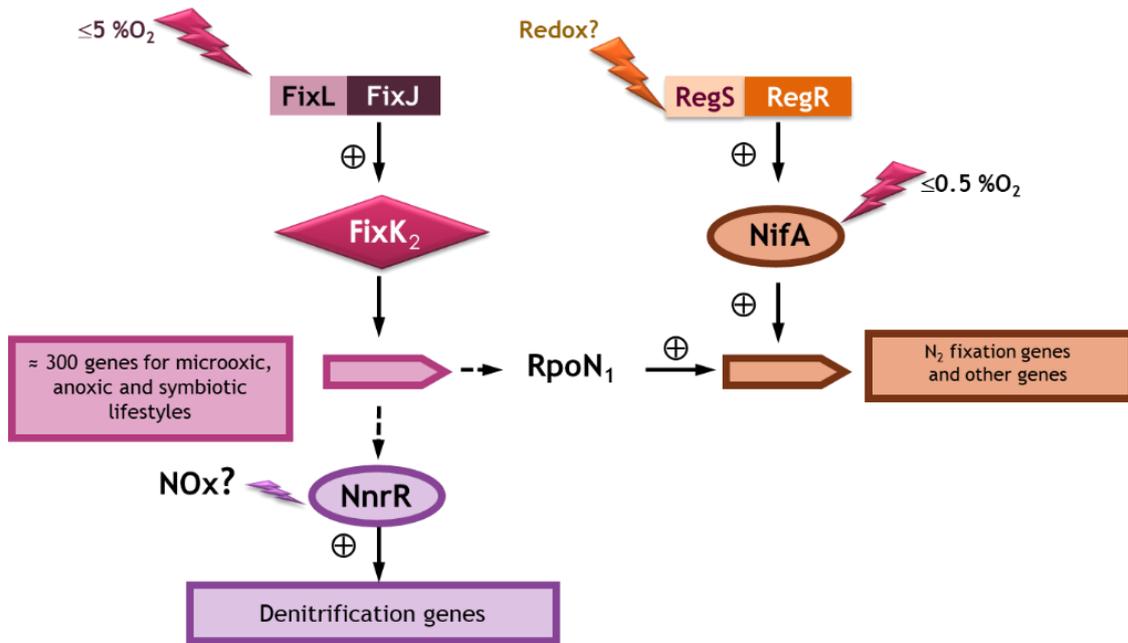


Figura 2.10. Red de regulación presente en *B. diazoefficiens*, compuesta por las cascadas FixLJ-FixK₂-NnrR y RegSR-NifA. (Mesa et al., 2003; Sciotti et al., 2003; Mesa et al., 2008; Bueno et al., 2010, 2017; Torres et al., 2011, 2016 y Fernández et al., 2016).

2.4.1.3. Control diferencial por FixK₂ y NnrR

Como se ha comentado anteriormente, FixK₂ y NnrR pertenecen a la familia de proteínas de tipo CRP/FNR, factores transcripcionales bacterianos que responden a un amplio rango de señales intracelulares y medioambientales (Körner et al., 2003). Estudios basados en la estructura del complejo FixK₂-ADN (Bonnet et al., 2013; apartado 2.3.1), así como deducidos del alineamiento de las cajas FixK₂ de genes controlados directamente por FixK₂ (Mesa et al., 2008; Reutimann et al., 2010 y Bueno et al., 2017) han permitido proponer una secuencia palindrómica de 14 pb, TTG(A/C)-N₆-(T/G)CAA como el sitio de unión de FixK₂. En la región promotora de los genes de la desnitrificación *napEDABC*, *nirK*, *norCBQD* y *nosRZDFYLX* y del gen *nnrR* se localizan secuencias palindrómicas con homología a la caja FixK₂ a las que a priori se podrían unir FixK₂, NnrR o ambas proteínas (caja FixK₂, caja NnrR; apartado 2.3.1; Velasco et al., 2001; Mesa et al., 2002; Delgado et al., 2003; Mesa et al., 2003 y Velasco et al., 2004). Aunque, sólo las cajas asociadas a los genes *napEDABC*, *nosRZDFYLX* y *nnrR* conservan los determinantes moleculares de la unión a FixK₂ de la secuencia consenso.

En *B. diazoefficiens* la inducción de los genes *napEDABC* tiene lugar bajo condiciones de microoxia, independientemente de la presencia de NO_3^- o de un óxido derivado de él (NO_x) y depende principalmente de FixK₂. En experimentos de transcripción *in vitro* (IVT) se ha verificado el control directo de los genes *napEDABC* por FixK₂ en colaboración con la ARNP de *B. diazoefficiens* (Bueno et al., 2017). Sin embargo, NnrR es incapaz de interactuar con la caja FixK₂ del promotor presente en *napEDABC* en ensayos de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) (Bueno et al., 2017).

Igualmente, a lo observado para los genes *napEDABC*, el gen *nirK* se induce significativamente en condiciones de microoxia, sin embargo, sólo se alcanza su máxima expresión en presencia de un NO_x (NO_3^- , NO_2^- , NO ; Bueno et al., 2017). Además, el gen *nirK* es una diana directa de la proteína FixK₂, ya que se detectó un transcrito específico (aunque de intensidad más débil al observado en el caso de los genes *napEDABC*) en ensayos de IVT en presencia de proteína FixK₂, purificada. Una de las razones que podrían explicar esta observación podría deberse a diferencias entre la caja FixK₂ presente en el promotor del gen *nirK* y aquella presente en el promotor de los genes *napEDABC*, así como con la secuencia consenso de la caja FixK₂. Otra de las razones, podría ser la necesidad de otro regulador que actúe en colaboración con la proteína FixK₂. Si bien cabe decir que proteína NnrR recombinante purificada fue incapaz de interactuar con la caja FixK₂ presente en la región promotora de *nirK* (Bueno et al., 2017).

A diferencia de lo descrito en los genes *napEDABC* y *nirK*, los genes *norCBQD* requieren la presencia tanto de microoxia como de un NO_x para su expresión máxima siendo el NO , la molécula señal necesaria para la inducción de los genes *norCBQD* en *B. diazoefficiens* (Bueno et al., 2017). La dependencia de NO para la expresión de *norCBQD* sugiere que NnrR podría tener un papel de activador transcripcional en respuesta a NO de estos genes. De hecho, los niveles de expresión de los genes *norCBQD* en una cepa mutante *nnrR* son basales (Mesa et al., 2003; Bueno et al., 2017). Además, la mutante *nnrR* es incapaz de crecer en anoxia con nitrato (Mesa et al., 2003), posiblemente debido a la acumulación de NO hasta niveles citotóxicos. A diferencia de lo descrito anteriormente para el caso de *napEDABC* y *nirK*, la proteína FixK₂ fue incapaz de iniciar la transcripción desde el

promotor de *norCBQD* en ensayos de IVT. Sin embargo, experimentos de ITC demuestran que NnrR se unió específicamente a la secuencia palindrómica presente en el promotor de los genes *norCBQD* (posible caja NnrR) en condiciones anóxicas.

El conocimiento de la regulación de los genes *nosRZDFYLX* en *B. diazoefficiens* es más escaso, si bien se sabe que, al igual que lo observado en los genes *napEDABC*, *nirK* y *norCBQD* requiere microoxia y la presencia de NO_x para su expresión (Velasco et al., 2004).

Tampoco se ha investigado si FixK₂ es capaz de activar directamente la transcripción del gen *nnrR* de manera que la proteína NnrR podrían colaborar en la activación de algunas de sus dianas (*p. ejem. nirK*).

Los determinantes moleculares que definen la unión discriminatoria entre FixK₂ y NnrR pueden derivarse de diferencias a nivel de proteína o de la secuencia de reconocimiento del ADN (caja FixK₂ o caja NnrR). En este sentido, resulta interesante estudiar el mecanismo molecular implicado en esta regulación diferencial de los genes de la desnitrificación de *B. diazoefficiens* por parte de las proteínas FixK₂ y NnrR.

3

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

B. diazoefficiens es la única bacteria del orden *Rhizobiales* que es capaz no sólo de establecer simbiosis fijadoras de nitrógeno con plantas de soja, sino también de llevar a cabo una desnitrificación completa tanto en vida libre como en simbiosis. Por ello, *B. diazoefficiens* se considera un modelo para estudiar la interrelación entre fijación de nitrógeno y desnitrificación, procesos antagonistas del ciclo del nitrógeno.

Estudios previos realizados en el Grupo de Investigación donde he realizado esta Tesis, han demostraron la implicación de la red de regulación FixLJ-FixK₂-NnrR en el control de la desnitrificación. De hecho, experimentos de transcriptómica de una mutante *fixK₂* cultivada en condiciones microóxicas permitieron identificar entre los genes controlados por FixK₂, algunos de los genes estructurales de las enzimas desnitrificantes (*napEDABC* y *nirK*) y el gen *nnrR*, que codifica el regulador NnrR, necesario para la máxima expresión de los genes de la desnitrificación en respuesta a NO_x (Mesa et al., 2003; Mesa et al., 2008). Además, mediante experimentos de transcripción *in vitro* se ha demostrado que FixK₂ regula directamente los genes *napEDABC* y *nirK* pero es incapaz de activar la transcripción de los genes *norCBQD* (Bueno et al., 2017). Sin embargo, se desconoce, hasta la fecha, si FixK₂ actúa directamente sobre la expresión de los genes *nosRZDFYLX* o el gen *nnrR*. Por otro lado, siendo NnrR un regulador clave en la desnitrificación, no se conoce aún el regulón completo de esta proteína en condiciones desnitrificantes.

Resultados previos a esta Tesis Doctoral (Bueno et al., 2017) han propuesto la existencia de un control diferencial de los genes de la desnitrificación de *B. diazoefficiens* por parte de las proteínas FixK₂ y NnrR. En este control, *napEDABC* y *nirK* son dianas directas de FixK₂, mientras que NnrR es capaz de unirse solamente a la región promotora de los genes *norCBQD*. Sin embargo, se desconocían los determinantes moleculares que discriminan la regulación mediada por FixK₂ y NnrR.

Finalmente, a diferencia de FixK₂ que se ha estudiado en profundidad, el mecanismo molecular por el cual NnrR controla sus dianas en respuesta a NO se desconoce. Se ha demostrado la implicación del hemo como cofactor de otros reguladores con función similar a NnrR como es el caso de DNR de *P. aeruginosa*. Sin

Objetivos

embargo, se desconoce si NnrR podría tener un mecanismo molecular parecido y requerir hemo para activar la expresión de sus dianas en respuesta a NO. De acuerdo a los antecedentes descritos, para esta Tesis Doctoral se plantearon los siguientes objetivos:

1. Identificar y caracterizar nuevos genes controlados por NnrR y FixK₂ implicados en el proceso de desnitrificación de *B. diazoefficiens*.
2. Estudiar el mecanismo molecular de NnrR en respuesta a NO.
3. Identificar los determinantes moleculares a nivel de ADN que discriminan el control mediado por FixK₂ y NnrR.

4

MATERIALES

Y

MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

4.1.1. Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas de *B. diazoefficiens* y *E. coli* usadas en este trabajo se indican en la siguiente tabla (Tabla 4.1), junto a su descripción más relevante.

Tabla 4.1. Cepas bacterianas

Cepas	Descripción relevante	Resistencia	Referencia
<i>E. coli</i>			
DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	-	Bethesda Research Laboratories Inc., Gaithersburg, MD, Estados Unidos
BL21(DE3)	F- <i>opmT</i> <i>hsdS_B</i> (rB- mB-) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3)	-	Novagen Inc.
ER2566	F- λ - <i>fhuA2</i> [<i>lon</i>] <i>ompT</i> [<i>dcm</i>] <i>endA1</i> <i>lacZ</i> ::T7 <i>gene1</i> <i>gal</i> <i>sulA11</i> Δ (<i>mcrC</i> - <i>mrr</i>)114::IS10 R(<i>mcr</i> -73::miniTn10-Tet ^S)2 R(<i>zgb</i> -210::Tn10)(Tet ^S)	-	NEB [®]
S17-1	<i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>recA</i> , <i>hsdR</i> , <i>hsdM</i> , RP4Tc::Mu, Km::Tn7	Tp ^r Sm ^r Sp ^r	Simon et al.,1983
HB101 pRK2013	Vector "helper"	Km ^r	Figurski y Helinski, 1979; Heinze et al., 1980
<i>B. diazoefficiens</i>			
USDA 110	Cepa silvestre	Cm ^r	United States Department of Agriculture, Beltsville, MD, Estados Unidos
110 <i>spc4</i>	Cepa silvestre	Cm ^r Sp ^r	Regensburger y Hennecke, 1983

3447	<i>cycA::Tn5-233</i>	Km ^r Gm ^r	Bott et al., 1995
GRZ3035	<i>nosZ::Ω</i>	Cm ^r Sp ^r Sm ^r	Velasco et al., 2004
9043	<i>fixK₂::Ω</i>	Cm ^r Sp ^r Sm ^r	Nellen-Anthamatten et al., 1998
8678	<i>ΔnnrR::aphII</i>	Cm ^r Sp ^r Km ^r	Mesa et al., 2003
8882	<i>ΔcycS::aphII</i>	Cm ^r Sp ^r Km ^r	Mesa et al., 2008
2003	<i>Δcy₂</i>	Cm ^r Sp ^r	Este trabajo
GRPA1	<i>napA::Ω</i>	Cm ^r Spc ^r Sm ^r	Delgado et al., 2003
GRK308	<i>nirK::Ω</i>	Cm ^r Spc ^r Sm ^r	Velasco et al., 2001
GRN307	<i>hemN₂::Ω</i>	Cm ^r Sp ^r Sm ^r	Fischer et al., 2001
110 <i>spc4</i> -BG0301	<i>nosR-lacZ</i> integrada en el cromosoma de 110 <i>spc4</i>	Cm ^r Sp ^r Tc ^r	Este trabajo
110 <i>spc4</i> -BG0302	<i>nosZ-lacZ</i> integrada en el cromosoma de 110 <i>spc4</i>	Cm ^r Sp ^r Tc ^r	Este trabajo
110 <i>spc4</i> -BG0303	<i>nosD-lacZ</i> integrada en el cromosoma de 110 <i>spc4</i>	Cm ^r Sp ^r Tc ^r	Este trabajo
110 <i>spc4</i> -BG0304	<i>nosR-lacZ</i> integrada en el cromosoma de 110 <i>spc4</i> , caja FixK ₂ completa	Cm ^r Sp ^r Tc ^r	Este trabajo
110 <i>spc4</i> -BG0305	<i>nosR-lacZ</i> integrada en el cromosoma de 110 <i>spc4</i> , caja FixK ₂ parcial	Cm ^r Sp ^r Tc ^r	Este trabajo
110 <i>spc4</i> -BG0306	<i>nosR-lacZ</i> integrada en el cromosoma de 110 <i>spc4</i> , sin FixK ₂	Cm ^r Sp ^r Tc ^r	Este trabajo
GRPA1-BG0301	<i>nosR-lacZ</i> integrada en el cromosoma de GRPA1	Cm ^r Sp ^r Sm ^r Tc ^r	Este trabajo
GRK308-BG0301	<i>nosR-lacZ</i> integrada en el cromosoma de GRK308	Cm ^r Sp ^r Sm ^r Tc ^r	Este trabajo

Materiales y métodos

9043-BG0301	<i>nosR-lacZ</i> integrada en el cromosoma de 9043	Cm ^r Sp ^r Sm ^r Tc ^r	Este trabajo
8678-BG0301	<i>nosR-lacZ</i> integrada en el cromosoma de 8678	Cm ^r Sp ^r Tc ^r	Este trabajo
2499 (U1)	<i>norC-lacZ</i> integrada en el cromosoma de 110 <i>spc4</i>	Cm ^r Sp ^r Tc ^r	Mesa et al., 2003
2499R	<i>norC-lacZ</i> integrada en el cromosoma de 8678	Cm ^r Sp ^r Km ^r Tc ^r	Mesa et al., 2003
2499K2	<i>norC-lacZ</i> integrada en el cromosoma de 9043	Cm ^r Sp ^r Sm ^r Tc ^r	Mesa et al., 2003
2499R-nnrR	<i>norC-lacZ</i> integrada en el cromosoma de 8678 y complementada con pRJ8845	Cm ^r Sp ^R , Tet ^R , Km ^R , Sm ^R	Este trabajo
2499K2-nnrR	<i>norC-lacZ</i> integrada en el cromosoma de 9043 y complementada con pMB1407	Cm ^r Sp ^r Sm ^r Tc ^r Km ^r	Este trabajo
2499hemN2	<i>norC-lacZ</i> integrada en el cromosoma de GRN307	Cm ^r Sp ^r Sm ^r Tc ^r	Este trabajo
110 <i>spc4</i> -MB1370	Cepa parental:: <i>fixN-lacZ</i>	Cm ^r Spc ^r Tc ^r	Este trabajo
110 <i>spc4</i> -MB1373	Cepa parental:: <i>fixN-lacZ</i> (Caja FixK ₂ transversion A11 vs T)	Cm ^r Spc ^r Tc ^r	Este trabajo
110 <i>spc4</i> -MB1374	Cepa parental:: <i>fixN-lacZ</i> (Caja FixK ₂ transversiones A4 vs. T y A11 vs. T)	Cm ^r Spc ^r Tc ^r	Este trabajo
110 <i>spc4</i> -MB1376	Cepa parental:: <i>fixN-lacZ</i> (Caja FixK ₂ transversiones T10 vs. A y A11 vs. T)	Cm ^r Spc ^r Tc ^r	Este trabajo
110 <i>spc4</i> -MB1377	Cepa parental:: <i>fixN-lacZ</i> (Caja FixK ₂ transversiones 1-5 y 10-14)	Cm ^r Spc ^r Tc ^r	Este trabajo
110 <i>spc4</i> -MB1412	Cepa parental:: <i>norC-lacZ</i> parental	Cm ^r Spc ^r Tc ^r	Este trabajo
110 <i>spc4</i> -MB1416	Cepa parental:: <i>norC-lacZ</i> (Caja NnrR transversion T11 vs. A /A4 vs C)	Cm ^r Spc ^r Tc ^r	Este trabajo

4.1.2. Plásmidos

En la siguiente tabla se describen todos los plásmidos empleados para el desarrollo de esta tesis (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Plásmidos

Plásmidos	Descripción relevante	Resistencia	Referencia
pBBR1MSC-2	<i>lacZ mob⁺</i> , vector de clonación	Km ^r	Kovach et al., 1994
pBluescript KS (+)	phagemid excindido de lambda ZAP, vector de clonación	Ap ^r	Stratagene
pGEM-T Easy	<i>lacZ</i> , vector de clonación	Ap ^r	Pomega
pK18 <i>mobsacB</i>	<i>lacZ sacB mob⁺</i> , vector suicida movilizable, derivado de pUC18	Km ^r	Schäfer et al., 1994
pSUP3535	Vector suicida para la construcción de fusiones transcripcionales con el gen <i>lacZ</i>	Tc ^r	Mesa et al., 2003
pTXB1	IMPACT <i>Mxe</i> GyrA Inteína CBD, vector de expresión para purificación de proteínas sin etiqueta mediante la etiqueta de inteína/ dominio de unión a quitina bajo el control del promotor T7	Ap ^r	New England Biolab
pEX_K168 nnrRbox mut 11, 4	(Vector de clonación pEX_K168) fragmento <i>EcoRI-PstI</i> de 243 pb con la caja NnrR del promotor de <i>norC</i> mutada en posición 11 y 4	Km ^r	Eurofins Genomics
pBG0301	(pSUP3535) fragmento <i>EcoRI-PstI</i> de 558 pb con la región 5' de <i>nosR</i>	Tc ^r	Este trabajo

Materiales y métodos

pBG0302	(pSUP3535) fragmento <i>EcoRI</i> de 1024 pb con la región 5' de <i>nosZ</i>	Tc ^r	Este trabajo
pBG0303	(pSUP3535) fragmento <i>EcoRI</i> de 875 pb con la región 5' de <i>nosZ</i>	Tc ^r	Este trabajo
pBG0304	(pSUP3535) fragmento <i>EcoRI</i> de 224 pb con la región 5' de <i>nosR</i> incluyendo la caja FixK ₂ completa	Tc ^r	Este trabajo
pBG0305	(pSUP3535) fragmento <i>EcoRI</i> de 218 pb con la región 5' de <i>nosR</i> incluyendo la caja FixK ₂ incompleta	Tc ^r	Este trabajo
pBG0306	(pSUP3535) fragmento <i>EcoRI</i> de 168 pb con la región 5' de <i>nosR</i> no incluyendo la caja FixK ₂	Tc ^r	Este trabajo
pDB4020	(pRJ9519) fragmento <i>XbaI-EcoRI</i> de 486 pb con el promotor de <i>nosRZDFYLX</i>	Ap ^r	Este trabajo
pMB1122	(pTXB1) fragmento <i>NdeI-BcuI(SpeI)</i> de 727 pb con el gen <i>nnrR</i> clonado en fase con la etiqueta de ínterna/dominio de unión a quitina (CBD) para la expresión y purificación de NnrR sin etiqueta	Ap ^r	Este trabajo
pMB1300	(pBluecript KS [+]) fragmento <i>EcoRI-HindIII</i> de 366 pb con la parte 3' del promotor de <i>fixNOQP</i>	Ap ^r	Este trabajo
pMB1307	(pMB1300) fragmento <i>BamHI-MunI</i> de 777 pb con la parte 5' del promotor de <i>fixNOQP</i> con la caja FixK ₂ mutada en posición	Ap ^r	Este trabajo

pMB1310	(pMB1300) fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Mun</i> I de 777 pb con la parte 5' del promotor de <i>fixNOQP</i> con la caja FixK ₂ mutada en posición 4 y 11	Ap ^r	Este trabajo
pMB1316	(pEX-K4) fragmento <i>Mre</i> I de 1040 pb del promotor de <i>fixNOQP</i> con la caja FixK ₂ mutada en las posiciones de la 1 a la 5 y de la 10 a la 14	Km ^r	Eurofins Genomics
pMB1357	(pMB1300) fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Mun</i> I de 777 pb con la parte 5' del promotor de <i>fixNOQP</i> con la caja FixK ₂ mutada en posición 10 y 11	Ap ^r	Este trabajo
pMB1363	(pRJ9519) fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI de 563 pb del promotor de <i>fixNOQP</i> con la caja FixK ₂ mutada en posición 11	Ap ^r	Este trabajo
pMB1364	(pRJ9519) fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI de 563 pb del promotor de <i>fixNOQP</i> con la caja FixK ₂ mutada en las posiciones 4 y 11	Ap ^r	Este trabajo
pMB1366	(pRJ9519) fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI de 563 pb del promotor de <i>fixNOQP</i> con la caja FixK ₂ mutada en posiciones 10 y 11	Ap ^r	Este trabajo
pMB1367	(pRJ9519) fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI de 563 pb del promotor de <i>fixNOQP</i> con la caja FixK ₂ mutada en las posiciones de la 1 a la 5 y de la 10 a la 14	Ap ^r	Este trabajo

Materiales y métodos

pMB1370	(pSUP3535) fragmento <i>EcoRI-PstI</i> de 566 pb del promotor de <i>fixNOQP</i> , para la construcción de la fusión transcripcional <i>PfixN::lacZ</i>	Tc ^r	Este trabajo
pMB1373	(pSUP3535) fragmento <i>EcoRI-PstI</i> de 566 pb del promotor de <i>fixNOQP</i> con la caja FixK ₂ mutada en posición 11	Tc ^r	Este trabajo
pMB1374	(pSUP3535) fragmento <i>EcoRI-PstI</i> de 566 pb del promotor de <i>fixNOQP</i> con la caja FixK ₂ mutada en las posiciones 4 y 11	Tc ^r	Este trabajo
pMB1376	(pSUP3535) fragmento <i>EcoRI-PstI</i> de 566 pb del promotor de <i>fixNOQP</i> con la caja FixK ₂ mutada en posiciones 10 y 11	Tc ^r	Este trabajo
pMB1376	(pSUP3535) fragmento <i>EcoRI-PstI</i> de 566 pb del promotor de <i>fixNOQP</i> con la caja FixK ₂ mutada en posiciones 10 y 11	Tc ^r	Este trabajo
pMB1377	(pSUP3535) fragmento <i>EcoRI-PstI</i> de 566 pb del promotor de <i>fixNOQP</i> con la caja FixK ₂ mutada en las posiciones de la 1 a la 5 y de la 10 a la 14	Tc ^r	Este trabajo
pMB1400	(pR8870) fragmento <i>BamHI-EcoRI</i> de 258 pb con la región intergénica <i>nnrS-nnrR</i>	Ap ^r	Este trabajo
pMB1401	(pRJ9519) fragmento <i>HindIII-EcoRI</i> de 289 pb con el promotor de <i>cycA</i>	Ap ^r	Este trabajo
pMB1407	(pBBR1MSC-2) fragmento <i>KpnI-BamHI</i> de 770 pb del gen <i>nnrR</i>	Km ^r	Este trabajo

pMB1408	(pBluecript KS [+]) fragmento <i>HindIII-PstII</i> de 1098 pb con el promotor de <i>norC</i> procedente de pRJ2499	Ap ^r	Este trabajo
pMB1409	(pMB1408) mutación de la caja NnrR del promotor <i>norC</i> en posición 11 por QuikChange	Ap ^r	Este trabajo
pMB1412	(pSUP3535) fragmento <i>EcoRI-PstI</i> de 243 pb procedente de pMB1408 con la caja NnrR del promotor <i>norC</i> parental para la construcción de la fusión transcripcional <i>PnorC::lacZ</i>	Tc ^r	Este trabajo
pMB1413	(pSUP3535) fragmento <i>EcoRI-PstI</i> de 243 pb procedente de pMB1409 con la caja NnrR del promotor de <i>norC</i> mutado en la posición 11, para la construcción de la fusión transcripcional <i>PnorC::lacZ</i>	Tc ^r	Este trabajo
pMB1414	(pRJ9519) fragmento <i>EcoRI-HindIII</i> de 243 pb procedente de pMB1408 con la caja NnrR parental del promotor de <i>norC</i>	Ap ^r	Este trabajo
pMB1415	(pRJ9519) fragmento <i>EcoRI-HindIII</i> de 243 pb procedente de pMB1409 con la caja NnrR del promotor de <i>norC</i> mutado en la posición 11	Ap ^r	Este trabajo

Materiales y métodos

pMB1416	(pSUP3535) fragmento <i>EcoRI</i> - <i>PstI</i> de 243 pb procedente de pEX_K168 nnrRbox mut, con la caja NnrR del promotor de <i>norC</i> mutado en la posición 11 y 4, para la construcción de la fusión transcripcional <i>PnorC::lacZ</i>	Tc ^r	Este trabajo
pMB1417	(pRJ9519) fragmento <i>EcoRI</i> - <i>HindIII</i> de 243 pb procedente de pEX_K168 nnrRbox mut, con la caja NnrR del promotor de <i>norC</i> mutado en la posición 11 y 4	Ap ^r	Este trabajo
pMB2000	(pGEM-T easy) fragmento de PCR de 614 pb con la región 5' flanqueante del gen <i>cy2</i>	Ap ^r	Este trabajo
pMB2001	(pGEM-T easy) fragmento de PCR de 609 pb con la región 3' flanqueante del gen <i>cy2</i>	Ap ^r	Este trabajo
pMB2002	(pK18 <i>mobsacB</i>) fragmento <i>BamHI/EcoRI</i> de 615 pb procedente de pMB2000	Km ^r	Este trabajo
pMB2003	(pMB2002) fragmento <i>BamHI/PstI</i> de 634 pb procedente de pMB2001	Km ^r	Este trabajo
pRJ0004	[pET-24c(+)] fragmento <i>NdeI</i> - <i>NotI</i> de 701 pb codificando el derivado C183S-FixK ₂ -His ₆	Km ^r	Bonnet et al., 2013
pRJ2499	(pSUP3535) fragmento <i>EcoRI</i> de 4046 pb con el promotor <i>norC</i> para la construcción de la fusión transcripcional <i>PnorC::lacZ</i>	Tc ^r	Mesa et al., 2003
pRJ8816	(pRJ9519) fragmento <i>BamHI</i> - <i>EcoRI</i> de 563 pb del promotor de <i>fixNOQP</i>	Ap ^r	Mesa et al., 2005

pRJ8817	(pRJ9519) promotor <i>fixGHIS</i> en un fragmento <i>XbaI-EcoRI</i> de 524 pb	Ap ^r	Mesa et al., 2005
pRJ8845	(pPP375Ω.1) fragmento <i>XbaI-HindIII</i> de 1474 pb con el gen <i>nnrR</i> procedente de pRJ8841	Sm ^r Sp ^r	Tesis de Eloy
pRJ8870	(pRJ9519) fragmento <i>SacII-XbaI</i> de 210 pb con un segundo terminador <i>rrn</i> de <i>B. diazoefficiens</i> clonado en los sitios <i>SacII</i> y <i>XbaI</i>	Ap ^r	Mesa et al., 2008
pRJ9519	[pBluescript SK(+)] fragmento <i>BstXI-KpnI</i> de 308 pb con el terminador <i>rrn</i> de <i>B. diazoefficiens</i> clonado en los sitios <i>HincII</i> y <i>KpnI</i>	Ap ^r	Beck et al., 1997
pRJ9601	[pBluescript SK(+)] fragmento <i>SacI-SmaI</i> de 468 pb con el promotor y terminador <i>rrn</i> de <i>B. diazoefficiens</i>	Ap ^r	Beck et al., 1997

4.1.3. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos empleados para el desarrollo de este trabajo se enumeran en la siguiente tabla (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Oligonucleótidos.

Nombre Oligonucleótido	Gen	Secuencia ADN (5' → 3')	Referencia
Mutagenesis			
Amplificación de la region 5' flanqueante de <i>cy2</i>			
BLL1F	<i>cy2</i>	GCTCTAGAGCACTAGTCGGTCAGTCCCTTCTCCTTT	Este trabajo
BLL1R	<i>cy2</i>	CGGGATCCCGGCATGAGCACGAAGATCAGA	Este trabajo
Amplificación de la region 3' flanqueante de <i>cy2</i>			
BLL2F	<i>cy2</i>	CGGGATCCCGCCAATGTCATCGCCTATCT	Este trabajo

Materiales y métodos

BLL2R	<i>cy2</i>	CGGAATTCCGGATCATGCCCGATGTCTGT	Este trabajo
qRT-PCR			
norC_3_for	<i>norC</i>	GCAGATGCCGCAGTTCAAC	Este trabajo
norC_3_rev	<i>norC</i>	TGATCGTGCTCACCCATTG	Este trabajo
nosR_qRT_PCR_F	<i>nosR</i>	ATGATCCAGGTGCGGCTGAAG	Este trabajo
nosR_qRT_PCR_R	<i>nosR</i>	CCGGCTGTGATGATTGTGTTCG	Este trabajo
cycA_for_1	<i>cycA</i>	AACAAGAATTCGGGCATCAC	Torres et al., 2014
cycA_rev_1	<i>cycA</i>	TGATCTCGGTCTCGTTCTTG	Torres et al., 2014
SigA-1069F	<i>sigA</i>	GAGATCATCGTCGAGGTGAAG	Lindemann et al., 2007
SigA-1155R	<i>sigA</i>	GCGCTTGTTGATGTCGTAGA	Lindemann et al., 2007
bll2388_for	<i>cy2</i>	GAATGTCATCGACCGCAAG	Torres et al., 2014
bll2388_rev	<i>cy2</i>	TTGCATCAGAATAGGCGAAG	Torres et al., 2014
rpoN1-qRT-for	<i>rpoN1</i>	TAACTTGCGGAGTGCCTG	Este trabajo
rpoN1-qRT-rev	<i>rpoN1</i>	CTTGCGGAGGAGATCGAGATG	Este trabajo
16S_qRT_For	<i>16s</i>	GCAGGCTTAACACATGCAAGTC	Este trabajo
16S_qRT_Rev	<i>16s</i>	AGGTACGTTCCCACGCGTTACTC	Este trabajo
Molde IVT			
cycA_1_for_IVT	<i>cycA</i>	ATAGAATTCGCCAGCACTGCCTGGTC	Este trabajo
cycA_1_rev_IVT	<i>cycA</i>	CGCAAGCTTAAGGGTGCTCTTCGTCTCTTCC	Este trabajo
nnrR_6_for	<i>nnrR/ nnrS</i>	ATAGGATCCAGCGGCCAGCCCGCAAAGTTG	Este trabajo
nnrR_6_rev	<i>nnrR/ nnrS</i>	ATAGAATTCAGGGCTTCCGGCGTGACCC	Este trabajo
bll3466_3_for	bll3466	CGGAATTCACCTCCGGCTCGGGTCCGGTTTAC	Este trabajo
bll3466_3_rev	bll3466	ATGGATCCGCAGGTCCTGCGAGGATGCATAG	Este trabajo
nosR_For_Transc	<i>nosR</i>	AAATCTAGAGGCGCGATTGTGACCATCTTGC	Este trabajo
nosR_Rev_Transc	<i>nosR</i>	AAAGAATTCGGACGAGAGCACGCAAAGGAAC	Este trabajo
fixN4_for	<i>fixN</i>	CGGGATCCCGACTCCTATCCGGTCGAGGAC	Mesa et al., 2005

fixN4_rev	<i>fixN</i>	CGGAATTCCGGGTCATGGATTGGAGATGG	Mesa et al., 2005
Resonancia de plasmón de superficie			
fixN3-for	<i>fixN</i>	CCACCTATCTTGATTTCAATCAATTCCCCG	Este trabajo
fixN3-rev-biot	<i>fixN</i>	(Biot)CGGGGAATTGATTGAAATCAAGATAGGTGG	Este trabajo
fixn23-for	<i>fixN</i>	CCACCTATCCCAGCTTCAGCTGGTTCCCCG	Este trabajo
fixN23-rev-biot	<i>fixN</i>	(Biot)CGGGGAACCAGCTGAAGCTGGGATAGGTGG	Este trabajo
fixN24-for	<i>fixN</i>	CCACCTATCTTGATTTCAAACAATTCCCCG	Este trabajo
fixN24-rev-biot	<i>fixN</i>	(Biot)CGGGGAATTGTTTGAATCAAGATAGGTGG	Este trabajo
fixN25-for	<i>fixN</i>	CCACCTATCAACTATTCATAGTTTTCCCCG	Este trabajo
fixN25-rev-biot	<i>fixN</i>	(Bio)CGGGGAAAACCTATGAATAGTTGATAGGTGG	Este trabajo
fixN26-for	<i>fixN</i>	CCACCTATCTTGATTTCATACAATTCCCCG	Este trabajo
fixN26-rev-biot	<i>fixN</i>	(Biot)CGGGGAATTGTATGAAATCAAGATAGGTGG	Este trabajo
norC_4_for	<i>norC</i>	ACGCGCTCATTGCGCCCTGACAAAGAACCGGC	Este trabajo
norC_4_rev	<i>norC</i>	(Biot)GCCGGTTCTTTGTCAGGGCGCAATGAGCGCGT	Este trabajo
norC_5_for	<i>norC</i>	ACGCGCTCATTGCGCCCTGTCAAAGAACCGGC	Este trabajo
norC_5_rev	<i>norC</i>	(Biot)GCCGGTTCTTTGACAGGGCGCAATGAGCGCGT	Este trabajo
norC_6_for	<i>norC</i>	ACGCGCTCATTGAGCCCTGTCAAAGAACCGGC	Este trabajo
norC_6_rev	<i>norC</i>	(Biot)GCCGGTCTTTGACAGGGCTCAATGAGCGCGT	Este trabajo
RT-PCR co-transcripción			
a1		CGTAGGACCAGAATGCCAAGG	Este trabajo
a2		CGACAGGTAACCGTTCAGG	Este trabajo
b1		TTCTGCGGTTGGCTCTG	Este trabajo
b2		TTTGTTACCACCGCCCC	Este trabajo
c1		CGGCCTACGACGGCAAGGG	Este trabajo
c2		CAGCAGTCAGCGTCTCC	Este trabajo
d1		GGAGGGCGGAAGATGAG	Este trabajo

Materiales y métodos

d2		GGAGTTGCGAGATCGAG	Este trabajo
e1		CTCGATCTCGCAACTCC	Este trabajo
e2		ATTGAGGAACAGCAGCG	Este trabajo
f1		CGCTGCTGTTCTCAAT	Este trabajo
f2		CCTGCTTGCGGCTCTCG	Este trabajo
g1		CGAGAGCCGCAAGCAGG	Este trabajo
g2		CTGCTGCCACCTTCGC	Este trabajo
h1		GGCACCAGCAAATCTCA	Este trabajo
h2		CTTGAAAAGCGTGTGTGCG	Este trabajo
5'RACE			
SP1_nosR	<i>nosR</i>	GGAATAGCCGACCGCATTGG	Este trabajo
SP2_nosR	<i>nosR</i>	GCGTCTAGAGACGCGGTGTTGAAGGACGAG	Este trabajo
(dT) ₁₇ -adaptor-primer	<i>nosR</i>	GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	Este trabajo
adaptor-primer	<i>nosR</i>	GACTCGAGTCGACATCG	Este trabajo
SP6	<i>nosR</i>	ATTTAGGTGACACTATAG	Este trabajo
Fusiones transcripcionales			
PnosR.r	<i>nosR</i>	GGGACCTCGAACGTGAAC	Este trabajo
PnosZ.f	<i>nosZ</i>	GGATGCGGATATGGCGCG	Este trabajo
PnosZ.r	<i>nosZ</i>	GATTGCCTCCTCGGCTTTTCG	Este trabajo
PnosRfull.f	<i>nosR</i>	CTTGATCCAGCGCAAACACTC	Este trabajo
PnosRhalf.f	<i>nosR</i>	ATCCAGCGCAAACACTCTTTTCG	Este trabajo
PnosRno.f	<i>norR</i>	CCTGCGTCAACGGCGACTTC	Este trabajo
fixN28_for	<i>fixN</i>	TCAGAATTCACCTCTATCCGGTCGAGGAC	Este trabajo
fixN28_rev	<i>fixN</i>	TCGCTGCAGTCAGGTCATGGATTTGGAGATGG	Este trabajo
Complementación con el gen <i>nnrR</i>			
nnrR_7_for	<i>nnrR</i>	CTGGGTACCATGAGGTGCCATCACACTCCAGAG	Este trabajo

nnrR_7_rev	<i>nnrR</i>	ATAGGATCCAACCTGCCGGCGCAGCCATC	Este trabajo
pPP375_for		GCTATCACCATCATGCAGAC	Este trabajo
pPP375_rev		GGGCATTCTTGGCATAGT	Este trabajo
Construcción del plásmido de expresión de NnrR -pMB1122			
nnrR-8_for	<i>nnrR</i>	GCGCATATGGCCAAGGTCGACACATCGC	Este trabajo
nnrR-8_rev	<i>nnrR</i>	GATACTAGTGCATCTCCCGTGATGCATGGCGGCCGCTGTCC GGGCTCC	Este trabajo
pTXB1_1		GGGAATTGTGAGCGGATAAC	Este trabajo
pTXB1_2		ATTGCCATGCCGGTCAAG	Este trabajo
Mutagénesis puntual dirigida (QuickChange™)			
Mutagénesis promotor <i>norC</i>			
norC8_For		GCGAAGCTTGGATCGTGCTCGATTTCTC	Este trabajo
norC8_Rev		CCGCTCACAATTCTGCAGGTC	Este trabajo
norC9_mut_For		GACGCGCTCATTGCGCCCTGTCAAAGAACCGGCCGCGGAAG	Este trabajo
norC9_mut_Rev		CTTCGCGCGGCCGGTTCTTTGACAGGGCGCAATGAGCGCGTC	Este trabajo
norC11_For		ACAGAATTCGGATCGTGCTCGATTTCTC	Este trabajo
norC11_rev		ACACTGCAGGCCATTGCCAATCCTTTCCG	Este trabajo
norC12_rev		ACGAAGCTTGCCATTGCCAATCCTTTCCG	Este trabajo
M13For		GTAAAACGACGGCCAGT	Sigma
M13Rev		AACAGCTATGACCATGATTACG	Sigma
Mutagénesis promotor <i>fixN</i>			
fixN7_for		AAAGAATTCCTCCGCGAGGGTGAATGTGG	Este trabajo
fixN7_rev		AAAAAGCTTCGACGAGGAAGCCGGCAATG	Este trabajo
fixN8_for		AAAGGATCCATTGGAGCAGGTCGCCGGCGACGTCGGAGC	Este trabajo
fixN11_rev		AAA CAA TTGTTTGAATCAAGATAGGTGGATTTCTG	Este trabajo
fixN12_rev		AAACAATTGTTTGAACAAGATAGGTGGATTTCTG	Este trabajo
fixN27_rev		AAA CAA TTGTATGAAATCAA GATAGGTGGATTTCTG	Este trabajo

Otros		
nosRfusion_Pr_Ext_for	ACGCCGTTTCCTTCCTCAGTGTC	-
lacZ_rv	CCTCTTCGCTATTACGCCAG	-
pSUP3535_1	ACTGCCGGAAATCGTCGTGG	-

4.1.4. Medios de cultivo

Los medios de cultivo para *E. coli* y para *B. diazoefficiens* requeridos para el desarrollo de este trabajo se detallan en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Composición, uso y referencia de los medios de cultivos usados en esta tesis.

Medio de cultivo	Composición para 1 l de H ₂ O	Uso	Referencia
<i>E. coli</i>			
LB (Luria-Bertani)	NaCl 5 g; Triptona 10 g; Extracto de levadura 5 g	Rutina	(Miller, 1972)
<i>B. diazoefficiens</i>			
PSY (Peptone-salts-yeast extract)	KH ₂ PO ₄ 0,3 g; Na ₂ HPO ₄ 0,3 g; CaCl ₂ ·H ₂ O 0,05 g; MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,1 g; extracto de levadura 1 g; peptona 3 g; **solución (100×) de elementos traza 10 ml; *L-arabinosa 0,1%. pH 7	Rutina	(Regensburger and Hennecke, 1983), modificado en (Mesa et al., 2008)
YEM (Yeast extract mannitol)	Manitol 5 g; NaCl 0,1 g; extracto de levadura 1 g; K ₂ HPO ₄ 0,5 g; MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,2 g, pH 7	Rutina	(Daniel y Appleby, 1972)

La preparación de medios de cultivo sólidos se lleva a cabo adicionando 15 g de agar bacteriológico por litro de medio, tras la medición del pH del medio.

La esterilización de los medios tiene lugar en autoclave a 121°C durante 20 min. La adición de la arabinosa al medio PSY se realiza tras el autoclavado, al igual que los antibióticos en todos los casos.

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

4.1.5. Antibióticos

La adición de antibióticos a los medios de cultivo se realiza a partir de soluciones concentradas de los mismos en H₂O y posterior esterilización con unidades de filtración Minisart® NML (Sartorius) de 0,2 µm de tamaño de poro. En el caso de las soluciones de tetraciclina y de cloramfenicol no es necesaria la esterilización por filtración ya que se emplea alcohol o una mezcla hidroalcohólica para disolverlos. La concentración final de los distintos antibióticos es la que se indica en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5. Antibióticos.

Nombre		Cultivos de <i>B. diazoefficiens</i>		Cultivos de <i>E. coli</i> (liq. y sol.) (µg/ml)
		Líquido (µg/ml)	Sólido(µg/ml)	
Tetraciclina *	Tc	25	50	10
Espectinomicina	Sp	100	200	25
Cicloheximida	Chx	100		
Sulfato de kanamicina	Km	100	200	20
Sulfato de estreptomicina	Sm	100	200	25
Ampicilina	Ap	-	-	200
Cloramfenicol**	Cm	20	20	50
Gentamicina	Gm	100	100	30

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

4.1.6. Soluciones

Todas las soluciones y tampones empleados para este trabajo se detallan en la siguiente tabla (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Composición y uso de las soluciones usadas en esta Tesis doctoral.

Solución	Composición	Uso
Tampón de fraccionamiento	Tris-HCl 50 mM; pH 7,5	
AEBSF	4-[2-Aminoethyl] benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (Sigma) 1 mM	Obtención de fracción soluble y de membranas
ADNasa I	“DNase I” (Sigma) 20 µg/ml	
Tampón Z	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 60 mM; NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 40 mM; KCl 10 mM; MgSO ₄ 1mM. pH 7. El día que se va a utilizar β-mercaptoetanol 50 mM.	Determinación de actividad β-galactosidasa
Solución de ONPG	<i>orto</i> -nitrofenil-β-D-galactopiranosido, 4 mg/ml (en tampón Z)	
APS	Persulfato amónico (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈) 10%	
Gel de resolución PAGE-SDS 14%	H ₂ Od 1,31 ml; Tris-HCl 1,5M pH 8,8, 1,25 ml; acrilamida 30% (37,5:1), 2,34 ml; SDS 10%, 50 µl; APS 10% (preparado fresco), 31,25 µl; TEMED 6,6 M, 2,5 µl	
Gel de resolución PAGE-SDS 18%	H ₂ Od 0,65 ml; Tris-HCl 1,5M pH 8,8, 1,25 ml; acrilamida 30% (37,5:1), 3 ml; SDS 10%, 50 µl; APS 10% (preparado fresco), 50 µl; TEMED 6,6 M, 5 µl	PAGE-SDS
Gel de empaquetado PAGE-SDS 4%	H ₂ Od, 0,91 ml; Tris-HCl 0,5M pH 6,8, 0,375 ml; acrilamida 30% (37,5:1), 0,2 ml; SDS 10%, 15 µl; APS 10% (fresco), 30 µl; TEMED 6,6 M, 1,25 µl	
Tampón de desarrollo PAGE-SDS	Glicina 14,41 g/l; Tris-Base 3,03 g/l; SDS 1 g/l	Electrolito para el desarrollo de electroforesis PAGE-SDS
Tampón de carga de proteínas (citocromos c)	Tris-HCl 350 mM, pH 6,8, 30% glicerol, DTT 20 mM,, SDS 350 mM, azul de bromofenol 0,02 %	Detección de citocromos tipo c
Solución de Coomassie	Coomassie Brilliant Blue R250 1 g, metanol 400 ml, ácido acético 100 ml, H ₂ Od hasta 500 ml	
Solución de desteñido	Metanol 250 ml, ácido acético 100 m, H ₂ Od hasta 650 ml	Detección de proteínas en gel con Coomassie
Tampón de carga de proteínas (inmunodetección)	Tris-HCl 280 mM, pH 6.8, 20% glicerol, DTT 480 mM, SDS 350 mM, azul de bromofenol 0,02 %	Ensayo de inmunodetección
TBS	Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM	

TTBS	TBS, 0,1 % Tween 20	
Tampón de bloqueo	TTBS , leche en polvo descremada 7,5 %	
Solución TENS	NaOH 0,1M; SDS 0.5%; ARNasaA en TE 1 µl	
TE	Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM. pH 8	"Minipreps" TENS
Solución ARNasa A	2 mg/ml de ARNasa A en Tris-HCl 10 mM pH 7,4; NaCl 0.1 M, 20% glicerol y hervir 10 min (para eliminar ADNasas)	
Solución de lavado ("minipreps" de <i>B. diazoefficiens</i>)	NaCl 1M; 1% Sarcosil	
Solución MAXI ("minipreps" de <i>B. diazoefficiens</i>)	Tris-HCl 25 mM; glucosa 50 mM ;EDTA 10 mM, pH 8	Aislamiento de plásmidos de <i>B. diazoefficiens</i>
Solución de lisis ("minipreps" de <i>B. diazoefficiens</i>)	NaOH 0,2 M; SDS 1%	
Solución de neutralizado ("minipreps" de <i>B. diazoefficiens</i>)	Acetato sódico 3 M; equilibrado con ácido acético glacial a pH 4,8	
TBE 0,5×	Tris-HCl 45 mM; borato 45 mM; EDTA 1 mM, pH 8	Electroforesis en geles de agarosa
Tampón de carga de ADN 6×	40% sacarosa; 0,025% azul de bromofenol	
TBE 1×	Tris-HCl 90 mM; borato 90 mM; EDTA 2 mM, pH 8	Electroforesis en geles de agarosa para ADNc
TAE 1×	Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8	Electroforesis en geles de agarosa para ARN
H₂Od-DEPC	H ₂ Od, DEPC 0,1 % (en agitación 24 h y autoclavar posteriormente)	
Solución Stop	10% fenol equilibrado; en etanol, pH 8	Extracción de ARN
Tampón A	NaOAc 20 mM (pH 5,5); EDTA 1 mM (pH 8) en H ₂ Od-DEPC*	
Tampón TFB1	Acetato potásico 30 mM, MnCl ₂ ·4H ₂ O 50 mM, RbCl 100 mM, CaCl ₂ ·2H ₂ O 10 mM, glicerol 15%. pH 5,8	Preparación células competentes de <i>E. coli</i>
Tampón TFB2	MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl ₂ ·2H ₂ O 75 mM, glicerol 15%. pH 6,8. Preservar de la luz	
Tampón de IVT 5×	Tris-HCl 40 mM pH 8, MgCl ₂ 10 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 0,1 mM, KCl 150 mM, K ₃ PO ₄ 0,4 mM	IVT
Solución Sanger	95% formamida, EDTA 40 mM pH 8, azul de bromofenol 0,05%, xylene cyanol 0,05%	
Solución de lavado celular	Tris-HCl 10 mM, pH 8, NaCl 20 mM, glicerol 10%	Purificación de ARN polimerasa <i>B. diazoefficiens</i>
Tampón TGED	Tris-HCl 10 mM, pH 8, glicerol 10%, EDTA 1 mM, DTT 0,1 mM	
TBE 10×	900 mM Tris-HCl; 900 mM borato; 20 mM EDTA, pH 8	Electroforesis en gel de

Materiales y métodos

		secuenciación (IVT)
Tampón de Inmovilización	Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM	
Tampón de activación	NaCl 1M, NaOH 50 mM	Resonancia de plasmón de superficie
Tampón de limpieza	NaCl 1 M, NaOH 50 mM, Isopropanol 50%	
Tampón de desarrollo Biacore	Tris-HCl 40 mM pH 7, KCl 150 mM, EDTA 0,1 mM, Tween20 0,005%	
“Binding buffer”	Tris-HCl 20 mM pH 7.9, NaCl 500 mM, imidazol 5 mM, glycerol 10%	Purificación FixK ₂ -His ₆
“Happy buffer”	Tris-HCl 40 mM pH 7.0, KCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, (DTT 0.1 mM opcional), (MgCl ₂ 10 mM opcional para interacción proteína-ADN)	Tampón de trabajo para FixK ₂ -His ₆
“Column buffer”	Na-HEPES 20 mM pH 8,5, NaCl 500 mM, EDTA 1 mM	Purificación NnrR. Sistema IMPACT
Tampón de reconstitución	Fosfato sódico 40 mM pH 7,5, NaCl 300 mM	Titulación y reconstitución de NnrR con hemina
Tampón 2× SSC	NaCl 17,53 g, Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ (citrato sódico) 8,82 g, H ₂ O hasta 1 l, pH 7 (filtrar o autoclavar)	IVT con ³ H
Solución stock IPTG	IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) 200 mg/ml (840 mM). Disuelto en H ₂ O y esterilizada mediante filtración. Se conserva a -20°C en oscuridad.	Expresión de proteínas

*Para el tratamiento con DEPC (dietil pirocarbonato) de las soluciones acuosas (no detergentes) empleadas en la extracción de ARN, se añade 0,1 % de DEPC, se agitan vigorosamente durante una noche y se autoclavan al día siguiente.

4.1.7. Síntesis de NO

Para la obtención de una solución acuosa saturada de NO se siguen los pasos descritos por Bricio et al., 2004. Todo el proceso se realiza en campana de extracción de gases. Preparar, por un lado, dos tubos Vacutainer (BD) de 5 ml de capacidad, uno con 3 ml de H₂O acidificada a pH 3 y otro con 3 ml de una solución de KOH 10 M. Por otro lado, en un tubo de 17 ml de capacidad, pesar 0,25 g de NaNO₂ y cerrarlo herméticamente con un tapón de goma perforable para, a continuación, realizarle el vacío conectándolo a una bomba de vacío durante 3 min. Una vez preparados los tres tubos, en el tubo con el NaNO₂ se inyectan 3 ml de una solución de FeSO₄ 1 M y H₂SO₄ 1,5 M, que junto con el nitrito reaccionan para generar NO gas. Cuidadosamente, con una jeringa de 20 ml de capacidad, tomar unos 10 ml de la fase gaseosa y transferirlos al tubo con KOH, agitarlo ligeramente, y a continuación

transferir 7 ml de gas al tubo con H₂O a pH 3, el cual se agita ligeramente y se deja reposar durante unos minutos para que la solución acuosa se sature de NO, alcanzando una concentración aproximada de 1,91 mM a 20°C.

4.2. Métodos microbiológicos

4.2.1. Conservación de cepas bacterianas

La conservación de las cepas bacterianas usadas en este estudio se ha realizado en criotubos con suspensiones bacterianas procedentes de cultivos en fase logarítmica mezclados con glicerol estéril hasta obtener una concentración de glicerol del 50%. Para obtener dichas suspensiones, se inoculan 10 ml de LB, para *E. coli* o 20 ml de PSY, para *B. diazoefficiens*, con los correspondientes antibióticos, con una sola colonia aislada procedente de una placa fresca. Los cultivos de *E. coli* se incuban a 37°C durante una noche, mientras que los de *B. diazoefficiens* se dejan crecer durante 4 – 5 días. Una vez crecidos los cultivos, se centrifugan y se lavan con el mismo medio, sin antibiótico. Los pellets se resuspenden en 2,25 ml de medio y se alicuotan en tres criotubos independientes, uno para uso individual que se conserva a -20°C y dos para la colección del grupo a -80°C.

4.2.2. Cultivo de células de *B. diazoefficiens*

4.2.2.1. Cultivos de rutina en medio sólido y líquido

Los cultivos en medio sólido de *B. diazoefficiens* se inician, de forma rutinaria, a partir de los criotubos conservados de las cepas. Con asa de siembra se estrían en placas de medio PSY sólido con los antibióticos adecuados. Se dejan incubar a 30°C durante 4 – 5 días. Los precultivos líquidos se obtienen a partir de la inoculación de 3 colonias aisladas de cultivos sólidos en matraces de 200 ml que contienen 50 ml de medio PSY líquido con los antibióticos pertinentes. Las células se incuban a 30°C, en un agitador orbital a 170 rpm, durante 4 días, hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) ≈ 1.

Los precultivos líquidos se centrifugan y se lavan con el medio donde se inoculan posteriormente y los pellets resultantes se resuspenden en 1/20 del volumen inicial. A continuación, se determina la DO₆₀₀ de diluciones 1:20 de las suspensiones celulares concentradas obtenidas.

4.2.2.2. Cultivos óxicos

Los cultivos óxicos se inician a partir de cultivos líquidos de rutina, de manera que se inoculan matraces de 250 ml con 50 ml de medio YEM o PSY cerrados con tapón de algodón a una DO_{600} inicial de 0,02 que se incuban posteriormente a 30°C en un agitador orbital a 170 rpm. El crecimiento de los cultivos se comprueba rutinariamente midiendo la DO_{600} de alícuotas de 1 ml extraídas en condiciones estériles, frente a un blanco de medio sin inocular.

4.2.2.3. Cultivos microóxicos

Para cultivar *B. diazoefficiens* en condiciones limitantes de oxígeno, se pueden utilizar tubos de 17 ml o matraces de 500 ml tapados con tapón de goma perforable y manteniendo en ambos casos la proporción 1:5 entre medio líquido y fase gaseosa. La fase gaseosa se reemplaza por una mezcla de gases al 2% de O_2 en 98% de N_2 . Los tubos se gasean durante 3 min, mientras que los matraces de 500 ml se gasean 10 min. Se emplean filtros MiniStart NML (Sartorius) de 0,2 μm de tamaño de poro, para evitar posibles contaminaciones durante el proceso de gaseado. La renovación de la atmósfera gaseosa se realiza a intervalos de 8 y 16 h. Estos cultivos se inoculan a una DO_{600} de 0,02 o de 0,2 (en el caso de inducciones) para posteriormente ser incubados en agitación (170 rpm) a 30°C durante 7 – 10 días para curvas de crecimiento y 24 h para el caso de actividades enzimáticas.

4.2.2.4. Cultivos anóxicos

En el contexto microbiológico, el término de anoxia se emplea para indicar la eliminación de la mayor parte de oxígeno disponible en el cultivo, sin que deba ser ausencia total de oxígeno. Para ello se emplean tubos de 17 ml o botes de 250 ml enrasados hasta su máxima capacidad y cerrados herméticamente, de esa forma es el cultivo el que consume el posible oxígeno y queda en anoxia al poco tiempo de comenzar la incubación. Los tubos o botes se inoculan a una DO_{600} inicial de 0,02 para curvas de crecimiento, o de 0,2 para pruebas enzimáticas, experimentos de inmunodetección y detección de citocromos de tipo *c*. Una vez inoculados, se incuban a 30°C a 80 rpm durante 24 h o 48 h (a excepción de las curvas de crecimiento, en las que se hace un seguimiento de los cultivos por un periodo de 7 – 10 días).

4.2.2.5. Incubación de células en condiciones microóxicas y anóxicas en presencia de nitrato

Puesto que algunas de las cepas mutantes de *B. diazoefficiens* usadas en este estudio son incapaces de crecer en condiciones de microoxia y anoxia con nitrato como aceptor final de electrones, para los experimentos realizados con estas cepas se emplearon cultivos que se inocularon a una DO_{600} inicial de 0,2.

4.2.2.6. Cultivos para la extracción de ARN

Los cultivos para la extracción de ARN se inician a partir de cultivos líquidos de rutina. Se inoculan botes de 250 ml enrasados con medio de cultivo para extracción de ARN en condiciones de anoxia. En el caso de condiciones de microoxia se utilizan matraces de 500 ml, con 100 ml de medio, cerrados con tapón de goma perforable y gaseados con 2% de O_2 en 98% de N_2 durante 10 min, con un reemplazo de la fase gaseosa cada 8 – 16 h. Para condiciones de oxia se usan también matraces de 500 ml con 100 ml de YEM, cerrados con tapón de algodón. En todos los casos el medio de cultivo usado es YEM, con los antibióticos correspondientes y suplementado o no con 10 mM de NO_3^- . La inoculación se realiza a una DO_{600} inicial de 0,2 y se incuban los cultivos a 30°C en un agitador orbital a 170 rpm (oxia y microoxia) ó a 80 rpm (anoxia) durante 24 h, de manera que alcanzan una DO_{600} de 0,4 – 0,6 para la cepa parental y de 0,3 – 0,4 para las cepas mutantes.

4.2.3. Obtención de fracciones solubles (citosol) y de membranas de *B. diazoefficiens*

Para obtener las fracciones solubles y de membrana de cultivos de *B. diazoefficiens* se lleva a cabo la rotura de las células por diferencia de presión, usando una Prensa de French (SLM). Para ello, los cultivos de *B. diazoefficiens* se centrifugan a $5.500 \times g$ durante 7 min a 4°C y los pellets que se obtienen se lavan con tampón de fraccionamiento (Tabla 4.6) para finalmente ser resuspendidos en 1 ml del mismo tampón suplementado con 1 mM de AEBSF (4-[2-Aminoethyl] benzenesulfonyl fluoride hydrochloride) (Tabla 4.6) y ADNasa I (20 ug/ml) (Tabla 4.6). La suspensión celular se aplica sobre la célula de la prensa previamente ensamblada y enfriada y la rotura de las células se lleva a cabo mediante la aplicación de una

presión constante a 120 MPa. El proceso se repite de tres a cuatro veces hasta que se obtiene un lisado amarillento claro.

El extracto obtenido se centrifuga a $8.000 \times g$ (10 min, 4°C) para sedimentar las células no lisadas y el sobrenadante resultante se centrifuga a $140.000 \times g$ (45 min, 4°C). El nuevo sobrenadante se considera como la fracción soluble (citosol) y el sedimento como la fracción particulada (membranas) el cual se resuspende en 100 μ l de tampón de fraccionamiento (Tabla 4.6).

4.3. Métodos Analíticos

4.3.1. Determinación de actividad óxido nitroso reductasa

La actividad óxido nitroso reductasa (N₂OR) se mide como consumo de N₂O, mediante cromatografía gaseosa, en cultivos de *B. diazoefficiens*. Para ello se llevó a cabo la siguiente metodología:

1. Se preparan tubos de rosca de 17 ml con tapón de goma. Dependiendo de si se determina únicamente la actividad N₂OR endógena o si se acompaña de un donador fisiológico de electrones, como es el succinato, los tubos se preparan con: 7 ml de tampón de fraccionamiento (Tabla 4.6) o 6,3 ml del mismo tampón y 700 μ l de succinato a 600 mM, respectivamente.
2. Una vez preparados los tubos, se gasean con 2% de O₂ en 98% de N₂, durante 5 min.
3. Tras el gaseo se inyectan 500 μ l de una mezcla de N₂O al 2% en 98% de N₂.
4. Se dejan incubar 30 min a 30°C, en agitación (170 rpm), con ello conseguimos disolver el N₂O en el líquido.
5. Se recoge el cultivo por centrifugación a $5.500 \times g$, 7 min y se lava el pellet obtenido al menos 4 veces con tampón de fraccionamiento (Tabla 4.6), para eliminar todo el nitrato y nitrito presente en el medio y que no interfiera con la medida de N₂O. El sedimento final se resuspende en 4 ml del mismo tampón.

6. La suspensión celular obtenida se usa para inocular los tubos preparados previamente, de manera que cada reacción contenga entre 0,8 y 1 mg de proteína.
7. Justo después de la inoculación se recoge una muestra de 1 ml de gas del espacio de cabeza de cada tubo, correspondiente con la medida a tiempo cero. La muestra queda reservada en una jeringa cerrada con llave y pinchada en un tapón de goma, de tal manera que no haya escape de gas.
8. Los tubos se vuelven a incubar a 30°C en agitación (170 rpm), cogiendo muestras a las 3 h y 6 h siguientes a la inoculación.
9. Tras tomar las muestras de cada hora se determina la concentración de N₂O en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo 4890 equipado con un detector de conductividad térmica y una columna metálica (180 cm × 3,2 mm) empaquetada con PorapaK Q 80/100 MESH. La temperatura del horno inyector y detector es de 60°C. Como gas portador se emplea N₂ a un flujo de 23 ml/min. Los picos de N₂O identificados por comparación con el correspondiente patrón, al igual que la concentración de N₂O en cada muestra se calcula en referencia a una curva patrón de volúmenes conocidos de N₂O. La concentración total de N₂O en cada una de las reacciones se calcula extrapolando la concentración del espacio de cabeza con la solubilidad del N₂O en el medio y la temperatura, aplicando la ley de Henry (Sander, 1999; Tortosa et al., 2015). La actividad N₂OR se expresa como nmoles N₂O × (mg proteína)⁻¹ × h⁻¹, para lo cual, una vez realizadas todas las medidas, se determina la concentración de proteína de cada una de las muestras por el método Bradford (apartado 4.3.3.).

4.3.2. Determinación de actividad β-galactosidasa

La actividad β-galactosidasa se determina con una metodología adaptada a la descrita en Sambrook & Russell, 2001, básicamente:

1. Se pasan alícuotas de 1,5 ml de cultivo (DO₆₀₀= 0,4 – 0,6) de *B. diazoefficiens* a tubos de centrífuga de 15 ml. Del mismo cultivo se mide la DO₅₉₅ de 300 μl en pocillos de placa ELISA.

2. Se añade a los tubos de centrífuga 2 ml de tampón Z (Tabla 4.6), 100 µl de cloroformo y 250 µl de SDS al 0,1% en tampón Z. Se agita toda la mezcla en vórtex durante 15 s, la solución debe ponerse blanquecina y turbia. Las reacciones se incuban a 30°C para adecuarlas a la temperatura óptima y a su vez favorecer la separación de las dos fases.
3. De cada uno de los tubos de centrífuga se toman cuatro alícuotas de 750 µl de la fase superior en tubos de microcentrífuga independientes, de los cuales 300 µl corresponden a los cultivos celulares.
4. A cada una de las alícuotas se le adiciona 150 µl de solución de ONPG (*orto*-nitrofenil-β-D-galactopiranosido) (4 mg/ml preparada en tampón Z). En ese momento se inicia el cronometraje de la reacción. Se mezclan ligeramente los tubos y se incuban a 30°C hasta que aparezca un color amarillo moderado.
5. Para detener la reacción se adicionan a cada tubo 350 µl de Na₂CO₃ 1M.
6. Se centrifugan los tubos de reacción a 13.000 rpm, 5 min y se transfieren, con cuidado para no arrastrar restos celulares, 300 µl del sobrenadante obtenido a diferentes pocillos de una placa ELISA. Se determina la DO₄₂₀ y DO₅₅₀ de todas las muestras y se calcula la actividad β-galactosidasa (en unidades Miller; UM) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$UM = \frac{1000 \times (DO_{420} - DO_{550})}{t(\text{minutos}) \times V(\text{ml}) \times DO_{595}}$$

DO₄₂₀ y DO₅₅₀ = Valores de DO de la reacción a 420 y 595 nm, respectivamente

DO₅₉₅ = Valor de DO a 595 nm de la alícuota de cultivo que se toma al inicio

t = tiempo de incubación

v = volumen de cultivo (300 µl en este caso, si la actividad obtenida fuese muy baja, se puede concentrar el cultivo por centrifugación y rectificar los valores de volumen en la fórmula)

Teniendo en cuenta la concentración de proteína de cada reacción, la actividad β-galactosidasa también se puede expresar con la siguiente fórmula:

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

0,0045 = absorbancia de 1 nmol de ONPG

4.3.3. Determinación de proteína

Para determinar la concentración de proteína en células enteras, extractos celulares y soluciones de proteína pura, se usa el reactivo Bradford 5× de Bio-Rad. Cuando se trata de cultivos se requiere una lisis previa a la determinación de proteína y el procedimiento de lisado se lleva a cabo de la siguiente manera:

1. Se adiciona 1 volumen de NaOH 1M a 1 volumen de cultivo. Se agita en vórtex y se hierve durante 20 min. Tras el hervido se centrifuga a 12.000 rpm, 5 min, para eliminar los restos celulares. Del extracto obtenido se toman alícuotas de 25 a 50 µl y se llevan hasta 500 µl con H₂O. Desde este punto del procedimiento, el protocolo es el mismo para todo tipo de muestras.
2. Coger alícuotas de las muestras convenientemente diluidas y completar con H₂O hasta un volumen final de 800 µl.
3. Añadir 200 µl de reactivo de Bradford 5× (Bio-Rad) y agitar en vórtex.
4. Incubar la mezcla entre 2 y 60 min.
5. Medir la absorbancia a DO_{595nm} de cada una de las muestras, frente a un blanco que contiene H₂O en lugar de muestra.

La concentración de proteína se calcula por interpolación de los valores de absorbancia obtenidos

respecto a una curva patrón realizada con cantidades conocidas de albúmina sérica bovina (Sigma).

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

La electroforesis de proteína en geles de poliacrilamida se lleva a cabo en el sistema Mini-Protean Tetra Handcast (Bio-Rad). Se emplean geles de 1 mm de grosor con una concentración de poliacrilamida del 14% o 18% para el gel de resolución (Tabla 4.6) y del 4% para el gel de empaquetado (Tabla 4.6). La preparación de los geles tiene lugar entre los cristales previamente montados, sobre los que se vierte 4,5 ml

de la solución del gel de resolución, con la precaución de verterlo justo después de la adición de persulfato amónico (APS) y tetrametilendiamina (TEMED). Para conseguir un perfil nivelado del gel se añade 1 ml de isopropanol sobre la solución de resolución. Pasados unos 30 – 45 min, se elimina el isopropanol, se lava con abundante H₂O_d y se vierte la solución de empaquetado justo después de añadir el APS y el TEMED. Por último, se coloca el peine para crear los pocillos, sin introducir burbujas.

Una vez que están los geles polimerizados, se monta el sistema en la cubeta de electroforesis, de tal manera que quede un vaso estanco entre dos geles montados en el cassette. El vaso creado por los cristales y la cubeta se rellena de tampón de desarrollo (Tabla 4.6).

Antes de cargar los carriles con el extracto o proteína correspondiente se corre previamente el gel durante unos 40 – 60 min. Tras este tiempo, se cargan los geles con los lisados, extractos celulares o soluciones de proteína a analizar adicionados cada uno con el tampón de carga adecuado (Tabla 4.6), dependiendo del análisis realizado seguidamente: detección de citocromos *c* (apartado 4.3.6), inmunodetección (apartado 4.3.7) o detección de proteínas con Coomassie (apartado 4.3.8). En todos los geles se carga siempre uno de los carriles con 5 µl de marcador de peso molecular PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo). La electroforesis se lleva a cabo a 20 mA hasta que el frente llegue al final del gel.

4.3.5. Transferencia a membranas de nitrocelulosa

Tanto para la detección de citocromos *c*, como para los ensayos de inmunodetección se transfirieron las proteínas del gel de poliacrilamida a membranas de nitrocelulosa de 0,2 µm de grosor. La transferencia se realiza con el sistema Trans-Blot Turbo Blotting (Bio-Rad), para lo que se emplea un pack comercializado por Bio-Rad que contiene tanto las membranas de nitrocelulosa de 0,2 µm, como los correspondientes papeles de filtro humedecidos. Una vez corrido el gel de poliacrilamida, se coloca en contacto con la membrana de nitrocelulosa y se crea un sándwich junto con el papel de filtro del pack, quedando la membrana en el interior junto al gel, y con la precaución de que queden todas las capas sin burbujas. El sándwich se coloca en el cassette del sistema, previamente enfriado a -20°C durante 2 h y se cierra a presión. La transferencia de las proteínas a las membranas se lleva

a cabo de forma semi-seca según los protocolos programados por el sistema Trans-Blot Turbo Blotting. En particular, se emplea el protocolo Low MW (5 min, 25 V, 1,3 A) para el caso de la detección de citocromos *c* y el High MW (10 min, 25 V, 1,3 A) para la inmunodetección con anticuerpos. Finalmente, las membranas con las proteínas se lavan con tampón adecuado, dependiendo de su uso para inmunodetección o detección de citocromos *c*.

4.3.6. Detección de citocromos tipo *c*

La detección de proteínas que contienen grupos hemo *c* se llevó a cabo mediante la técnica de detección de actividad peroxidasa, intrínseca a estos citocromos, descrita en (Delgado et al., 2003; Vargas et al., 1993). Para ello, la membrana de nitrocelulosa lavada previamente con tampón de fraccionamiento (Tabla 4.6) se incubó durante 2 min con 600 µl de la mezcla de reactivos del kit ECL Select™ Western Blotting Detection Reagent (Amersham, GE Healthcare). La emisión de luz se detecta con el sistema de detección de quimioluminiscencia ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad) durante 300 s. Las imágenes se analizan con el programa ImageLab (Bio-Rad).

4.3.7. Ensayo de inmunodetección (Western-Blot)

La inmunodetección de la proteína NosZ de *B. diazoefficiens* se llevó a cabo básicamente siguiendo el protocolo descrito por Torres et al., 2017. Para ello se usó un anticuerpo heterólogo contra NosZ de *P. denitrificans* (Felgate et al., 2012) (dilución 1:1.000) como anticuerpo primario y un anticuerpo anti-oveja conjugado con peroxidasa de rábano picante producido en asno (dilución 1:3.500) como anticuerpo secundario.

Tras la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa se llevó a cabo el siguiente protocolo:

1. Lavar la membrana en 25 ml de tampón TBS (Tabla 4.6) durante 20 min en balancín. Pasado ese tiempo, cambiar el TBS por tampón de bloqueo (Tabla 4.6) y dejar la membrana incubando durante toda la noche a 4°C, también en balancín.
2. Realizar tres lavados de la membrana con TTBS (Tabla 4.6), cada uno de 15 min de duración.

3. Incubar la membrana con el anticuerpo primario durante 1 h.
4. Lavar tres veces con TTBS (Tabla 4.6), durante 15 min cada lavado.
5. Incubar la membrana con el anticuerpo secundario durante 1 h.
6. Revelar. El revelado se realiza de la misma forma descrita previamente para la detección de citocromos *c* (apartado 4.3.6).

4.3.8. Visualización de proteínas en geles de poliacrilamida con Azul de Coomassie

Tras la electroforesis las proteínas se detectaron por tinción con Azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R250). Para ello se incubó el gel de poliacrilamida en solución de Coomassie (Tabla 4.6) durante 12 min. Posteriormente, se lava el gel con una solución de desteñido (Tabla 4.6) durante 2 h y finalmente con H₂O.

4.4. Métodos de Biología Molecular

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

4.4.1.1. Lisados por calor

La obtención de ADN total, tanto de *E. coli* como de *B. diazoefficiens*, para el cribado por PCR de diferentes candidatos, se llevó a cabo mediante lisados celulares por calor con el siguiente procedimiento:

1. Se preparan tubos de microcentrífuga con 400 µl de H₂O ultrapura. Se resuspende una pequeña cantidad de masa celular procedente de cultivos sólidos o 25 µl de un cultivo líquido en fase estacionaria.
2. Se hierve cada tubo durante 10 min a 100°C.

Antes de utilizar el extracto obtenido, para la reacción de PCR, se enfrían en hielo. Se emplea un volumen de lisado celular equivalente al 10% de la mezcla de reacción. Las muestras tras el lisado pueden conservarse a 4°C durante una semana.

4.4.1.2. Método comercial

Para obtener ADN total de *B. diazoefficiens* de mayor pureza que en el caso del que se obtiene en los lisados por calor, se empleó el Kit de Realpure Spin Plantas y

Hongos (Real). El procedimiento usado fue el descrito por la casa comercial y todas las soluciones vienen incluidas en el kit:

1. El sedimento celular de un cultivo de 50 ml de *B. diazoefficiens* crecido hasta fase exponencial se resuspende en 1 ml de tampón de extracción. A continuación, se añaden 200 µl de solución PVP y se homogeniza con vórtex.
2. Se añaden otros 200 µl de solución SDS y se vuelve a homogeneizar con vórtex.
3. La muestra se centrifuga a 13.000 rpm, 5 min y el sobrenadante se pasa a un nuevo tubo de microcentrífuga.
4. Se adicionan 200 µl de solución de precipitado y se incuba 3 min en hielo. Se vuelve a centrifugar a 13.000 rpm, 5 min y el sobrenadante se traspasa a otro tubo nuevo.
5. Se añade un volumen de solución de lisis con proteinasa K, se mezcla y se incuba a 70°C durante 10 min. A continuación, se adicionan 300 µl de isopropanol y se trasvasa la mezcla a una columna suministrada por el kit. Se centrifuga a 12.000 rpm, 5 min y se descarta el líquido eluyente.
6. Se añaden a la columna 500 µl de solución de desinhibición, se centrifuga y se descarta el eluyente. Se realizan dos lavados con 500 µl de solución de lavado y por último se centrifuga la columna durante 2 min a 13.000 rpm.
7. Finalmente, se eluye el ADN con 50 µl de H₂O ultrapura precalentada a 70°C, dejando 1 min de hidratación de la columna y posteriormente se centrifuga a 13.000 rpm durante 1 min. La concentración de ADN se cuantificó espectrofotométricamente con un Nanodrop (ver apartado 4.4.5).

4.4.2. Obtención de ADN plasmídico de *E. coli*

4.4.2.1. Método TENS

La extracción de ADN plasmídico de *E. coli* necesaria para el cribado de candidatos durante la clonación de fragmentos de ADN en plásmidos, se llevó a cabo con el siguiente procedimiento:

1. Los cultivos de 3 ml de *E. coli* crecidos a 37°C durante 12 – 16 h se centrifugan (13.000 rpm, 5 min) y se resuspenden en 300 µl de solución TENS (Tabla 4.6). A continuación, se añaden 150 µl de ácido acético 3 M, pH 5,2 e inmediatamente se agitan en vórtex durante 5 s.
2. Las muestras se centrifugan 10 min a 13.000 rpm y el sobrenadante se trasvasa a un tubo de microcentrífuga nuevo.
3. Se añade 1 ml de etanol absoluto frío, se mezcla por inversión y se centrifugan durante 5 min. El sobrenadante se elimina y se realiza un lavado con 200 µl de etanol 70% frío.
4. El pellet obtenido se seca al vacío durante 10 min.
5. Se resuspende el pellet en 100 µl de H₂O ultrapura y adicionar 1 µl de solución de ARNasa (Tabla 4.6).

Estas preparaciones de ADN se emplearon en digestiones de ADN por endonucleasas de restricción y en las reacciones de amplificación por PCR (la muestra se añadió en un 10 % del volumen final, como máximo).

4.4.2.2. Métodos comerciales

4.4.2.2.1. “Minipreps”

En caso de que el ADN plasmídico vaya ser secuenciado o empleado en clonajes posteriores, se requiere mayor pureza, por lo que en este caso se usa el método comercial QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

1. Obtener el pellet de 3 ml de cultivo de *E. coli* por centrifugación a 13.000 rpm durante 1 min.
2. Resuspender el pellet en 250 µl de solución P1. Seguidamente, añadir 250 µl de solución P2 y finalmente 350 µl de solución N3. Tras la adición de las soluciones P2 y N3 se mezclan suavemente los tubos por inversión.
3. Centrifugar a 13.000 rpm durante 10 min y traspasar el sobrenadante obtenido a una columna suministrada por el propio kit. Se vuelve a centrifugar a 13.000 rpm, 1 min y se elimina el eluyente.

4. Sobre la columna, añadir 500 µl de solución PB y se centrifuga al igual que en los anteriores casos. Descartar el eluyente y añadir 750 µl de solución PE a la columna. Volver a centrifugar y eliminar eluyente. A continuación, centrifugar la columna para eliminar los restos de etanol procedentes de la solución PE.
5. Finalmente, añadir 50 µl de H₂O ultrapura a la columna y dejar hidratar durante 1 min. Eluir el ADN, en un tubo nuevo, por centrifugación a 13.000 rpm, 1 min. Cuantificar la concentración de ADN en el Nanodrop (ver apartado 4.4.5).

4.4.2.2.2. “Midipreps”

Con el objeto de obtener ADN plasmídico en mayores cantidades que el rendimiento de la metodología de “Minipreps”, se empleó el método comercial Plasmid Midi Kit (Qiagen). Este protocolo se utilizó para la preparación de ADN molde para ensayos de IVT o para la extracción de plásmidos con bajo número de copias. Se procedió según las instrucciones de la casa comercial.

1. Cultivos de 100 ml de cepas *E. coli* que contienen el plásmido de interés se centrifugan a $5.500 \times g$ durante 15 min, 4°C.
2. El sedimento se resuspende en 4 ml de solución P1. Seguidamente, añadir 4 ml de Solución P2 y agitar vigorosamente, pero sin usar vórtex.
3. Incubar exactamente 5 min a temperatura ambiente (15 – 25 °C).
4. Añadir 4 ml de solución P3, previamente enfriada en hielo, y mezclar inmediatamente por inversión 4 – 6 veces. Incubar en hielo 15 min.
5. Centrifugar a $20.000 \times g$ durante 15 min y traspasar el sobrenadante obtenido a una columna Tip 100 suministrada por el propio kit. Previamente a verter el sobrenadante sobre la columna, se debe equilibrar la columna con 4 ml de solución QBT.
6. Sobre la columna, añadir 10 ml de solución QC y dejar que eluya por gravedad. Finalmente, eluir el ADN con 5 ml de solución QF.
7. Precipitar el ADN con 3,5 ml de isopropanol y mezclar por inversión.

8. Centrifugar inmediatamente a $15.000 \times g$ durante 30 min a 4°C y descartar el sobrenadante cuidadosamente.
9. Lavar el pellet de ADN con 2 ml de etanol 70% frío.
10. Centrifugar $15.000 \times g$ durante 10 min a 4°C y eliminar el sobrenadante.
11. Secar el pellet al vacío durante 10 min y resuspenderlo con 120 μl de H_2O ultrapura. Cuantificar la concentración de ADN en el Nanodrop (ver apartado 4.4.5).

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

Esta metodología se empleó para comprobar la presencia de plásmidos en *B. diazoefficiens* introducidos por conjugación empleando *E. coli* como bacteria donadora. El aislamiento de los plásmidos se lleva a cabo mediante el siguiente protocolo:

1. Obtener el sedimento celular de 5 ml de cultivo de *B. diazoefficiens* crecido hasta fase exponencial tardía.
2. Resuspender el sedimento en 500 μl de solución de lavado (Tabla 4.6), lavar dos veces con esta solución.
3. Resuspender el sedimento lavado con 200 μl de solución MAXI (Tabla 4.6). Añadir 400 μl de solución de lisis (Tabla 4.6) y mezclar los tubos por inversión. Esperar entre 10 y 15 min para alcanzar una lisis completa.
4. Añadir 200 μl de solución de neutralizado (Tabla 4.6). Mezclar por inversión, e incubar en hielo durante 15 min. Centrifugar a 13.000 rpm, 3 min, recoger el sobrenadante en un nuevo tubo y añadir un volumen de isopropanol. Centrifugar a 13.000 rpm y eliminar el sobrenadante.
5. Añadir 1 ml de etanol al 70% y centrifugar a 14.000 rpm, 2 min. Eliminar el sobrenadante y secar el pellet en bomba de vacío.
6. Resuspender el pellet en 20 μl de H_2O ultrapura.

Puesto que el rendimiento de la extracción de ADN plasmídico es muy bajo cuando se parte de células de *B. diazoefficiens* no es posible su detección en geles de agarosa. Por lo que para obtener mayor cantidad de ADN plasmídico y poder

comprobarlos, se transforman en células competentes de *E. coli* DH5 α (ver apartado 4.4.14).

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

Para la extracción de ARN total de cultivos de *B. diazoefficiens* cultivados en diferentes condiciones se llevó a cabo el siguiente procedimiento.

1. En tubos de centrifuga libres de ARNasa de 50 ml (Labcon) se mezclan 35 ml de cultivo con 5 ml de Solución de Stop (Tabla 4.6) y se centrifuga a 9.000 rpm (5 min, 4°C). Se desecha el sobrenadante y el pellet de células se puede congelar en nitrógeno líquido y conservarlo a -80°C para su utilización posterior.
2. Se resuspende el pellet celular en 1,5 ml de Tampón A (Tabla 4.6) enfriado previamente en hielo. La solución obtenida tras la resuspensión se añade a tubos de centrifuga de 15 ml que ya contienen 160 μ l de SDS al 10%, 2 ml de Tampón A (Tabla 4.6) y 3,5 ml de fenol ácido, precalentados a 65°C. Tras mezclarlos se agitan 30 s en vórtex y se incuban a 65°C durante 2 min. Se vuelven a agitar con vórtex 1 min y se incuban de nuevo 5 min.
3. Tras la incubación, los tubos se centrifugan a 9.000 rpm, 5 min, 4°C. Se transfiere la fase acuosa a un nuevo tubo de centrifuga que contiene 3,5 ml de fenol ácido y se agita en vórtex 1 min. Este paso es opcional, se realiza para muestras con mucha contaminación de ADN.
4. Se vuelve a realizar una centrifugación a 9.000 rpm, 8 min y 4°C y se transfiere la fase acuosa a otro tubo de centrifuga, que esta vez contiene 3 ml de una solución fenol/cloroformo/isoamil alcohol (Ambion). Tras la mezcla se agita en vórtex 1 min.
5. De nuevo se centrifuga de la misma manera que en los pasos anteriores y se pasa la fase acuosa a otro tubo de centrifuga con 2,5 ml de cloroformo, se agita 1 min en vórtex.
6. Finalmente, se realiza la última centrifugación a 9.000 rpm, 5 min, 4°C y se traspara la fase superior acuosa a un nuevo tubo de centrifuga de 15 ml. Esta fase contiene el ARN, por lo que a partir de este paso hay que mantener las

muestras en hielo continuamente. Se retiran 10 μ l de la solución obtenida para comprobar la integridad del ARN en un gel de agarosa al 1,5%.

7. El resto de solución se distribuye en tubos de microcentrífuga, 500 μ l en cada tubo, que previamente contiene 1/10 de NaOAc 3 M (50 μ l) y 2 volúmenes de etanol 100% (1 ml). Se mezcla todo por inversión y se almacena a -80°C , al menos una noche, para precipitar el ARN.
8. Una vez precipitado el ARN, se centrifugan los tubos de microcentrífuga a 13.000 rpm, durante 1 h a 4°C . Se desecha el sobrenadante y se añade 1 ml de etanol 80% para lavar el pellet de ARN, sin resuspenderlo. Se vuelve a centrifugar 15 min y se elimina todo el sobrenadante con pipeta.
9. Se deja secar el tubo invertido sobre un papel entre 20 – 30 min, hasta que el pellet de ARN esté seco, pero no en exceso. Pasado ese tiempo se resuspende en 50 μ l de H_2O ultrapura y se mide en el Nanodrop la concentración (ver apartado 4.4.5).

4.4.5. Determinación de la concentración de ADN y ARN

La concentración de ADN y ARN se estima con el equipo NanoDrop ND-1000 (Thermo) mediante espectrofotometría, por determinación de la absorbancia a 260 nm de soluciones acuosas. El equipo permite seleccionar el tipo de ácido nucleico (ADN o ARN de cadena doble o sencilla). Cada medida debe realizarse en una gota de 1 – 2 μ l de la solución, previo ajuste del equipo con una gota de H_2O ultrapura. Tras realizar la medida de cada una de las muestras, se puede observar en la pantalla el espectro de absorbancia a 260 y 280 nm (A_{260} y A_{280}), junto a los datos de concentración en ng/ μ l y de los ratios 260/280 y 260/230. Esos ratios indican el grado de pureza de la muestra. Mientras que el ratio 260/230 debe tener valores alrededor a 1,8 en muestras de ADN y 2 en muestras de ARN (si son considerablemente menores indican una posible contaminación por proteínas o disolventes orgánicos), los valores óptimos para el ratio 260/230 están comprendidos entre 1,8 – 2 (valores fuera de este rango indican la presencia de contaminantes co-purificados con la muestra).

Los datos de concentración de ácidos nucleicos determinados espectrofotométricamente se pueden validar en una electroforesis en gel de

agarosa, comparando la intensidad de banda con las del marcador de concentraciones conocidas de ADN GeneRuler 1 Kb Plus DNA (Thermo), ya sea *de visu* o con el software ImageLab (Bio-Rad).

4.4.6. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

La clonación de fragmentos de ADN en vectores y la verificación de diferentes construcciones, requiere el empleo de digestiones de ADN con endonucleasas de restricción, de manera que se compara el perfil obtenido con el teórico del clonaje *in silico* según el programa Clone Manager. La reacción de restricción se lleva a cabo en tubos de microcentrífuga que contienen como máximo 1 µg de ADN plasmídico ó 0,2 µg de ADN procedente de PCR, 1 µl de tampón de reacción, que puede llevar incorporado o no tampón de carga según las recomendaciones del proveedor (dependiendo de su empleo posterior para cribado de candidatos o clonaje de fragmentos), 0,5 µl de la endonucleasa a emplear y H₂O ultrapura hasta un volumen final de 10 µl. Cuando se realizan reacciones con varias endonucleasas, se ajusta el volumen de las enzimas para que no supere el 10% del volumen total de la reacción que normalmente se incrementa hasta 30 – 50 µl. Las reacciones se incuban durante el tiempo necesario para cada enzima a 37°C (Tabla 4.7). En el caso de que el fragmento digerido se emplee en posteriores clonaciones, es necesario realizar una inactivación térmica (Tabla 4.7) o una extracción fenólica para eliminar la actuación de las enzimas. En este último caso, se incrementa el volumen hasta 300 µl, se adiciona un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y se agita en vórtex, 10 s. Posteriormente, se centrifuga a 13.000 rpm, 5 min y se recoge la capa acuosa superior. A continuación, se añaden 2,5 volúmenes de etanol absoluto y se incuba a -80°C durante 1 h ó a -20°C toda la noche. De esa manera precipita el ADN y se centrifuga a 13.000 rpm, 60 min para su obtención en un pellet. Se lava el pellet con 200 µl de etanol 70% frío. Se deja secar la muestra al vacío y finalmente se resuspende el pellet con 10 µl de H₂O ultrapura.

En la siguiente tabla se recogen todas las endonucleasas usadas durante el desarrollo de esta tesis, con sus características necesarias para su uso.

Tabla 4.7. Endonucleasas de restricción. Se muestra la secuencia diana indicando el sitio de corte en la hebra 5'– 3'. *Entre paréntesis se indican las bases protectoras necesarias en el extremo 5' para el corte de fragmentos de PCR. ***TasI* requiere la incubación a 65°C.

Materiales y métodos

Nombre	Diana	Tiempo de reacción (min)		Inactivación
		Plásmidos 1 µg	PCR 0,2 µg (bases prot.)*	
<i>Bam</i> HI	G/GATCC	5	5 (2)	5 min/80°C
<i>Bgl</i> II	A/GATCT	20	30 (3)	---
<i>Bst</i> XI	CCANNNNN/NTGG	5	5 (4)	5 min/80°C
<i>Eco</i> RI	G/AATTC	5	20 (2)	5 min/80°C
<i>Eco</i> RV	GAT/ ATC	5	5 (2)	---
<i>Hind</i> III	A/AGCTT	5	20 (3)	10 min/80°C
<i>Kpn</i> I	GGTAC/C	5	5 (3)	5 min/80°C
<i>Mre</i> I	CG/CCGGCG	5	5 (3)	5 min/80°C
<i>Nco</i> I	C/CATGG	5	10 (3)	15 min/65°C
<i>Nde</i> I	CA/TATG	5	60 (3)	5 min/65°C
<i>Nhe</i> I	G/CTAGC	15	5 (5)	5 min/65°C
<i>Not</i> I	GC/GGCCGC	30	5 (2)	5 min/80°C
<i>Nsi</i> I	ATGCA/T	5	5 (3)	15 min/65°C
<i>Pst</i> I	CTGCA/G	5	30 (3)	---
<i>Sac</i> I	GAGCT/C	5	30 (1)	5 min/65°C
<i>Sal</i> I	G/TCGAC	5	≥60 (3)	10 min/65°C
<i>Sma</i> I	CCC/GGG	5	5 (1)	5 min/65°C
<i>Spe</i> I	A/CTAGT	5	5 (1)	---
<i>Sph</i> I (<i>Pae</i> I)	GCATG/C	5	5 (5)	5 min/65°C
<i>Tas</i> I	/AATT	5 ** (65°C)	5 (3) * (65°C)	---
<i>Xba</i> I	T/CTAGA	5	5 (2)	20 min/65°C
<i>Xho</i> I	C/TCGAG	5	5 (2)	5 min/80°C

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

La técnica de PCR se ha usado para amplificar ADN para su uso con diferentes objetivos:

- Obtención de fragmentos de ADN para su clonación en vectores.
- Verificación de construcciones de plásmidos.
- Comprobación de cepas recombinantes.
- Comprobación de ausencia de contaminación de ADN en muestras de ARN.

Según la finalidad con la que se realiza la amplificación de ADN, se utilizan ADN polimerasas distintas:

- a. Dream Taq (Thermo): PCR rutinarias de comprobación de clones, verificación de especificidad de oligonucleótidos y comprobación de contaminación de ADN en ARN.
- b. Phusion (Thermo): Para reacciones donde se requiere máxima fidelidad de secuencia amplificada y amplicones de mayor tamaño, es por ello, que suele ser la usada para fragmentos de ADN que van a ser usados en clonaje.

En la siguiente tabla se detalla la composición de las mezclas de reacción para cada una de las ADN polimerasas, para reacciones de 10 µl, (Tabla 4.8):

Tabla 4.8. Mezclas de reacción de PCR para Dream Taq y Phusion ADN polimerasas.

	Dream Taq	Phusion
Tampón	1 µl	2 µl
dNTP (10 mM cada uno)	0,2 µl	0,2 µl
Oligonucleótido For (10 µM)	1 µl	0,8 µl
Oligonucleótido Rev (10 µM)	1 µl	0,8 µl
ADN polimerasa (5 U/µl)	0,05 µl	0,05 µl
ADN molde	50 ng	10 ng
H₂O ultrapura	Hasta 10 µl	Hasta 10 µl

Las reacciones se llevan a cabo en termocicladores de tapa calefactable Mastercycler 5333 (Eppendorf), GeneAmp 2400 (PerkinElmer) y Px2 (Thermo). El programa de PCR se diseña según las especificaciones de cada polimerasa. En la siguiente tabla se detallan los tiempos y las temperaturas de cada etapa (Tabla 4.9).

Tabla 4.9. Programas de PCR adecuados para Dream Taq y Phusion ADN polimerasas.

	Ciclos	Dream Taq	Phusion
Desnaturalización	1	95°C - 3 min	98°C - 5 min
Desnaturalización	30	95°C - 30s	98°C - 10 s
Anillamiento		(T _m - 5) 30 s	T _m - 30 s
Extensión		72°C - 1 min/kb	72°C - 30s/kb
Extensión	1	72°C - 10 min	72°C - 10 min
Conservación	∞	4°C	4°C

4.4.8. Mutación puntual dirigida (“QuikChange”)

Para la generación de mutaciones puntuales en una secuencia de cadena doble de ADN se usó la técnica de “QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit” (Stratagene), que básicamente consiste en:

1. Diseñar una pareja de oligonucleótidos complementarios antiparalelos de aproximadamente 40 pb, que contenga en su zona central el nucleótido o los nucleótidos que se quieren cambiar (Tabla 4.3).
2. Realizar una reacción de PCR con Phusion ADN polimerasa, usando como molde un plásmido de tamaño idealmente inferior a 6 kb que contenga como inserto la región de ADN a mutar*.
3. Digerir enzimáticamente el producto de la PCR anterior con *DpnI* (1 µl, 10 U/µl, NEB). Esta endonucleasa digiere el ADN sintetizado por la bacteria *E. coli*, pero no es capaz de reconocer para su digestión el ADN sintetizado de *novo* en la reacción de PCR.
4. Verificar por electroforesis en gel de agarosa (apartado 4.4.9) 5 µl de los productos de PCR digeridos y no digeridos con *DpnI*.

5. Transformar con 5 μ l de ADN digerido células competentes de *E. coli* DH5 α (apartado 4.4.14) y sembrar en placas de LB suplementado con los antibióticos correspondientes.
6. Seleccionar colonias, aislar su ADN plasmídico y verificar por secuenciación (apartados 4.4.2 y 4.4.11, respectivamente) la presencia de las mutaciones puntuales dirigidas usando oligonucleótidos específicos (Tabla 4.3).

*En el caso que dicho plásmido no esté disponible, hay que amplificar por PCR (apartado 4.4.7) la secuencia de ADN donde se quiere realizar la mutagénesis con Phusion ADN polimerasa que provee una secuencia con mayor fidelidad. Una vez comprobado el tamaño y la pureza del producto obtenido por PCR en electroforesis en gel de agarosa (apartado 4.4.9), se procede a su purificación (apartado 4.4.10) y se digiere con las endonucleasas de restricción adecuadas para poder clonarlo en un vector de pequeño tamaño y de alto número de copias como pBluescript KS + (pBS KS+) (Tabla 4.2).

4.4.9. Electroforesis de ADN y ARN en geles de agarosa

Para visualizar y separar fragmentos de ADN procedentes de PCR, “miniprep” o digestión se usa la electroforesis horizontal en geles de agarosa preparados al 0,7 % en TBE 0,5 \times (Tabla 4.6) para electroforesis de rutina o 1% para diferenciar fragmentos de menos de 500 pb. Se usa el sistema Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad) con TBE 0,5 \times como tampón de desarrollo para la realización de la electroforesis. Las muestras se cargan en los geles de agarosa con tampón de carga 6 \times (Tabla 4.6) y la electroforesis se lleva a cabo a 100 V, hasta que el frente alcance el último cuarto de la longitud del gel.

Para el caso de la comprobación de la integridad de muestras de ARN total se usa el mismo tipo de electroforesis en geles de agarosa al 1% preparados en TAE 1 \times (preparado con H₂Od-DEPC) (Tabla 4.6) y la suspensión del gel se trata con 0,005 % de DEPC durante 30 min previo uso. Además, tanto la cubeta como la bandeja de electroforesis se lavan con SDS 0,5% al menos durante dos horas y se enjuagan con H₂Od-DEPC antes de su empleo. Las muestras se cargan con el mismo tampón de carga 6 \times usado para muestras de ADN y como tampón de desarrollo se usa TAE 1 \times .

La electroforesis se lleva a cabo a 80 V durante 30 – 45 min. Se pueden visualizar tres bandas definidas correspondientes a ARNr 23s, 16s y 5s.

El revelado de los geles se realiza en el sistema GelDoc XR (Bio-Rad) donde la visualización de las muestras tiene lugar gracias a bromuro de etidio (se añaden 5 µl de una solución de 10 mg/ml por 100 ml de gel) o al fluoróforo GelRed (Biotium), también agente intercalante de ácidos nucleicos que se incorpora en el tampón de carga al 2%. Ambos fluoróforos emiten luz a 605 nm cuando se encuentran unidos al ADN y se excitan por luz ultravioleta a 250 nm. El software de análisis de imagen usado de rutina es Quantity One (Bio-Rad) e Image Lab (Bio-Rad).

4.4.10. Purificación de fragmentos de PCR o de restricciones con endonucleasas

La eliminación de restos de tampón, oligonucleótidos, dNTPs o ADN molde de una reacción de PCR es necesaria cuando el fragmento amplificado va a ser clonado directamente en un vector o digerido por endonucleasas de restricción, con el objeto de ser clonado posteriormente en un vector de clonación. Esa purificación puede ser llevada a cabo directamente del tubo de reacción de PCR o después de la separación del fragmento en un gel de agarosa.

4.4.10.1. A partir de la reacción de PCR

Cuando se obtiene un único producto como resultado de la reacción de PCR, éste puede purificarse utilizando el kit QIAquick PCR Purification (Qiagen), siguiendo las especificaciones del fabricante:

1. Se añaden 5 volúmenes de tampón PB a la reacción de PCR, se mezcla y se verifica que esa mezcla permanece amarilla, gracias a un indicador de pH que posee el tampón. La mezcla se coloca sobre una columna que la provee el propio kit y se centrifuga 1 min a 13.000 rpm. Tras la centrifugación se descarta el eluyente.
2. Se lava la columna con 750 µl de tampón PE y se vuelve a centrifugar de igual manera que en el paso anterior. Se descarta el eluyente y se centrifuga la columna a máxima velocidad otro minuto, con el objeto de eliminar los restos de etanol.

3. Se añaden 30 µl de tampón EB o H₂O ultrapura y se deja hidratar el ADN de la columna durante 1 min. Finalmente, se eluye el producto en un tubo nuevo centrifugando la columna a 13.000 rpm, 1 min.
4. Se cuantifica la concentración de ADN en el Nanodrop (ver apartado 4.4.5).

4.4.10.2. A partir de geles de agarosa

Cuando se quiere purificar un fragmento concreto de una serie de múltiples productos de una reacción de PCR o un producto específico de una restricción para su posterior clonaje, se puede extraer de una banda desde el gel de agarosa. En ese caso se usa el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen), siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

1. La banda del gel que contiene el fragmento de interés se extrae del gel y se deposita en un tubo de microcentrífuga tarado. Se adicionan 3 µl de tampón GC por mg de agarosa y se incuba a 50°C durante 10 min, de esa manera la agarosa se disuelve completamente. Se verifica que la mezcla permanece amarilla, gracias al indicador de pH que posee el tampón.
2. Se aplica la mezcla sobre una columna, suministrada por el kit y se centrifuga a 13.000 rpm, 1 min. Tras la centrifugación se desecha el eluyente.
3. Se adiciona sobre la columna 0,5 ml de tampón QC, se centrifuga a 13.000 rpm, 1 min. Se lava la columna con 750 µl de tampón PE, se vuelve a centrifugar y a desechar el eluyente. Para eliminar los restos de etanol se realiza una nueva centrifugación a máxima velocidad 1 min.
4. Se añaden 30 µl de tampón EB o H₂O ultrapura y se deja hidratar el ADN de la columna durante 1 min. Finalmente, se eluye el producto en un tubo nuevo centrifugando la columna a 13.000 rpm, 1 min.
5. Se cuantifica la concentración de ADN en el Nanodrop (ver apartado 4.4.5).

4.4.11. Secuenciación de ADN

Para comprobar el correcto clonaje o mutagénesis en los diferentes plásmidos se secuencia la parte de interés por el método Sanger. La técnica se realiza en el Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra siguiendo las indicaciones del

servicio. Se requiere la muestra disuelta en H₂O ultrapura, que debe contener entre 400 y 800 ng de ADN plasmídico, o entre 10 y 80 ng de producto de PCR, 6,4 pmoles de un único oligonucleótido desde el que se va a iniciar la lectura de secuenciación y completar hasta 12 µl con H₂O ultrapura. Los resultados enviados desde el servicio son analizados con programas informáticos como Clone Manager y FinchTV.

4.4.12. Síntesis de fragmentos de ADN

Para la síntesis de fragmentos de ADN se utilizó el servicio de Eurofins Genomics (<https://www.eurofinsgenomics.eu/en/gene-synthesis-molecular-biology/order-links-gsy-molbiol/>), el cual sintetiza la secuencia de interés solicitada y la provee al usuario clonada en un vector tipo pEX-a (resistente a ampicilina) o pEX-k (resistente a Km). Además, el propio sistema de pedido ofrece la opción de añadir a la secuencia de interés dianas de diferentes endonucleasas de restricción en ambos extremos. La recuperación del fragmento a partir del vector de clonación se realiza por digestión con enzimas específicas o por amplificación con PCR.

4.4.13. Ligación de fragmentos de restricción en vectores de clonación

La ligación de un fragmento de ADN y un vector requiere la digestión con enzimas de restricción compatibles de ambos y la mezcla de vector:inserto en una proporción de al menos 1:3 en moles, teniendo en cuenta que la suma de ambas cantidades de ADN debe ser de al menos 100 ng. La reacción se lleva a cabo en un tubo de microcentrífuga, donde se adiciona: 1 µl de ligasa (T4 DNA ligase, 1U/µl (Roche)), 1 µl de tampón de ligasa 10×, el ADN vector, el ADN inserto y H₂O ultrapura hasta 10 µl. Se mezcla suavemente y se centrifuga (un pulso), se incuba a temperatura ambiente durante 1 h ó a 4°C toda la noche.

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

4.4.14.1. Preparación de células competentes con RbCl

Para preparar células competentes de *E. coli* se usa la técnica del cloruro de Rubidio (RbCl), descrita por Hanahan (1983), siguiendo el siguiente procedimiento:

1. Se inocula un matraz de 500 ml, con 100 ml de medio LB precalentado a 37°C, con 5 ml de un cultivo de células de *E. coli* crecido durante 16 h. Se incuba en agitación (170 rpm) a 37°C hasta que el cultivo alcance una DO₆₀₀ de 0,4 – 0,6

(fase logarítmica). Una vez alcanzada esa DO el cultivo se coloca en hielo durante 15 min con el objeto de detener el crecimiento celular.

2. Se centrifuga el cultivo, en tubos estériles, a $8.000 \times g$ durante 10 min a 4°C . El sobrenadante se desecha y se resuspende el pellet obtenido en 30 ml de solución TFB1 (Tabla 4.6) estéril y fría a 4°C . Se incuba en hielo durante 15 min y se centrifuga de nuevo a $8.000 \times g$ durante 10 min a 4°C . El sobrenadante se descarta.
3. El pellet obtenido se resuspende en 4 ml de solución TFB2 (Tabla 4.6) fría. Se alícuota en tubos de microcentrífuga y las diferentes alícuotas se conservan a -80°C .

Las células competentes son muy delicadas por lo que, para evitar la lisis celular, todos los procesos son realizados en frío y sin estrés mecánico, se debe pipetear con delicadeza y no agitar en vórtex.

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

La transferencia de ADN plasmídico a células de *E. coli* se lleva a cabo con la técnica de transformación descrita por Rodríguez y Tait (1983), modificada como se describe seguidamente:

1. Se descongelan en hielo alícuotas de 100 μl de células competentes (aproximadamente 10 min).
2. Se adiciona 50 – 100 ng de ADN de ligación o 25 ng de plásmido puro con el que se pretende transformar. Se mezcla suavemente y se incuba en hielo durante 30 min.
3. Se calienta a 42°C (choque térmico) durante 45 s y se deja incubar en hielo otros 5 min.
4. Se adicionan 4 volúmenes (400 μl) de medio LB y se incuba a 37°C en agitación durante 1 h como mínimo (dependiendo del antibiótico de selección es necesario extender el tiempo de incubación). Durante la incubación se preparan placas Petri con medio LB suplementado con los antibióticos convenientes. Para llevar a cabo una selección por color se le adiciona al medio 40 μl de 5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

(X-Gal) a una concentración de 20 mg/ml, diluido en dimetilformamida, y 4 µl de 1-Isopropil- (R)-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Tabla 4.6) a una concentración de 200 mg/ml.

5. Las células transformadas se siembran en las placas y se incuban a 37°C durante una noche.

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

La transferencia de ADN a células de *B. diazoefficiens* se llevó a cabo por conjugación biparental desde la cepa de *E. coli* S17.1, que porta el plásmido o la construcción que se quiere transferir, usando el siguiente protocolo:

1. Se cultivan las cepas de *B. diazoefficiens* (cepas receptoras) en 50 ml de PSY suplementado con los antibióticos adecuados hasta que alcancen fase exponencial tardía (4 – 5 días). Las cepas donadoras, *E. coli* S17.1 con cada una de las construcciones a transferir, se cultivan en 3 ml de LB con los antibióticos correspondientes, durante 16 h (se inician los cultivos un día antes de llevar a cabo la conjugación).
2. El mismo día que se va iniciar el proceso, se refrescan los cultivos de las cepas donadoras en tubos con 3 ml de LB suplementado con antibióticos, mediante inoculación con 150 µl de los cultivos del día anterior y se dejan crecer hasta que alcancen la fase logarítmica (DO_{600} entre 0,6 – 0,8), aproximadamente 3 h después.
3. Se centrifugan 5 ml de la cepa receptora (*B. diazoefficiens*) y 1 ml de la donadora (*E. coli* S17.1). Se descarta el sobrenadante y se lava dos veces con 1 ml de medio PSY.
4. Se resuspende el pellet obtenido en 100 µl de PSY y se coloca la suspensión en el centro de la placa de PSY sin antibióticos, se deja secar y se incuba 48 h a 30°C.
5. Pasada la incubación, se preparan dos placas de PSY con los antibióticos correspondientes por cada conjugación para poder llevar a cabo la selección

de los transconjugantes, añadiéndole siempre cloranfenicol 15 µg/ml, para evitar el crecimiento de las células de *E. coli*.

6. Se recoge la masa celular de la gota inoculada con el asa de siembra y se resuspende en 1 ml de PSY sin antibióticos.
7. Finalmente, se siembran 30 y 200 µl de la suspensión celular obtenida por conjugación en cada una de las placas de PSY suplementadas con los antibióticos correspondientes. Se incuban a 30°C hasta la aparición de colonias (aproximadamente 10 – 15 días). Una vez obtenidas colonias se siembran en placa en estría con los mismos antibióticos para verificarlas posteriormente.

Para casos en los que el plásmido a transferir posea la misma resistencia a antibióticos que la cepa de *E. coli* S17.1, se llevaron a cabo cruces triparentales desde las cepas donadoras derivadas de *E. coli* DH5α a las cepas correspondientes de *B. diazoefficiens* empleando una cepa de *E. coli* “helper” (*p. ejem.* HB101 pRK2013; Tabla 4.1) que permite la transferencia de ADN a las células de *B. diazoefficiens*.

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

La construcción de cepas de *B. diazoefficiens* mutantes en un determinado gen por delección en fase, se llevó a cabo empleando derivados del plásmido suicida pK18*mobsacB* (Tabla 4.2) que portan las regiones 5' y 3' del gen a mutar (aproximadamente 600 pb cada una de ellas; fragmentos “up” y “down”, respectivamente) clonadas en fase, de manera que codifiquen un polipéptido de pequeño tamaño (el tamaño del ADN, desde el ATG de la proteína codificada por el gen a mutar al codón de parada, debe ser múltiplo de tres para mantener el mismo marco abierto de lectura). De esta manera se asegura que con la delección no se generan proteínas aberrantes y, por otro lado, no se elimina ningún elemento 5'- o 3'-UTR del transcrito, con la finalidad de evitar efectos polares sobre otros genes.

Para la construcción de los diferentes plásmidos derivados de pK18*mobsacB*, se amplifican por PCR (ver apartado 4.4.7) ambos fragmentos de ADN necesarios para cada construcción empleando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (Thermo). Las dos parejas de oligonucleótidos necesarias para la amplificación de

ambos fragmentos de ADN son portadoras, en sus extremos, de la secuencia diana para endonucleasas de restricción compatibles con su clonación en pK18*mobsacB*. La diana de restricción del extremo 3' del fragmento "up" y del extremo 5' del fragmento "down" debe ser común, de manera que permita el clonaje en fase de ambos fragmentos. La correcta inserción de ambos fragmentos en el plásmido suicida se verifica mediante PCR, perfil de restricción y secuenciación.

Para la delección del gen de interés empleando el plásmido específico construido, se realiza una estrategia de recombinación doble con la finalidad de la eliminación de la región cromosómica deseada. Para ello, se emplea la cepa donadora de *E. coli* S17.1 con el plásmido de interés para introducirlo en la cepa parental de *B. diazoefficiens*. Se seleccionan los clones transconjugantes por resistencia a kanamicina. Los clones seleccionados se transfieren en estría a una placa nueva de PSY suplementado con kanamicina. A continuación, por PCR se verifica la recombinación simple del plásmido, comprobando a su vez si ha ocurrido con el fragmento 5' o 3'. Una vez comprobados los clones, se fuerza la recombinación doble sembrando en estriado los clones en una placa de PSY adicionada con sacarosa al 10%. Debido a la sensibilidad a sacarosa que confiere el plásmido pK18*mobsacB*, únicamente los clones que pierdan el plásmido podrán crecer en presencia de sacarosa (cepa parental o recombinación doble). Se espera hasta la aparición de colonias, las cuales se transfieren con una misma punta a dos placas independientes de PSY, suplementadas o no con kanamicina. La comprobación de la delección del gen, se realiza por PCR en aquellos clones que crezcan solo en ausencia de kanamicina. Se realizan otras reacciones de PCR con diferentes combinaciones de oligonucleótidos, para verificar la correcta delección del gen de interés.

4.4.17. Tratamiento con ADNasa de muestras de ARN

Para la eliminación del ADN contaminante en las muestras de ARN se realiza un tratamiento con ADNasa con el siguiente procedimiento:

1. Preparar las mezclas de reacción:
 - Tampón de reacción 10× → 20 µl
 - Inhibidor de ARNasas (Roche) → 3 µl
 - ADNasa I (Promega) → 5 - 10 µl
 - Muestra de ARN → x volumen (hasta 100 µg como máximo)

- H₂O ultrapura → hasta 200 µl
- 2. Incubar a 37°C durante 60 min o 120 min (para 5 o 10 µl de ADNasa I, respectivamente) y transferir al hielo.
- 3. Purificar las muestras de ARN limpias de ADN con el kit comercial RNAeasy MiniKit (Qiagen).
- 4. Añadir 700 µl de tampón RLT adicionado con β-mercaptoetanol según las instrucciones del proveedor a 200 µl de reacción y mezclar por pipeteo. Añadir 500 µl de etanol 100%.
- 5. Aplicar 700 µl de la mezcla anterior sobre una columna del propio kit y colocarla sobre un tubo de microcentrífuga de 2 ml. Centrifugar durante 15 s a 13.000 rpm. Descartar el eluido y cargar de nuevo la columna con el resto de mezcla que queda, repitiendo la misma centrifugación y descartando de nuevo el eluido.
- 6. Transferir la columna a un nuevo tubo de microcentrífuga y añadir 500 µl de tampón RPE (conteniendo etanol) sobre la columna. Centrifugar 15 s a 13.000 rpm para lavar la columna y descartar el eluido.
- 7. Añadir otros 500 µl de tampón RPE sobre la columna y centrifugar 2 min a 13.000 rpm para secar la membrana de gel de sílice de la columna.
- 8. Para eliminar el etanol restante, colocar la columna en un nuevo tubo de microcentrífuga y centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min.
- 9. Eluir el ARN en un nuevo tubo de microcentrífuga con 40 µl de H₂O ultrapura centrifugando durante 1 min a 13.000 rpm. Pipetar el eluido y cargar de nuevo sobre la columna para hacer un nuevo paso de centrifugación igual al anterior con el objeto de obtener la mayor cantidad posible de ARN de la columna.
- 10. Medir la concentración de ARN en el Nanodrop (ver apartado 4.4.5), alicuotar las muestras y conservar a -80°C, tras congelación con nitrógeno líquido. Se retira previamente una alícuota de aproximadamente 1 µg de ARN para comprobar la integridad de ARN en electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (apartado 4.4.9). También se preservan 0,5 µg de ARN para comprobar la posible contaminación de ADN de las muestras por PCR.

La realización de la PCR de comprobación de ADN en las muestras de ARN se lleva a cabo una PCR con ADN polimerasa Dream Taq de igual forma que en el caso

de una PCR de rutina (apartado 4.4.7), teniendo en cuenta que el ADN molde es ARN (500 ng totales). Se usan 50 ng de ADN genómico de *B. diazoefficiens* 110*spc4* como control positivo de la reacción y H₂O ultrapura como control negativo. Los oligonucleótidos empleados para este tipo de comprobación son fixN4_for y fixN4_rev (Tabla 4.3).

4.4.18. Reverso transcripción

La obtención de ADN complementario (ADNc) desde ARN total, se realizó mediante reacción de reverso transcripción. Para ello se empleó la enzima SuperScriptII (Invitrogen).

1. Las reacciones se llevan a cabo en tubos de PCR que contienen 1 µg de ARN total, 2 µl del oligonucleótido específico (2 pmoles) o aleatorio (75 ng), 2,5 µl de dNTPs (10 mM) y H₂O ultrapura libre de ARNasas (Sigma) hasta 20 µl. Se incuban a 65°C durante 5 min, y se transfieren a continuación a un recipiente con hielo.
2. Se añade por reacción 6 µl de tampón 5×, 3 µl de solución de DTT (ditiotretitol) y 1 µl de solución RNaseOUT (40 U/µl; Invitrogen). Se incuba a 42°C (en el caso de usar oligonucleótidos específicos) o a 25°C (en el caso de oligonucleótidos aleatorios) durante 2 min.
3. Se añade 1,5 µl de reverso transcriptasa, y se realiza el ciclo de incubación, 25°C durante 10 min, 42°C durante 50 min y 70°C durante 15 min.
4. Se elimina el ARN de la muestra por lisis alcalina añadiendo 10 µl de NaOH 1 M y se incuba a 65°C durante 30 min. A continuación, se neutraliza el pH añadiendo 10 µl de HCl 1 M. Se purifica el ADNc como los productos de PCR (apartado 4.4.10.1). Se añaden alícuotas de 5 µl de ácido acético 3 M pH 5,2 hasta que el indicador de pH del tampón PB vire a amarillo.

En caso de emplear oligonucleótidos aleatorios se puede cuantificar la concentración de ADN con el Nanodrop (ver apartado 4.4.5), sin embargo, la concentración de ADN obtenida por oligonucleótidos específicos es demasiado baja para cuantificarla por esta metodología.

4.4.19. PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

La técnica de qRT-PCR es una variante de la PCR que se utiliza para amplificar ADN y simultáneamente cuantificar de forma relativa el producto de la amplificación en dos condiciones de cultivo o cepas, a partir de ADNc obtenido por reverso transcripción del ARN obtenido (ver apartado 4.4.4).

Las reacciones de qRT-PCR se llevan a cabo en placas de 96 pocillos de 0,1 ml de volumen en el sistema QuantStudio 3 Real-Time PCR (ThermoFisher Scientific). Cada reacción se lleva a cabo por triplicado en un volumen de 19 μ l, que contiene:

- 9,5 μ l de SYBR Green SuperMix (Bio-Rad)
- 4,5 μ l de mezcla de oligonucleótidos For y Rev (2 μ M concentración final cada uno)
- 5 μ l de ADNc a 0,02 ng/ μ l (0,1 ng total), 0,2 ng/ μ l (1 ng total) o 2 ng/ μ l (10 ng totales)

La eficiencia de cada pareja de oligonucleótidos y los cambios relativos en la expresión génica se calculan de acuerdo a la metodología de Pfaffl (2001). Los niveles de expresión de los genes de interés se normalizan frente a la expresión de un gen constitutivo como *sigA* o el 16S (Hauser et al., 2006; Torres et al., 2017).

4.4.20. Experimentos con “microarrays”

Para el análisis de la expresión de genes de *B. diazoefficiens* de forma global en la cepa mutante *nnrR* en comparación con la cepa parental, se llevaron a cabo experimentos de expresión génica mediante el empleo de un “microarray” customizado de *B. diazoefficiens* GeneChip BJAPEHa520090 (Affymetrix, Santa Clara, CA; Hauser et al., 2007). Para hibridar, se empleó ADNc fragmentado marcado en su región 3'. Las condiciones de cultivo, extracción de ARN, tratamiento con ADNasa I y síntesis de ADNc son básicamente similares a las descritas en los apartados 4.4.4, 4.4.17 y 4.4.18 y en las publicaciones Hauser et al., 2007 y Pessi et al., 2007. Se describe a continuación las reacciones de fragmentación y marcaje terminal en 3':

La fragmentación del ADNc tiene lugar con el siguiente procedimiento:

1. Preparar la mezcla de reacción (30 μ l de volumen final).
 - Tampón 10 \times One Phor-All (Amersham Pharmacia Biotech) \rightarrow 3 μ l
 - ADNc \rightarrow x μ l (2 – 3 μ g totales)
 - ADNasa I 0,2U/ μ l* (Amersham Pharmacia Biotech) \rightarrow 2 – 3 μ l (1 μ l por cada μ g de ADNc)
 - H₂O libre de nucleasas \rightarrow hasta 30 μ l
2. Incubar la reacción 37°C durante 2 – 3 min** (dependiendo del lote de ADNasa I).
3. Inactivar la ADNasa I a 98°C durante 10 min e incubar las muestras en hielo hasta análisis.
4. Comprobar el volumen de la reacción de fragmentación, si está por debajo de 30 μ l, completar con H₂O libre de nucleasas.
5. Verificar el resultado de la fragmentación en electroforesis corriendo unos 200 ng en gel de agarosa al 2% en TBE 1 \times (Tabla 4.6) durante 1 h a 100 V. Teñir el gel con SYBR gold (SYBR[®] Green II RNA staining agent –Invitrogen) diluido 10.000 en TBE 1 \times durante 30 – 40 min. La mayoría de los fragmentos deben estar entre 50 y 200 pb, en caso de que sean más grandes se puede repetir la fragmentación de las mismas muestras.
6. El ADNc fragmentado puede ser almacenado a -20°C.

* La solución de ADNasa I (0,2 U/ μ l) se prepara con 2 μ l de la enzima concentrada (10U/ μ l) distribuida por el proveedor, 10 μ l de tampón 10 \times One Phor-All y 88 μ l de H₂O libre de nucleasas.

** La eficiencia de la enzima depende de cada lote por lo que es recomendable realizar una cinética de fragmentación a distintos tiempos previa a la realización del experimento.

Antes de la hibridación del ADNc fragmentado con los “microarrays” se marca en el extremo 3’ según la siguiente metodología:

- Tampón de reacción de transferasa terminal 5 \times \rightarrow 10 μ l

- Reactivo de marcaje de ADN GeneChip (GeneChip ® DNA Labeling Reagent - Affymetrix) → 3 µl
- Deoxinucleótido transferasa terminal (Terminal Deoxynucleotido Transferase - Promega) → 2 µl
- ADNc fragmentado → x µl (2 – 2,5 µg totales)
- H₂O libre de nucleasas → hasta 50 µl

A continuación, se incuba la reacción a 37°C durante 75 min. Se para la reacción añadiendo 2 µl de EDTA 0,5 M. En ese momento las muestras están preparadas para su hibridación con el GeneChip BJAPETHa520090 lo cual puede hacerse inmediatamente, o bien ser preservadas a -20°C hasta su uso.

Tras la hibridación y lectura de las señales en el Centro de Genómica Funcional de Zúrich (FGCZ, Zúrich, Suiza), los datos se normalizan, procesan y analizan según la metodología descrita con anterioridad (Pessi et al., 2007; Mesa et al., 2008; Torres et al., 2014). El programa “Affymetrix GeneChip Operating Software” (GCOS) version 1.2 se emplea para la evaluación de la calidad y homogeneidad de las muestras además de para obtener los valores de intensidad de las señales (algoritmo MAS5). Para los estudios de expresión se utiliza el programa GeneSpring (Agilent Technologies). En dichos estudios de expresión, solo se consideran aquellas señales presentes en dos de las tres réplicas necesarias de una condición o cepa para llevar a cabo un análisis diferencial con fiabilidad. Se determinaron como genes diferencialmente expresados en la cepa mutante *nnrR* en comparación con la parental aquellos que presentaron un cambio de expresión ≥ 2 ó ≤ -2 .

4.5. Sobre-expresión y purificación de proteínas

4.5.1. Sobre-expresión y purificación de la proteína NnrR mediante el empleo del sistema IMPACT (Intein-Mediated Purification with an Affinity Chitin-Binding Tag)

La proteína NnrR empleada en el desarrollo de esta tesis se sobre-expresó como proteína recombinante NnrR-*Mxe*-Inteína-dominio de unión a quitina (CBD) en células de la cepa de *E. coli* ER2566. Para la determinación de las condiciones de máxima expresión se llevó a cabo la siguiente metodología:

1. Se transforman células competentes de *E. coli* ER2566 con el plásmido pMB1122 (Tabla 4.2). Se siembran 100 μ l en una placa de LB con ampicilina. El resto de la transformación se emplea para inocular un matraz de 20 ml de LB suplementado con el mismo antibiótico y se incuba durante toda la noche.
2. Se mide la DO₆₀₀ de una dilución 1/10 del cultivo de 20 ml, se transfiere el cultivo a un tubo de centrifuga de 50 ml. A continuación, se realizan 4 ciclos de lavado con medio LB sin antibióticos. Seguidamente, se resuspende el pellet en 2,5 ml de LB y se añaden 2,5 ml de glicerol 100% para conservar las células a -20°C.
3. Se distribuyen en alícuotas con el objeto de inocular cultivos de 20 y 500 ml de LB a DO₆₀₀ inicial de 0,02.
4. Se cultivan las células en dos matraces de 20 ml a DO₆₀₀ inicial de 0,02, los cuales se dejan crecer a 37°C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,3 aproximadamente. Luego, se pasan a 30°C durante 60 min hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,6 – 0,8.
5. En ese momento se toman alícuotas de 1 ml y a continuación se añade 0,1 mM de IPTG (Tabla 4.6) a los matraces. Al cabo de 2 h tras añadir IPTG se vuelven a tomar alícuotas para su análisis posterior en un gel de PAGE-SDS (apartado 4.3.4). Las alícuotas se centrifugan (13.000 rpm, 2 min), se elimina el sobrenadante y se conservan a -20°C.
6. El resto de uno de los cultivos (unos 17 ml) se centrifuga 7 min a 5.500 $\times g$ y se lava el pellet con “column buffer” (Tabla 4.6). Se resuspende en 2 ml de

“column buffer” con el objeto de realizar una prueba de solubilidad. Para lo que se lleva a cabo la rotura de las células aplicando una presión constante de 120 Mpa con una prensa French (SLM). Se repite el proceso 3 veces. Se centrifuga 10 min a $8.000 \times g$, 4°C . Se analizan fracciones de la parte soluble y el pellet en un gel de PAGE-SDS.

Una vez establecidas las condiciones de máxima expresión y solubilidad, la proteína fue purificada mediante el sistema IMPACT empleando cultivos de mayor volumen según se detalla en el siguiente protocolo:

4.5.1.1. Inducción de las células para purificación a escala media

1. Se inoculan 500 ml de medio LB en un matraz de 2 litros y se incuba a 37°C y 170 rpm hasta alcanzar una DO_{600} de 0,3. Posteriormente se incuba a 30°C , 1 h aproximadamente.
2. Cuando la DO_{600} se encuentra en valores entre 0,6 y 0,8 se induce la expresión de la proteína por la adición de 0,1 mM de IPTG (Tabla 4.6) y se incuba durante 2 h a 30°C .
3. Se centrifuga 7 min a $5.500 \times g$ y se lava el pellet con “column buffer” (Tabla 4.6). En este punto se pueden conservar los pellets a -20°C o proceder a la purificación.

4.5.1.2. Fraccionamiento celular

1. Se resuspenden las células procedentes de 500 ml de cultivo en 5 ml de “column buffer” (Tabla 4.6) con ADNasa ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$).
2. Se lleva a cabo la rotura de las células aplicando una presión constante de 120 Mpa con una prensa de French (SLM). Se repite el proceso 3 veces.
3. Se centrifuga 10 min a $8.000 \times g$, 4°C , para eliminar las células que no se han roto. El sobrenadante obtenido se centrifuga de nuevo en las mismas condiciones anteriores durante 60 min.

4.5.1.3. Cromatografía de afinidad (sistema IMPACT)

1. Se diluye el sobrenadante hasta llevarlo a 50 ml con “column buffer” (Tabla 4.6).

2. Previamente a cargar la muestra, hay que preparar la columna mediante el siguiente procedimiento:
 - a. Añadir 10 ml de resina de quitina al 50% en etanol (Chitin resin - NEB) sobre una columna cromatográfica vacía. La columna queda con un volumen de 5 ml de resina.
 - b. Lavar la columna con 5 V (volúmenes de columna) de H₂O_d y equilibrar con otros 5 V de “column buffer” (Tabla 4.6).
3. Se carga el sobrenadante diluido en la columna con un flujo de 0,5 – 1 ml por min.
4. Se lava la columna con 20 V ml de “column buffer” (Tabla 4.6).
5. Se escinde la quitina con 3 V de tampón de escisión (“column buffer” que contiene 50 mM de DTT) y se deja que fluya hasta que quede 1 ml por encima de la resina. En ese momento se cierra el flujo, se tapa la columna y se incuba a temperatura ambiente durante 16 h.
6. Transcurrido ese tiempo, se abre la columna y se eluye la proteína con 4 V de “column buffer” (Tabla 4.6), en alícuotas de 1 ml.

4.5.1.4. Regeneración de la columna

Las columnas de quitina se pueden volver a usar entre 4 – 5 veces para la misma proteína, por lo que tras la purificación debe ser regenerada, según la siguiente metodología:

1. Lavar con 10 ml de “column buffer” (Tabla 4.6), con SDS al 1%.
2. Lavar con 10 ml de “column buffer” (Tabla 4.6), a pH 12.
3. Regenerar con 15 ml de NaOH 0,3 M.
4. Lavar con 100 ml de H₂O_d.
5. Conservar la columna a 4°C con etanol 20%.

4.5.2. Sobre-expresión y purificación de la proteína FixK₂-His₆

La proteína FixK₂ empleada en esta tesis doctoral es un derivado insensible a la oxidación en el que la cisteína 183 está intercambiada por serina (Bonnet et al., 2013). La expresión y posterior purificación del derivado C183S FixK₂ se llevó a cabo

a partir del plásmido pRJ0004 (Tabla 4.2; Bonnet et al., 2013) en el que la región codificante del gen *fixK2* está fusionada en fase en su extremo 3' a la secuencia de la etiqueta de seis histidinas procedente del vector que permite su posterior purificación como proteína recombinante FixK₂-His₆ (la cual se denomina FixK₂ a partir de este apartado). Este plásmido permite la sobreexpresión de la proteína bajo el control del promotor de T7 y es inducible por la presencia de IPTG.

4.5.2.1. Inducción de las células para purificación a escala media

Para la producción de esta proteína se seleccionó la cepa BL21(DE3) de *E. coli* que contiene el gen de la ARN polimerasa T7 del fago λDE3. Se transforman células competentes de esta cepa de *E. coli* con el plásmido pRJ0004 y se producen alícuotas de células listas para iniciar cultivos para la sobre-expresión de la proteína de igual manera como se describe para la proteína NnrR (apartado 4.5.1).

Los cultivos de expresión se realizan en matraces de 500 ml de volumen con 200 ml de medio LB, adicionado con antibiótico:

1. Precalear los matraces con medio a 37°C. A continuación, se inoculan con las células transformadas de BL21(DE3) y se incuban durante aproximadamente 2 h a 37°C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,3. Posteriormente se atemperan a 30°C durante aproximadamente 1 h.
2. Cuando la DO₆₀₀ alcanza valores comprendidos entre 0,6 – 0,8, se induce la expresión de la proteína por la adición de 0,1 mM de IPTG y se incuba durante 2 h a 30°C.
3. Se centrifuga 7 min a 5.500 × *g* y se lava el pellet con “binding buffer” (Tabla 4.6). En este punto se pueden conservar los pellets a -20°C o proceder a la purificación.

4.5.2.2. Fraccionamiento celular

1. Se resuspenden las células procedentes de 200 ml de cultivo en 5 ml de “binding buffer” (Tabla 4.6).
2. Se lleva a cabo la rotura de las células aplicando una presión constante de 120 Mpa con una prensa French (SLM). Se repite el proceso 3 veces.

3. Se centrifuga 10 min a $8.000 \times g$, 4°C , para eliminar las células que no se han roto. El sobrenadante obtenido se centrifuga de nuevo en las mismas condiciones anteriores durante 60 min.

4.5.2.3. Cromatografía de afinidad (sistema Ni-NTA)

En primer lugar, se prepara la columna de la siguiente manera:

1. Lavar la columna con H_2O . Seguidamente, se añaden $600 \mu\text{l}$ de solución de agarosa con Ni-NTA (Ni-NTA Agarose, Thermo Fisher Scientific) y se deja gotear para que la matriz, de color azul turquesa, se vaya formando en el fondo de la columna.
2. Una vez que se forma la matriz, y sin dejar que se llegue a secar, lavar tres veces con 1 ml de H_2O .
3. Equilibrar la columna pasando 1 ml de “binding buffer” (Tabla 4.6) 3 veces.

Una vez equilibrada la columna de agarosa Ni-NTA se procede a la purificación de la proteína:

1. Cargar en la columna el sobrenadante resultante del fraccionamiento celular y dejar pasar hasta su completa elución.
2. Lavar la columna con “binding buffer” (tabla 4.6) adicionado con imidazol a las siguientes concentraciones:
 - $5 \times 1 \text{ ml}$ a 5 mM de imidazol
 - $3 \times 1 \text{ ml}$ a 10 mM de imidazol
 - $3 \times 1 \text{ ml}$ a 30 mM de imidazol
 - $6 \times 1 \text{ ml}$ a 50 mM de imidazol
3. Eluir la proteína añadiendo $4 \times 1 \text{ ml}$ de tampón de lavado con imidazol a 200 mM y recoger el eluido en 4 alícuotas de 1 ml.
4. Añadir a la columna 1 ml de “binding buffer” (Tabla 4.6) adicionado de imidazol a 300 mM para asegurar una total elución de la proteína.
5. Lavar la columna con 1 ml de “binding buffer” (Tabla 4.6), y finalmente añadirle etanol 20% para su conservación a 4°C .

Una vez eluída la proteína FixK₂-His₆ se intercambia el tampón por “Happy Buffer” (Tabla 4.6) con la técnica de filtración en gel (apartado 4.5.3).

4.5.3. Filtración en gel (Columnas PD-10)

Para el intercambio del tampón de proteínas purificadas se empleó la técnica de cromatografía líquida de exclusión molecular para eliminar el exceso de sales, la cual consiste en pasar la muestra por una columna empaquetada con una matriz de dextrano, cuyo tamaño de poro permite que las moléculas de mayor tamaño fluyan entre los huecos de la matriz, mientras que las de menor tamaño son retenidas o ralentizadas al pasar por los pequeños poros que forma el polímero de dextrano. Para esta técnica se emplearon las columnas comerciales PD-10 (GE Healthcare Life Sciences), empaquetadas con 8,3 ml de gel de dextrano Sephadex G-25, que permiten el intercambio de sales de una muestra de hasta 2,5 ml. El protocolo suministrado con las columnas recomienda los siguientes pasos:

1. Cortar el extremo de la punta de la parte inferior de la columna y retirar la tapa superior, fijarla en un soporte y dejar que gotee el líquido que viene en la columna para evitar la deshidratación de la matriz.
2. Equilibrar la columna con aproximadamente 25 ml de tampón de elución con el que deseamos intercambiar la muestra.
3. Añadir hasta 2,5 ml de muestra y dejar eluir hasta su total absorción por la columna.
4. Añadir 6 ml de tampón de elución en 12 fracciones de 0,5 ml, recogiendo cada alícuota en tubos independientes, donde eluye la proteína en el nuevo tampón.

A continuación, se mide la concentración de proteína de cada una de las fracciones y se seleccionan aquellas de mayor concentración para experimentos posteriores.

4.5.4. Purificación de ARN polimerasa nativa de *B. diazoefficiens*

La purificación de ARN polimerasa de *B. diazoefficiens* se lleva a cabo usando un protocolo modificado similar al descrito por Beck et al., (1997). El procedimiento se describe a continuación:

1. Se obtienen 25 g (peso húmedo) de células de *B. diazoefficiens*, crecidas en condiciones óxicas hasta la fase exponencial tardía ($DO_{600} \approx 1$). Para ello se inoculan matraces de 2 l, con 0,5 l de PSY, a 0,02 de DO_{600} con un precultivo de *B. diazoefficiens* 110spc4. Se recogen las células a $5.500 \times g$, durante 15 min y se lava el pellet con solución de lavado celular (Tabla 4.6). Tras este paso se pueden conservar los pellets celulares a -20°C .
2. Se resuspende el pellet celular en 70 ml de tampón TGED (Tabla 4.6) que contiene 1 mM de AEBSF y 0,02 M de NaCl y se lleva a cabo la rotura celular en la prensa de French a 120 MPa, de igual manera que para el caso de extracción de fracción soluble y de membrana detallada en el apartado 4.2.3.
3. Al extracto crudo obtenido tras la rotura celular se añade 0,3% de polietilenimina P (Polymin P, solución de poly(ethyleneimine) al 50% (P/V) en H_2O ; Fluka). Previamente a su empleo, la “polymin P” se prepara al 20% diluida en H_2O , se ajusta el pH a 8 y finalmente se dializa frente a H_2O . Tras la adición de la polietilenimina se agita el extracto durante 15 min con agitador magnético, a 4°C .
4. Se centrifuga el extracto tratado a $27.000 \times g$ durante 15 min, 4°C y se recoge el pellet obtenido.
5. Ese pellet se lava 3 veces con tampón TGED (Tabla 4.6) al 0,2 M de NaCl. Para ello, cada vez, se homogeniza la suspensión agitando 15 min a 4°C y se precipita el extracto centrifugando a $27.000 \times g$ durante 15 min, 4°C .
6. Se eluye la ARN polimerasa usando el mismo procedimiento de lavado, con tampón TGED (Tabla 4.6) pero en este caso a 0,8 M de NaCl, recogiendo el sobrenadante y desechando el pellet. Se realizan tres lavados de este tipo.
7. Al sobrenadante total obtenido de los tres lavados se le añade $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido a una saturación final del 65% (43 g por cada 100 ml). La suspensión se agita con agitador orbital durante 15 min, a 4°C y posteriormente se precipita por centrifugación durante 30 min, a $27.000 \times g$.
8. El pellet obtenido se disuelve en tampón TGED (Tabla 4.6) con 0,02 M de NaCl en el menor volumen posible, y se dializa frente a 1 l del mismo tampón

- durante una noche a 4°C con agitador magnético. La diálisis se lleva a cabo en tubos de membrana de diálisis de 3500 Da de tamaño de poro, con una capacidad de 1 ml/cm de tripa (Spectrum™).
9. Se recoge la muestra dializada y se centrifuga a $27.000 \times g$, 15 min, 4°C. Se desecha el pellet y se recoge el sobrenadante, que será cargado posteriormente en una columna EMD-DEAE (Merck), previamente equilibrada, acoplada en un sistema de cromatografía líquida ÄKTA FPLC (GE Healthcare). El flujo se fija a 1 ml/min, y la elución de la ARN polimerasa tendrá lugar con un gradiente lineal de 75 ml de NaCl de 0,02 a 1,2 M.
 10. A partir del cromatograma obtenido, se eligen las alícuotas con proteína y se comprueba la presencia de ARN polimerasa por ensayo de IVT general (apartado 4.6.1.5), usando UTP-³H (Uridine 5'-Triphosphate, Tetrasodium Salt, [5,6-³H]-, 1 mCi (37 MBq); Perkinelmer) como nucleótido marcado radioactivamente.
 11. Aquellas alícuotas que presentan actividad IVT se dializan juntas en un tubo de membrana de diálisis de 6.000-8.000 Da de tamaño de poro (0,4 ml/cm) (Spectrum™) frente a 1 l de TGED (Tabla 4.6) con 0,02 M de NaCl, durante toda la noche, a 4°C y en agitación.
 12. Se recoge la muestra dializada y se lleva a cabo otra cromatografía de afinidad en el mismo sistema ÄKTA FPLC, en este caso con una columna HiTrap Heparin (GE Healthcare), a la cual se aplica el mismo gradiente que en el caso anterior para eluir la ARN polimerasa, pero en un volumen de 150 ml. Se eligen una serie de alícuotas que contienen proteína y se comprueba la presencia de ARN polimerasa por ensayo de IVT general (apartado 4.6.1.5).
 13. Las fracciones que contienen la polimerasa se agrupan y se vuelven a dializar de la misma manera que en la última diálisis.
 14. Se concentra la muestra por ultrafiltración con una membrana YM30 (Amicon) y se conserva en 50% de glicerol a -20°C o -80°C.
 15. La pureza de las fracciones se comprueba por PAGE-SDS (ver apartado 4.3.4).

4.6. Ensayos de transcripción e interacción proteína-ADN

4.6.1. Ensayo de transcripción *in vitro* específico de ronda múltiple (IVT)

Para analizar la capacidad de proteína FixK₂ recombinante purificada de transcribir una determinada diana, se llevó a cabo la técnica de transcripción *in vitro* (IVT), en la que se analiza la transcripción desde la región promotora (genuina o con mutaciones) del gen objeto de estudio. Para este ensayo se requiere principalmente ADN molde libre de ARNasas, UTP marcado radiactivamente con α -³²P, ARN polimerasa de *B. diazoefficiens* y proteína FixK₂ purificada.

4.6.1.1. Preparación de ADN molde

Como ADN molde se han usado los plásmidos descritos en la Tabla 4.10 que contienen las regiones promotoras que portan cajas FixK₂ de varis genes. Como control se usa el plásmido pRJ9601 con la región promotora del gen *rrn*, que en ensayos de IVT da lugar a un transcrito de 240 nucleótidos, tanto cuando se emplea la ARN polimerasa de *B. diazoefficiens* como la de *E. coli*, y de forma independiente a la presencia de la proteína FixK₂. La construcción de los plásmidos se llevó a cabo con las especificaciones de la siguiente tabla.

Tabla 4.10. Plásmidos para IVT con sus características más relevantes.

Plásmido	Gen(es)	Fragmento amplificado	Oligonucleótidos usados para la amplificación del fragmento (Secuencias en la Tabla 4.3)	Vector de clonación
pMB1400	<i>nnrR/nnrS</i>	258 pb (<i>Bam</i> HI– <i>Eco</i> RI)	<i>nnrR_6_for</i> , <i>nnrR_6_rev</i>	pRJ8870*
pMB1401	<i>cycA</i>	264 pb (<i>Eco</i> RI– <i>Hind</i> III)	<i>cycA_1_for_IVT</i> , <i>cycA_1_rev_IVT</i>	
pMB1402	<i>bll3466</i>	380 pb (<i>Bam</i> HI– <i>Eco</i> RI)	<i>bll3466_3_for</i> , <i>bll3466_3_rev</i>	
pBD4020	<i>nosR</i>	486 pb (<i>Xba</i> I– <i>Eco</i> RI)	<i>nosR_For_Transc</i> , <i>nosR_Rev_Transc</i>	
pMB1363	derivado <i>fixN</i>	573 pb (<i>Bam</i> HI– <i>Eco</i> RI)	<i>fixN4_for</i> , <i>fixN4_rev</i>	pRJ9519
pMB1364	derivado <i>fixN</i>	573 pb (<i>Bam</i> HI– <i>Eco</i> RI)	<i>fixN4_for</i> , <i>fixN4_rev</i>	
pMB1367	derivado <i>fixN</i>	573 pb (<i>Bam</i> HI– <i>Eco</i> RI)	<i>fixN4_for</i> , <i>fixN4_rev</i>	
pMB1414	<i>norC</i>	243 pb (<i>Eco</i> RI– <i>Hind</i> III)	<i>norC11_for</i> , <i>norC12_rev</i>	
pMB1415	derivado <i>norC</i>	243 pb (<i>Eco</i> RI– <i>Hind</i> III)	<i>norC11_for</i> , <i>norC12_rev</i>	
pMB1417	derivado <i>norC</i>	243 pb (<i>Eco</i> RI– <i>Hind</i> III)	<i>norC11_for</i> , <i>norC12_rev</i>	

*El plásmido pRJ8870 (Mesa et al., 2008) posee dos terminadores transcripcionales *rrn* de *B. diazoefficiens*. En la región comprendida entre ambos se clona el fragmento que posee la caja FixK2 compartida por los dos genes divergentes *nnrR* y *nnrS*. Por lo que se obtienen dos transcritos en una misma reacción de IVT. Sin embargo, el vector pRJ9519 (Beck et al., 1997) sólo contiene un terminador transcripcional *rrn*, generándose un único transcrito en cada reacción.

Tras la construcción de los plásmidos, se aisló ADN de los mismos mediante el empleo de “Midipreps” (apartado 4.4.2.2.2) y seguidamente, con el objeto de eliminar contaminación por ARNsas que pudieran interferir en la reacción de transcripción, se preparó ADN de cada uno siguiendo el siguiente protocolo:

Materiales y métodos

1. Se toma 1 µg de ADN y se completa el volumen hasta 500 µl con H₂O ultrapura (Sigma).
2. Añadir 500 µl de biofenol (fenol/cloroformo/alcohol isoamílico) y agitar en vórtex 5 min.
3. Centrifugar 10 min, 4°C, 14.000 rpm y pasar a un nuevo tubo la fase acuosa.
4. Añadir a esa fase acuosa 1 V de cloroformo (450 µl) y agitar en vórtex 5 min.
5. Centrifugar 10 min, 4°C, 14.000 rpm y transferir la fase acuosa superior a un nuevo tubo.
6. A ese volumen se le añade 2,5 V (1 ml) de etanol 100% frío. También se añade 1/10 V (40 µl) de acetato sódico 3 M, pH 5,2 y se invierte el tubo tres veces.
7. Para precipitar el ADN, incubarlo a -20°C durante una noche o a -80°C durante 1h.
8. Tras ese tiempo, centrifugar el tubo a 14.000 rpm, 4°C durante 1 h.
9. Después de la centrifugación, se retira el etanol y se lava el pellet con etanol 70%, sin resuspenderlo.
10. Centrifugar 10 min, 4°C, 14.000 rpm y retirar completamente el etanol con cuidado.
11. Dejar secar el pellet 20 – 30 min al aire.
12. Resuspender en 20 µl de H₂O ultrapura. Por último, se determina con el Nanodrop la concentración de ADN (ver apartado 4.4.5).

Con el objeto de evitar la degradación de ARN por las ARNasas durante el experimento de IVT se usa material de vidrio esterilizado en horno Pasteur a 180°C, y el material de plástico se autoclava envuelto en papel de aluminio para evitar su contaminación. Los tubos de centrífuga se obtienen específicamente libres de ARNasas según lo especificado por la casa comercial. Los reactivos (etanol, biofenol, cloroformo) se emplean específicamente para este ensayo o si son soluciones acuosas se tratan con H₂O DEPC o se realizan las diluciones en H₂O ultrapura.

4.6.1.2. Reacción de transcripción

Para llevar a cabo la reacción de transcripción se mezcla en un tubo de centrifuga:

- ADN circular (≈ 700 ng/ μ l) \rightarrow 1 μ l
- Tampón de IVT 5 \times (Tabla 4.6) \rightarrow 4 μ l
- Inhibidor de ARNasas (40 U/ μ l) \rightarrow 0,5 μ l
- NTPs (ATP, GTP, CTP y UTP, 10 mM cada uno) \rightarrow 2 μ l
- ARN polimerasa de *B. diazoefficiens* \rightarrow 1,5 μ g total en la reacción
- *UTP α -³²P [Uridine 5'-triphosphate,[α -³²P]-50mM Tricine (pH 7.6) Shipped in lead Shipped on dry ice. 800Ci (29.6TBq)/mmol (Perkinelmer)](10 μ Ci/ μ l) \rightarrow 0,1 μ l
- Proteína purificada FixK₂ \rightarrow x μ l (1,25 y 2,5 μ M)
- H₂O ultrapura \rightarrow hasta 20 μ l

* UTP α -³²P se añade a la reacción en el laboratorio de radiactividad, a partir de ese paso todo se lleva a cabo en ese laboratorio.

Tras mezclar todos los componentes de la reacción, la técnica sigue de la siguiente manera:

1. Se incuba la reacción a 37°C durante 30 min. Pasado el tiempo de incubación se para la reacción colocando las muestras en hielo.
2. Se adicionan 180 μ l de H₂O ultrapura (Sigma), 200 μ l de biofenol (phenol: cloroformo: alcohol isoamílico) y 20 μ l de acetato potásico 3M pH 5,2 y se mezcla por inversión manual.
3. A continuación, se centrifuga a 12.000 rpm durante 5 min. Se recoge la fase superior acuosa y se añade en un tubo de centrifuga que contiene previamente 500 μ l de etanol 100% frío.
4. Se deja precipitar el ARN a - 20°C al menos durante una noche. Tras la incubación, se centrifuga a 13.000 rpm durante 1 h y se elimina el sobrenadante.

5. Se lava el pellet con etanol 70% (200 μ l). Centrifugar 10 min, 4°C, 14.000 rpm y se retira de nuevo el etanol.
6. Dejar secar 20 – 30 min al aire y resuspender el pellet en 8 μ l de solución Sanger (Tabla 4.6). Se calienta la resuspensión durante 2 min a 90°C.
7. Cargar 4 μ l de la muestra en un gel de secuenciación. Preservar otros 4 μ l por si fuera necesario repetir el gel o emplearlos en otro gel para comparar muestras.

4.6.1.3. Marcadores de ARN

La generación de marcadores de tamaño se lleva a cabo empleando fragmentos de ADN lineales que den lugar a transcritos de longitud conocida:

- *ADN lineal (\approx 700 ng/ μ l) \rightarrow 1 μ l
- Tampón de IVT 5 \times (Tabla 4.6) \rightarrow 4 μ l
- Inhibidor de ARNasa (40 U/ μ l) \rightarrow 0,5 μ l
- NTPs (ATP, GTP, CTP, 10 mM cada uno) \rightarrow 1 μ l
- UTP 100 μ M \rightarrow 2,4 μ l
- ARN polimerasa del fago T3 (100 nM)(Thermo Fisher Scientific) \rightarrow 3 μ l
- **UTP α -³²P [Uridine 5'-triphosphate,[α -³²P]-50mM Tricine (pH 7.6) Shipped in lead Shipped on dry ice. 800Ci (29.6TBq)/mmol (Perkinelmer) (10 μ Ci/ μ l)] \rightarrow 1 μ l
- H₂O ultrapura \rightarrow hasta 20 μ l

* El ADN lineal se obtiene de los plásmidos pRJ9601 y pRJ8817, digeridos con las enzimas *Bst*XI y *Bgl*II, respectivamente, obteniéndose fragmentos de 286 y 180 nucleótidos que se usan como marcadores moleculares. ** UTP α -³²P se añade a la reacción en el laboratorio de radiactividad, a partir de ese paso todo se lleva a cabo en ese laboratorio.

Tras la reacción de IVT, las muestras se procesan de igual manera a lo descrito en el apartado anterior, con la salvedad de que los pellets se resuspenden

de forma individual en 100 μ l de solución Sanger y se cargan 3 μ l en el gel. Se pueden conservar a -20°C durante 3 meses.

4.6.1.4. Electroforesis en gel de secuenciación urea/acrilamida

La detección de los transcritos de ARN generados en las reacciones de IVT se lleva a cabo por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 6% con 7 M de urea en TBE 1 \times , la metodología empleada es la siguiente:

1. Se prepara la mezcla del gel, que contiene: 75 g de urea, 15 ml de TBE 10 \times (Tabla 4.6), 22,5 ml de una mezcla de acrilamida:bisacrilamida 40% (19:1)(VWR) y se completa con H₂O-DEPC (Tabla 4.6) hasta 150 ml.
2. Se disuelve la acrilamida y la urea en un baño a 37°C, en agitación. Se filtra la solución con vacío utilizando filtros Stericup (Millipore) y se puede almacenar a 4°C para su posterior uso. Se toman 40 ml de la mezcla del gel y justo antes de verterla entre los cristales se añade APS preparado en fresco (Tabla 4.6; 400 μ l) y TEMED 6 M (40 μ l).
3. La preparación del gel requiere de dos cristales tratados con xileno por la cara en contacto con el gel. Ambos se limpian muy bien con alcohol y se colocan en contacto por la cara xilenizada, separados entre ellos por unos separadores de plástico. Se fijan ambos cristales juntos con pinzas y se colocan en un soporte en un ángulo de 20°. Se vierte la mezcla del gel y finalmente se coloca el peine entre ambos y la parte superior, que generará los pocillos.
4. Una vez polimerizado el gel, previamente a cargarlo se debe calentar, para ello se hace pasar corriente eléctrica (40 V) durante 1 h, en tampón TBE 0,5 \times (Tabla 4.6).
5. Una vez que el gel alcance 50°C de temperatura, valor que se conoce gracias a un indicador de temperatura que porta uno de los cristales, se limpian los pocillos para eliminar la urea con una jeringa que contiene TBE 0,5 \times (Tabla 4.6). Inmediatamente después se cargan las muestras y los marcadores. Se aplica la misma corriente que la empleada para calentar el gel y se deja correr

durante 2 h, tiempo en el que el azul de bromofenol de la solución Sanger llega al final del gel.

6. Tras la finalización de la electroforesis se separan los cristales y se transfiere el gel a una lámina de papel Whatman 3MM. Se cubre con un papel film y se seca a 80°C durante 2 h, en un secador de geles conectado a una bomba de vacío.
7. Finalmente se coloca el gel seco en contacto con una placa amplificadora Phosphor-Screen GP de 35 × 43 cm de Molecular Dynamics. La placa previamente debe ser neutralizada con luz durante 15 min.
8. Tras al menos 24 h de exposición se revela la placa mediante un Phospho-Imager (Molecular Dynamics), que detecta las señales radiográficas.

4.6.1.5. IVT con UTP-³H

La detección de la presencia de ARN polimerasa en las diferentes alícuotas durante su purificación (apartado 4.5.4) se realiza por ensayo de IVT usando UTP marcado con ³H (tritio) en lugar de con ³²P. Las reacciones se llevan a cabo en tubos de microcentrífuga en un volumen total de 50 µl, y contienen:

- ADN circular (Plásmido pRJ9601; Tabla 4.2) (≈700 ng/ul) → 1 µl
- Tampón de IVT 5× (Tabla 4.6) → 10 µl
- Inhibidor de ARNasa (40 U/ ul) → 0,5 µl
- NTPs (ATP, GPT, CTP y UTP, 10 mM cada uno) → 5 µl
- *UTP-³H (Uridine 5'-Triphosphate, Tetrasodium Salt, [5,6-³H]-, 1 mCi (37 MBq) de Perkinelmer) → 1 µl
- Muestra (eluido en la purificación de la ARN polimerasa de *B. diazoefficiens* – apartado 4.5.4) → 5 µl
- H₂O-DEPC → 27,5 µl

*El UTP-³H se añade en el laboratorio de radiactividad, y a partir de ese paso, todo se lleva a cabo en ese laboratorio.

También se emplean muestras como control positivo y negativo, en las que en lugar del eluido obtenido de la purificación de la ARN polimerasa de *B. diazoefficiens*, se emplea ARN polimerasa reconstituida con factor σ^{70} de *E. coli* (NEB) o H₂O-DEPC (Tabla 4.6), respectivamente.

Tras mezclar los tubos, incubar durante 30 min a 37°C. Pasada la incubación, colocar una gota de 25 μ l de cada reacción sobre un cuadrado pequeño de papel Whatman 3MM y lavar cada papel de manera independiente en tampón 2 \times SSC (Tabla 4.6) 4 veces, durante 5 min cada vez. Tras el lavado, introducir los papeles en viales de plástico que contienen 3 ml de cóctel de centelleo (Liquid Scintillation Cocktel - Perkinelmer). Colocar los viales en una gradilla y medir la actividad del ³H con un contador de centelleo (Beckman LS6500). Los datos de actividad se expresan en desintegraciones por minuto (DPM).

4.6.2. Resonancia de plasmón de superficie (Biacore)

Los ensayos de unión de proteína FixK₂ purificada a las cajas FixK₂ (genuinas o con mutaciones) presentes en la región promotora del operón *fixNOQP* y de los genes *norCBQD* se han realizado mediante el empleo de la técnica de resonancia de plasmón de superficie en un Biosensor Biacore X100 (GE Healthcare). En estos ensayos se emplea un chip con matriz de dextrano carboximetilado con estreptavidina (SA), el cual permite la inmovilización de ADN de doble cadena biotinilado. La técnica y los análisis de los datos crudos se llevaron a cabo en el Servicio de Proteómica y Bioquímica del Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD), Sevilla, España.

La técnica consiste en la interacción de un analito con un ligando inmovilizado en el chip que provoca cambios en la resonancia de plasmón de superficie de la lámina de oro inferior del chip, la cual es cuantificada como el cambio en el ángulo de la difracción de un haz de luz reflejado en la lámina de oro.

Previamente a la realización de la técnica se requieren diferentes soluciones, que deben ser filtradas y gaseadas antes de su uso. Además de la proteína FixK₂ purificada (analito) (metodología detallada en el apartado 4.5.2), también es necesario sintetizar las regiones promotoras de doble cadena de ADN biotiniladas (ligando). Para esto último, se anillan oligonucleótidos complementarios de unas 30

pb que son obtenidos de la casa comercial Sigma (secuencias de oligonucleótidos en la Tabla 4.3), teniendo en cuenta que el oligonucleótido reverso (Rev) es el marcado con biotina (Biot) en su región 5' y que la caja FixK₂ de interés queda en el centro del oligonucleótido.

El anillamiento de oligonucleótidos tiene lugar con la siguiente metodología:

1. Los oligonucleótidos For y Rev resuspendidos en tampón de inmovilización (Tabla 4.6) a una concentración de 100 μ M se mezclan con una proporción 9:1 (For:Rev-Biot), quedando el oligonucleótido biotinilado a 10 μ M.
2. La mezcla se calienta 10 min a 100°C y se dejan enfriar lentamente a temperatura ambiente.

A continuación, se lleva a cabo la inmovilización en el chip del promotor biotinilado de doble cadena obtenido. Esto se lleva a cabo de forma individual para cada uno de los promotores analizados (ligandos). Para ello:

- Se diluyen en tampón de inmovilización (Tabla 4.6) a una concentración final de 5 nM.
- Se lavan las dos células que posee el sistema con un flujo de tampón de inmovilización (Tabla 4.6) durante 6 min y posteriormente tienen lugar tres inyecciones consecutivas de tampón de activación (Tabla 4.6), de 60 s cada una y con un flujo de 10 μ l/min.
- A continuación, se lleva a cabo la inmovilización del ligando en la célula 2 hasta que se alcanzan 100 unidades de respuesta (UR).
- Finalmente se lavan cada una de las células con tampón de limpieza (Tabla 4.6).

Una vez fijado el ligando, se llevan a cabo los experimentos de interacción de la proteína FixK₂ (analito) con cada uno de los ligandos en tampón de desarrollo Biacore (Tabla 4.6), donde la proteína FixK₂ se inyecta en ambas células con un flujo de 40 μ l/min durante 120 s de contacto, seguidos de 120 s de disociación. El analito se diluye en tampón de desarrollo Biacore (Tabla 4.6) desde 0 a 250 nM y se va inyectando de manera aleatoria, con al menos un duplicado a baja concentración después de uno a concentración alta.

La regeneración de la superficie del chip se lleva a cabo con inyecciones de SDS al 0,2% a 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ durante 60 s. Cada ensayo cinético se repite al menos tres veces.

Los datos de interacción obtenidos se analizan usando el software de Evaluación Biacore X100 (GE Healthcare). Las constantes cinéticas (K_a , K_d , KD) se calculan, cuando es posible, por ajuste a un modelo 1:1 de Langmuir usando doble sustracción. Los parámetros obtenidos incluyen:

K_a → constante de asociación

K_d → constante de disociación

R_{max} → máxima respuesta

t_c → constante de transferencia de masa

En todos los casos, el ajuste fue verificado por chi cuadrado (χ^2) y para el control de calidad de cada ensayo se requieren los siguientes parámetros: transferencia de masa (t) $>10^8$, porcentaje de $\chi^2/R_{\text{max}} < 5\%$ y unidades de $R_{\text{max}} < 25$. Cuando los datos de interacción no se ajustan bien, la constante de equilibrio de disociación (KD) se calcula de las curvas obtenidas 5 s antes de que pare la inyección del analito, usando la herramienta Affinity Wizard del programa.

4.7. Caracterización molecular de la proteína NnrR

4.7.1. Titulación de NnrR con hemina en condiciones anóxicas

La titulación de la proteína NnrR se lleva a cabo con un protocolo similar, pero modificado, al descrito para DNR de *P. aeruginosa* por Giardina et al., (2008). Básicamente, la unión de hemo *in vitro* se determinó por la titulación en condiciones anóxicas de una solución de 20 μM de apoproteína NnrR (forma monomérica) en tampón de reconstitución (Tabla 4.6) con cantidades crecientes de una solución fresca de hemina (hemina bovina, Fluka) 0,5 mM disuelta en NaOH 0,1 mM y reducida con 3 mM de ditionito sódico*. La concentración de hemina en la solución de proteína fue aumentando tras la adición de alícuotas de 1 o 2 μl . Tras cada adición de hemina se realiza un espectro completo UV/Vis (250 – 650 nm) en un espectrofotómetro (WPA Biowave II).

La realización de toda la titulación tuvo lugar en el interior de una cámara de anaerobiosis (disponible en el grupo del Dr. Andrew J. Gates, Universidad de East Anglia, Reino Unido) por la que circuló una atmósfera inerte compuesta por N₂. Previamente a introducir todas las soluciones en la cámara de anaerobiosis, fueron gaseadas con N₂ durante al menos 10 min para frascos de 25 ml o 45 min para volúmenes mayores. Todos los frascos van cerrados con tapón de goma. La solución con proteína, de volúmenes entre 1 y 2 ml se gasea solamente 3 min, para evitar la desecación excesiva de la muestra.

*La solución de ditionito sódico se prepara en el interior de la cámara de anaerobiosis, introduciendo por un lado en un frasco tapado con septum el polvo de ditionito y en otro frasco el tampón o el H₂O donde se resuspende, ambos gaseados previamente.

4.7.1.1. Preparación de la solución de hemina

Para preparar la solución de hemina se sigue el siguiente procedimiento descrito en Ebert et al., 2017 con modificaciones. El procedimiento es el siguiente:

1. Pesar 5 mg de hemina bovina (Fluka) y añadir 1 ml de NaOH 0,1 mM.
2. Incubar durante 30 min y añadir 1 ml de Tris-HCl 1 M pH 7,5.
3. Centrifugar a $13.000 \times g$ durante 10 min. El sobrenadante obtenido es filtrado a través de un filtro de 0,2 μm (Millipore).
4. Medir la DO de la solución a 385 nm y determinar la concentración de hemina usando la ley de Lambert-Beer con un coeficiente de extinción molar de 50 para soluciones 1 mM.

4.7.2. Reconstitución de NnrR con hemina

La reconstitución con hemina de la proteína NnrR se lleva a cabo básicamente según la metodología descrita por Giardina y colaboradores (2008) para la proteína DNR de *P. aeruginosa*. Seguidamente se explica el procedimiento con las modificaciones incluidas para el caso de NnrR:

1. Mezclar apoproteína NnrR con un exceso de solución de hemina fresca (procedimiento de preparación en apartado 4.7.1.1) en una relación 1:3

- (NnrR:hemina). La proteína debe encontrarse en tampón de reconstitución (Tabla 4.6). Este paso se realiza en la cámara de anaerobiosis, con la precaución de gasear todas las soluciones antes de introducirlas en la misma.
2. Incubar la mezcla durante 2 h a 16°C.
 3. Eliminar el exceso de hemina mediante diálisis de la muestra, en un cassette de 3.500 Da de tamaño de poro (Slide-A-Lyzer Thermo Scientific), frente a 1 l de tampón de reconstitución (Tabla 4.6). La diálisis se lleva a cabo durante una noche en condiciones óxicas.
 4. Para eliminar la hemina en exceso tras la diálisis se realiza una filtración en gel de la muestra a través de una columna de Sephadex G-25 (PD-10) (procedimiento detallado en el apartado 4.5.3).
 5. Medir el espectro completo UV/Vis de la muestra de NnrR reconstituida con hemina en su forma férrica. (pico a 411 nm).
 6. Reducir la muestra con ditionito sódico 3 mM, preparado de igual forma que para el caso de la titulación y volver a recoger el espectro completo UV/Vis del complejo NnrR:hemo ferroso (pico a 425 – 427 nm).

4.7.2.1. Unión del complejo NnrR:hemo ferroso a óxido nítrico (NO)

Para determinar la unión de NO al complejo NnrR:hemo ferroso se adicionan 150 µl de una solución de NO gas 1,5 mM a 2 ml de la solución NnrR:hemo ferroso degaseada. Posteriormente, se recoge un nuevo espectro UV/Vis completo y se analiza la desaparición del pico de 425 nm y el cambio a un hombro a 389 nm.

4.8. Métodos Bioinformáticos

Los programas bioinformáticos utilizados en el desarrollo de este trabajo son los siguientes:

- BLAST (Basic Local Alignment Search Tool): Programa para alineamiento de secuencias de ADN, ARN o proteínas, basado en la base de datos del NCBI.
- Clone Manager: Programa informático para la simulación de clonajes, restricciones y mapeo gráfico de plásmidos.

Materiales y métodos

- FinchTV: Herramienta bioinformática para visualización y trabajo con secuencias de ADN.
- ExPASy (Expert Protein Analysis System): Servidor de proteómica que analiza secuencias y estructuras de proteínas.
- PSIPRED (PSI-blast based secondary structure PREDiction): Servidor de proteínas que predice estructuras secundarias de proteínas basadas en la secuencia de aminoácidos (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>).
- SWISS-MODEL: Servidor web de bioinformática estructural perteneciente a la plataforma ExPASy, dedicado al modelado de estructuras de proteínas 3D por homología con estructuras conocidas de otras proteínas.
- Discovery Studio Visualizer: Software para el análisis y modelado de estructuras y secuencias proteicas.
- KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes): Es una colección de bases de datos en línea que contiene información de genomas y rutas enzimáticas.
- Quantity One: Programa de adquisición, análisis y cuantificación de imagen de geles obtenidas por equipos de Bio-Rad (Bio-Rad).
- ImageLab: Programa de análisis de imagen de geles (Bio-Rad).

5

RESULTADOS

Chapter 1

Expanding the regulon of the *Bradyrhizobium diazoefficiens* NnrR transcription factor: New insights into denitrification pathway

Andrea Jiménez-Leiva, Juan J. Cabrera, Emilio Bueno, María J. Torres, Sergio Salazar, Eulogio J. Bedmar, María J. Delgado y Socorro Mesa

Versión modificada del manuscrito enviado a la revista *Frontiers in Microbiology* con ID: 468100 el día 26 - 04 - 2019

5.1. Chapter 1: Expanding the regulon of the *Bradyrhizobium diazoefficiens* NnrR transcription factor: New insights into denitrification pathway

5.1.1. Abstract

Denitrification in the soybean endosymbiont *B. diazoefficiens* is controlled by a complex regulatory network composed by two hierarchical cascades, FixLJ-FixK₂-NnrR and RegSR-NifA. In the former cascade, the CRP/FNR type transcription factors FixK₂ and NnrR exert a disparate control in response to microoxia and nitrogen oxides, respectively, on the expression of the *napEDABC*, *nirK*, *norCBQD*, and *nosRZDFYLX* genes, encoding the four denitrifying enzymes in this bacterium.

To identify additional genes controlled by NnrR and involved in the denitrification process in *B. diazoefficiens*, we compared the transcriptional profile of an *nnrR* mutant with that of the wild type, both grown in anoxic denitrifying conditions. This approach revealed that more than 170 genes were simultaneously induced in the wild type and under the positive control of NnrR. Among them, we found the *cycA* gene which codes for the so-called *c*₅₅₀ soluble cytochrome (CycA), previously identified as an intermediate electron donor between the *bc*₁ complex and the denitrifying nitrite reductase NirK. Here, we demonstrated that CycA is also required for nitrous oxide reductase activity. However, mutation in *cycA* neither affected *nosZ* gene expression nor NosZ protein steady-state levels. Further, *cycA*, similar to *nnrR* and its proximal divergently oriented *nnrS* gene, is a direct target for FixK₂ as determined by *in vitro* transcription activation assays. The dependence of *cycA* expression on FixK₂ and NnrR in anoxic denitrifying conditions was validated at transcriptional level, determined by quantitative PCR, but also at protein level by performing heme *c*-staining of soluble cytochromes. Thus, this study expands the regulon of NnrR and demonstrates the role of CycA in the activity of the nitrous oxide reductase, the key enzyme for nitrous oxide mitigation.

5.1.2. Strains and plasmids construction

Strains and plasmids used in this work and their corresponding description are compiled in Tabla 4.1 y 4.2. A *cy2* (bll2388) deletion mutant was constructed by markerless mutagenesis using the *sacB*-system (Schäfer et al., 1994). For that purpose, the 5' and 3' flanking regions of the *cy2* gene (614 and 609 bp fragments) were amplified by PCR using BLL1F/BLL1R and BLL2F/BLL2R primers pairs (Tabla 4.3). Both fragments were individually cloned in the pGEM-T easy vector, verified by sequencing and finally cloned *in tandem* in the suicide vector pK18*mobsacB*, yielding plasmid pMB2003. This plasmid was transferred via biparental conjugation to *B. diazoefficiens* by using *E. coli* S17-1 as donor and transconjugants were firstly selected by kanamycin resistance (single recombination), and secondly by sucrose resistance (double recombination) as previously described (Cabrera et al., 2016). The genomic organization of selected candidates was verified by PCR using gene-specific primers. Double recombination of plasmid pMB2003 with the *B. diazoefficiens* genome resulted in the replacement of the wild-type *cy2* gene encoding a 128 amino acids protein for an *in frame* truncated version encoding 23 amino acids in the *B. diazoefficiens cy2* mutant (Tabla 4.1 y 4.2).

Plasmids pMB1400 and pMB1401 were individually used as templates in the IVT activation assays. pMB1400 carries the divergent promoter of *nnrS* and *nnrR* genes on a *Bam*HI-*Eco*RI-digested 258-bp fragment amplified by PCR (combination of primers *nnrR_6_for* and *nnrR_6_rev*; Tabla 4.3). The fragment was then cloned into plasmid pRJ8870 (Mesa et al., 2008), that harbours two *B. diazoefficiens rrn* transcriptional terminators. pMB1401 consists on a *Eco*RI-*Hind*III-digested 289-bp *cycA* promoter fragment that was amplified by PCR, using the *cycA_1_for* and *cycA_1_rev* primers (Tabla 4.3) and then cloned into pRJ9519, which contains a *B. diazoefficiens rrn* transcriptional terminator (Beck et al., 1997).

The correct nucleotide sequence of all PCR-amplified fragments cloned in the corresponding plasmids was verified by sequencing.

5.1.3. Global transcriptional profiling of the *nnrR* mutant cultured in anoxic denitrifying conditions

The comparison of the transcriptional profile of a *B. diazoefficiens nnrR* mutant with that of the WT both cultured in anoxic denitrifying conditions, by using a custom-made GeneChip array (Hauser et al., 2007) revealed 1,242 genes that showed a differential expression in the *nnrR* mutant (Figure 5.1.1). The overlap of this group with the 1,514 genes differentially controlled in wild-type cells cultivated in anoxic denitrifying conditions in comparison to oxically cultivated cells resulted in 298 genes (Figure 5.1.1). We next focussed on those, among this latter group, which were induced in the WT and, at the same time, showed a downregulated expression in the *nnrR* mutant (i.e., NnrR exerts its role as an activator).

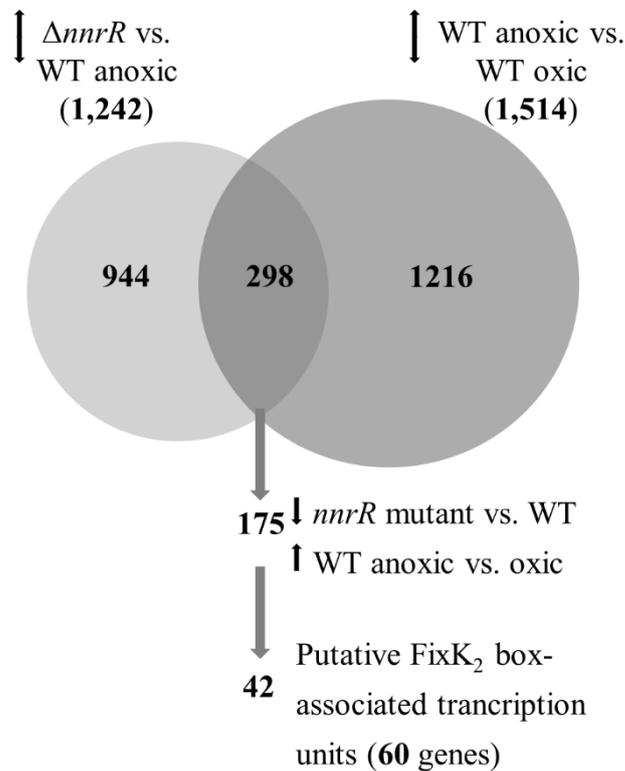


Figure 5.1.1. Venn diagram representing the group of differentially expressed genes in the *nnrR* mutant in comparison to the WT, both grown in anoxic denitrifying conditions (light grey circle), and the group of differentially expressed genes in cells of the WT grown in anoxic denitrifying conditions compared with cells grown in oxic conditions (dark grey circle). Numbers in parentheses indicate the total number of differentially expressed genes. The overlap of both groups represents 298 genes; among them, 175 genes showed a downregulated expression in the *nnrR* mutant and at the same time are induced in the WT grown in anoxic denitrifying conditions. The latter set contains 60 genes organized in mono-, or polycistronic transcriptional units that contain a putative FixK₂ box in the promoter region (42 FixK₂ boxes associated to transcriptional units, see Table 5.1.1). Up-down arrows refer to increased and decreased gene expression in microarray analyses.

Results

The comparison of both regulons yielded 175 genes (Figure 5.5.1; Supplementary Table S1). Next, in order to narrow down the number of genes to analyze in further experiments, we did a systematic search for promoter-associated putative FixK₂ binding sites as a first approximation, due to the homology between the consensus FixK₂ box (Bonnet et al., 2013), and the only so far known NnrR binding site present in the *norCBQD* promoter (Bueno et al., 2017). We then identified 60 genes within the 175 genes group that form part of 42 transcription units (mono- or polycistronic) associated to a putative FixK₂ box (Table 5.5.1). Within this group we found: (i) Three of the four structural gene clusters involved in denitrification, i.e., *nirK* (Velasco et al., 2001), *norCBQD* (Mesa et al., 2002) and *nosRZDFYLYX* (Velasco et al., 2004), encoding NirK, cNor and Nos, respectively; (ii) genes encoding cytochromes, such as *bll2388* (*cy2*) (Mesa et al., 2008) and *cycA* (cytochrome *c550*) (Bott et al., 1995); (iii) regulatory genes as *nnrR* itself and *rpoN1* that codes one of the two copies of the alternative sigma factor RpoN₁ which collaborates with the transcription factor NifA for the activation of genes involved in nitrogen fixation (reviewed in Dixon and Kahn, 2004). The downregulation of the *nnrR* gene observed in the *nnrR* mutant indicates, as it was described previously by Mesa and coworkers (2003), that NnrR does not negatively auto-regulate its own expression; (iv) two copies of the oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase involved in heme biosynthesis under oxygen limitation (i.e., *hemN1* and *hemN2*); (v) the *phbB* gene encoding PhaB, one of the two copies of NADP-acetoacetyl-CoA reductases involved in the second step of polyhydroxybutyrate (PHB) biosynthesis (Quelas et al., 2013). We next selected few candidates listed in Table 5.5.1 for validation by qRT-PCR of their gene expression profile based on microarray data. In these experiments, we could confirm that *norC*, *nosR*, *cycA*, *cy2*, and *rpoN1* genes are targets positively activated by NnrR (Figure 5.1.2), being *cycA* and its product the focus of our study.

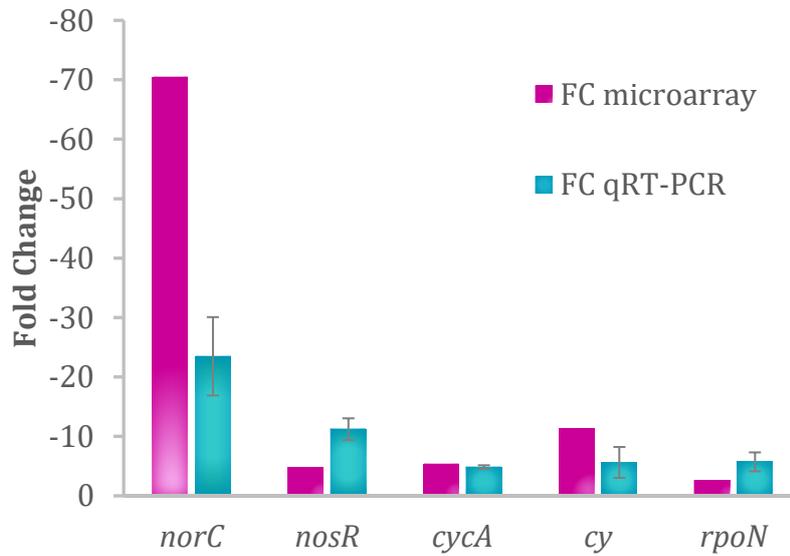


Figure 5.1.2. Expression data of selected genes determined by microarray (black bars) and qRT-PCR (grey bars). Fold change (FC) refers to the relative expression of *norC*, *nosR*, *cycA*, *cy2*, *norC*, and *rpoN1* genes in the *nnrR* mutant in comparison with the WT, both cultured in anoxic denitrifying conditions. qRT-PCRs were performed with two independent experiments, each one with six parallel amplification reactions.

TABLE 5.1.1. List of the 60 genes belonging to 42 putative FixK₂ box-associated transcription units whose expression is downregulated in the *nnrR* mutant in comparison to the WT, both cultured under anoxic denitrifying conditions, and at the same time are induced in the WT in anoxic denitrifying conditions compared to oxic conditions.

Query ^a	FC (<i>ΔnnrR</i> anoxia vs. WT anoxia) ^b	FC (WT anoxia vs. WT oxic) ^c	Locus_tag ^d	Gene name ^e	Product ^f	Position ^g	Motif ^h	Predicted operon structure ⁱ
bll0225	-2.7	3.1	Bdiaspc4_00775	<i>phbB</i>	acetoacetyl-CoA reductase	-86	TTGATGTCCGTCAA	–
blr0314	-4.8	23.1	Bdiaspc4_01230	<i>nosR</i>	regulatory protein NosR	-131	TTGATCCAGCGCAA	blr0314-blr0320
blr0315	-6.4	25.7	Bdiaspc4_01235	<i>nosZ</i>	TAT-dependent nitrous-oxide reductase	–	–	–
blr0316	-6.4	15.4	Bdiaspc4_01240	<i>nosD</i>	nitrous oxide reductase family maturation protein NosD	–	–	–
blr0317	-7.5	13.7	Bdiaspc4_01245	<i>nosF</i>	ABC transporter ATP-binding protein	–	–	–
blr0318	-9.3	23.1	Bdiaspc4_01250	<i>nosY</i>	ABC transporter permease	–	–	–
blr0319	-6.2	10.2	Bdiaspc4_01255	<i>nosL</i>	copper resistance protein CopZ	–	–	–
blr0320	-6.0	13.1	Bdiaspc4_01260	<i>nosX</i>	FAD:protein FMN transferase	–	–	–
blr0964	-4.3	2.0	Bdiaspc4_04660	–	NAD(P)/FAD-dependent oxidoreductase	-41	TTGATCTATGTCAT	–
blr0984	-5.6	2.4	Bdiaspc4_04770	–	AraC family transcriptional regulator	-245	TTGCTGCGGAGCAG	–
blr1311	-7.6	52.2	Bdiaspc4_06505	–	OmpW family protein	-60	TTGATCGGCGTCAA	–
bll1766	-7.1	19.6	Bdiaspc4_08945	–	OmpW family protein	-228	TTGATTGGTATCAA	–
blr1883	-2.6	9.5	Bdiaspc4_09550	<i>rpoN₁</i>	RNA polymerase σ ⁻⁵⁴ factor	-81	TTGCGGACATCAA	–
bll1944	-3.7	8.5	Bdiaspc4_09875	–	porin family protein	-174	TGGAGCGACACCAA	–
blr2006	-2.3	2.1	Bdiaspc4_10180	<i>id676</i>	hypothetical protein	-451	TTGATCAGGTGCAA	–
bll2007	-8.3	56.9	Bdiaspc4_10185	<i>hemN₁</i>	oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase	-138	TTGACATAACGCAA	–
bll2330	-4.2	21.6	Bdiaspc4_11930	–	VOC family protein	-73	TTGATCCAGATCAA	bll2330-bll2329-bsl2328
bll2329	-3.7	7.2	Bdiaspc4_11925	–	FAD-dependent oxidoreductase	–	–	–
bsl2328	-3.5	6.6	Bdiaspc4_11920	–	DUF2783 domain-containing protein	–	–	–

blI2388	-11.3	15.2	Bdiaspc4_12230	<i>cy2</i>	cytochrome <i>c</i> family protein	-435	TTGCGCCGGATCAG	–
blI2664	-2.3	3.9	Bdiaspc4_13755	–	DUF1254 domain-containing protein	-384	CTGCTCGACCTCAA	blI2664-blI2663
blr2763	-2.1	58.7	Bdiaspc4_14290	<i>ccoN/fixN</i>	cytochrome- <i>c</i> oxidase, <i>ccb3</i> -type subunit I	-70	TTGATTTCAATCAA	blr2763-blr2764- bsr2765-blr2766
blr2764	-2.9	55.5	Bdiaspc4_14295	<i>ccoO/fixO</i>	cytochrome- <i>c</i> oxidase, <i>ccb3</i> -type subunit II	–	–	–
blr2932	-7.6	7.3	Bdiaspc4_15155	–	methyl-accepting chemotaxis protein	-124	TCGAGCCGGCTCAA	–
blr2933	-6.2	2.8	Bdiaspc4_15160	–	PAS domain S-box protein	-294	TCGGGCCGGCTCAA	–
bsr3073	-3.8	4.2	Bdiaspc4_15875	–	hypothetical protein	-101	TTGACGCGGATCAA	–
bsI3211	-35.6	36.5	Bdiaspc4_16610	–	hypothetical protein	-411	TTGATCGCGATGAA	–
blr3212	-105.4	53.8	Bdiaspc4_16615	<i>norE</i>	cytochrome <i>c</i> oxidase subunit 3 family protein	-106	TTGCGTCGGCGCAA	blr3212-bsr3213
bsr3213	-14.6	7.5	Bdiaspc4_16620	–	hypothetical protein	–	–	–
blr3214	-70.4	81.2	Bdiaspc4_16625	<i>norC</i>	cytochrome <i>c</i>	-87	TTGCGCCCTGACAA	blr3214-blr3217
blr3215	-159.2	71.2	Bdiaspc4_16630	<i>norB</i>	nitric oxide reductase subunit B	–	–	–
blr3216	-69.9	56.3	Bdiaspc4_16635	<i>norQ</i>	CbbQ/NirQ/NorQ/GpvN family protein	–	–	–
blr3217	-16.8	17.6	Bdiaspc4_16640	<i>norD</i>	VWA domain-containing protein	–	–	–
blI3611	-4.3	2.3	Bdiaspc4_18640	–	caspase family protein	-330	TTGAACCACGTCAG	–
blI3835	-6.0	31.6	Bdiaspc4_19825	–	PepSY domain-containing protein	-93	TTGCTGCAAATCAA	–
blr4191	-6.7	6.0	Bdiaspc4_21720	–	histidine kinase	-187	TTGATCTGGATCAA	–
blr4352	-7.5	3.2	Bdiaspc4_22595	–	porin family protein	-433	TTGCGGGCGTGCAA	–
bsI4623	-3.4	4.9	Bdiaspc4_24190	–	hypothetical protein	-71	TTGATGAAGATCAA	–
blr4770	-2.8	2.3	Bdiaspc4_25015	–	lytic transglycosylase domain-containing protein	-246	TTGCGTCGGATCGA	–
blI5026	-7.0	2.3	Bdiaspc4_26405	<i>hppa</i>	K ⁺ -insensitive pyrophosphate-energized proton pump	-83	TTGTTCGAAATCAA	–
blr5774	-2.7	11.7	Bdiaspc4_30495	–	NAD(P)/FAD-dependent oxidoreductase	-459	TTGATCTTGCTCAA	blr5774-blr5775- bsr5776
blr5775	-4.1	10.8	Bdiaspc4_30500	<i>trxC</i>	thioredoxin TrxC	–	–	–
bsr5776	-2.7	26.2	Bdiaspc4_30505	–	DUF2892 domain-containing protein	–	–	–

bll5842	-3.3	2.3	Bdiaspc4_30840	<i>flaF</i>	flagellar biosynthesis regulatory protein FlaF	-43	TTAAGCGCGTTCAA	–
bll6222	-17.1	17.8	Bdiaspc4_32820	–	group III truncated hemoglobin	-89	TTGCGCTGCGACAA	–
blr6437	-5.7	2.1	Bdiaspc4_33940	–	SMP-30/gluconolactonase/LRE family protein	-80	TTGACAGGTCTCAA	–
bll6496	-4.0	2.1	Bdiaspc4_34245	–	EAL domain-containing protein	-374	ATGCCCTGGATCAA	–
blr7084	-4.1	4.4	Bdiaspc4_37380	<i>nnrR</i>	CRP/FNR family transcriptional regulator	-66	TTGCGCTATCGCAA	–
bsl7085	-29.2	133.8	Bdiaspc4_37385	–	DUF1858 domain-containing protein	-62	TTGCGCTCCAACAA	–
bll7086	-4.3	43.8	Bdiaspc4_37390	<i>hemN₂</i>	oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase	-140	TTGCGCGAGCGCAA	–
blr7089	-21	161.4	Bdiaspc4_37405	<i>nirK</i>	nitrite reductase, copper-containing	-74	TTGTTGCAGCGCAA	–
blr7544	-5.3	2.2	Bdiaspc4_39800	<i>cycA</i>	cytochrome <i>c</i> family protein	-137	TTGTTGCAGCGCAA	–
bll7628	-10.3	10.1	Bdiaspc4_40255	–	sterol-binding protein	-48	TTGTTCCCCTCAA	bll7628-bll7627
bll7627	-15	75.3	Bdiaspc4_40250	–	U32 family peptidase	–	–	–
blr7684	-4.0	2.7	Bdiaspc4_40605	–	hypothetical protein	-399	TTGATGTAGGTCGA	blr7684-blr7685
blr7685	-3.4	2.4	Bdiaspc4_40610	–	PilZ domain-containing protein	–	–	–
bll7787	-3.1	23.0	Bdiaspc4_41200	–	hypothetical protein	-118	TTGACCCAGATCAA	–
blr7961	-3.3	43.7	Bdiaspc4_42105	–	Hsp20/alpha crystallin family protein	-82	TTGAGACAAATCAA	–
bll7982	-4.3	31.2	Bdiaspc4_42210	–	class I SAM-dependent methyltransferase	-96	TTGATCTGAAACAA	bll7982-bll7981
bll7981	-5.9	22.1	Bdiaspc4_42205	–	dehydrogenase	–	–	–

^a Best blast hit in the *B. diazoefficiens* USDA 110 genome (Kaneko et al., 2002; GenBank acc. # NC_004463.1; RefSeq annotation as from January 2016).

^b Fold change (FC) values of gene expression in the *nnrR* mutant in comparison to the WT, both grown in anoxic denitrifying conditions.

^c FC values of gene expression in wild-type cells grown anoxic denitrifying conditions in comparison to those in cells grown oxically.

^d Nomenclature of *B. diazoefficiens* 110*spc4* genes according to the NCBI annotation (GenBank acc. # CP032617); Fernández et al., 2019.

^e Gene name according to the NCBI annotation with modifications marked in grey (GenBank acc. # CP032617); Fernández et al., 2019.

^f Protein/gene product according to the NCBI annotation (GenBank acc. # CP032617); Fernández et al., 2019.

^g Position of the first nucleotide of the motif relative to the annotated translational start site of the associated gene.

^h Predicted putative FixK₂ binding site.

ⁱ Prediction of the operon structure as described in Materials and Methods and previous published data.

5.1.4. *NnrR* and *FixK₂* are required for the anoxic induction of *CycA*

The *cycA* gene codes for the so-called cytochrome *c₅₅₀*, a *c*-type soluble cytochrome (*CycA*) (Bott et al., 1995), previously identified as an intermediate electron donor between the *bc₁* membrane complex and the denitrifying nitrite reductase NirK (Bueno et al., 2008). In order to confirm the positive control of *NnrR* on *cycA* also at protein level, we monitored the expression of *CycA* in the WT, and *nnrR* mutant by using heme-*c* staining analyses (Figure 5.1.3A). A *cycA* mutant was included as control in the experiments. For this purpose, the soluble fraction was isolated from cells grown under oxic, microoxic and anoxic denitrifying conditions (see Materials and Methods for further details). As shown in Figure 5.1.3A (lanes 1, 2 and 6), two stained bands of about 15 and 12 kDa were observed in the soluble fraction wild-type cells independently of the growth conditions. The 15 kDa band corresponds to the previously identified cytochrome *c₅₅₅* (*CycC*) encoded by *cycC* (Bott et al., 1995), and the NapB subunit of the periplasmic nitrate reductase (Delgado et al., 2003) that co-migrate together. The 12 kDa-band was not detected in the *cycA* mutant (Figure 5.1.3A, lanes 5, and 9), indicating that this band corresponds to *CycA*. Similarly, Bott and coworkers (1995) identified the 12-kDa band in the heme *c*-staining profiling of soluble cytochromes detected in oxic conditions as cytochrome *c₅₅₀* (*CycA*).

As shown in Figure 5.1.3A (lanes 1 and 2), *CycA* levels were similar in oxic or microoxic cultures of wild-type cells, while an about 2-fold induction of the *CycA* band was observed in the soluble fraction of the WT grown under anoxic denitrifying conditions (Figure 5.1.3A, comparison of lane 6 and lanes 1, and 2). In addition to the 15- and 12- kDa bands, two smaller cytochromes of about 10 and 9 kDa were also detected in the soluble fraction of wild-type cells cultured microoxically or in anoxic denitrifying conditions (Figure 5.1.3A, lanes 2, and 6). While the 10 kDa *c*-type cytochrome has not been yet identified, the 9 kDa *c*-type cytochrome corresponds to the soluble cytochrome *CycS* expressed in anaerobic, nitrate-grown cells (Mesa et al., 2008).

In the pattern of soluble *c*-type cytochromes detected in the *nnrR* mutant (Figure 5.1.3A, comparison of lanes 4 and 2), *CycA* expression was similar to that detected in wild-type cells when both strains were grown microoxically. However, under anoxic denitrifying conditions, the levels of *CycA* in the *nnrR* mutant were

Results

about two-to-three fold lower to that of the WT (Figure 5.1.3A, lanes 6, and 8). Next, given the dependency of *nnrR* expression on the transcription factor FixK₂ (Mesa et al., 2003; Mesa et al., 2008), we also analysed the expression of CycA in a *fixK₂* mutant cultured under microoxic and anoxic denitrifying conditions. Interestingly, a similar expression profile of CycA as observed in the *nnrR* mutant, was detected in the *fixK₂* mutant (Figure 5.1.3A, lanes 3, and 7) which points out the requirement of both FixK₂ and NnrR for the maximal expression of CycA. This mutual dependence of CycA expression on these two CRP/FNR transcription factors was also confirmed at transcriptional levels by monitoring *cycA* expression by qRT-PCR (Figure 5.1.3B)

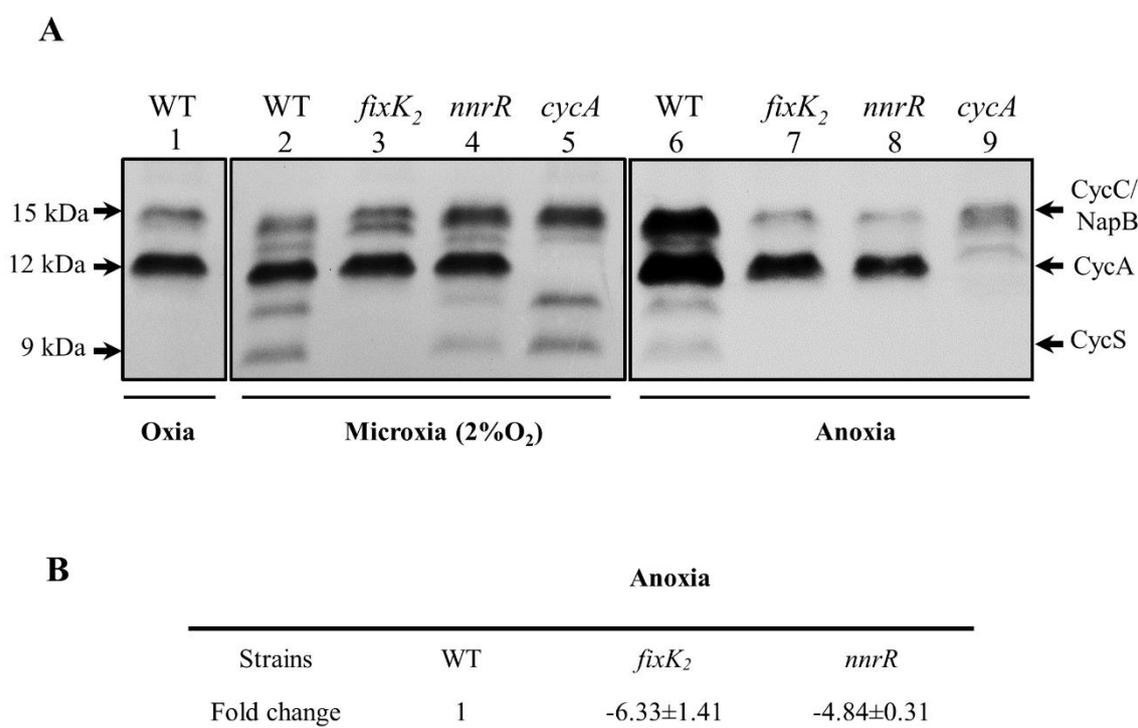


Figure 5.1.3. The regulatory proteins FixK₂ and NnrR are involved in the control of *cycA* expression. **(A)** Profile of heme-stained soluble proteins from *B. diazoefficiens* WT, and *fixK₂*, *nnrR*, *cycA* mutants. Cells were cultivated during 24 h in YEM medium in the absence (oxic, and microoxic [2% O₂] conditions) or in the presence (anoxic denitrifying conditions) of 10 mM of KNO₃. 50 µg of soluble proteins were loaded per lane. Heme stained *c*-type cytochromes identified previously are specified at the right margin and their predicted molecular mass at the left. Each panel corresponds to different sections of the same gel (soluble fractions isolated from oxic and microoxically grown cells; or a different gel (soluble fractions of cells grown in anoxic denitrifying conditions. **(B)** qRT-PCR analyses of *cycA* in the WT, and *fixK₂* and *nnrR* mutants. Six parallel reactions were performed with cDNA retro-transcribed from RNA isolated from cells grown in anoxic denitrifying conditions (at least two independent biological replicates per strain). Fold change (FC) values refer to the relative expression in the *fixK₂* and *nnrR* mutants compared to the WT. anoxia, anoxic denitrifying conditions.

which was about 6- and 5-fold lower in the *fixK₂* and *nnrR* mutants, respectively, compared to the WT.

5.1.5. FixK₂ directly controls *cycA*, *nnrR* and *nnrS* genes transcription

Multiple-round IVT activation assays were performed to investigate whether *cycA* is directly controlled by the transcriptional regulator FixK₂. To achieve this goal, we monitored transcription from the *cycA* promoter, cloned in plasmid pMB1401, by RNA polymerase purified from *B. diazoefficiens* (Torres et al., 2017) in the presence or in the absence of recombinant FixK₂ protein. Without FixK₂, *B. diazoefficiens* RNAP did not transcribe from *cycA* promoter (Figure 5.1.4, lane 1) whereas it produced a vector-encoded transcript of 107 nucleotides that it used as an internal control. In the presence of two different concentrations of FixK₂ (1.25 and 2.5 μM dimer), *B. diazoefficiens* RNAP transcribed *cycA* promoter efficiently, producing an expectable transcript of 269 nucleotides, with almost no change in the intensity of the 107-nucleotide control (Figure 5.1.4, lanes 2 and 3).

Previous work has shown that the activation of a *nnrR'*-*lacZ* fusion under anoxic denitrifying conditions depends on FixK₂ (Mesa et al., 2003). In order to elucidate whether FixK₂ exerts a direct or indirect control on *nnrR*, we also performed IVT analyses from the *nnrR* promoter. *nnrR* and its divergent oriented gene *nnrS* share a single predicted FixK₂ box located at their intergenic promoter region which was cloned into the template plasmid pRJ8870 (Mesa et al., 2008), which carries two transcriptional terminators. As shown in Figure 5.1.4 (lane 5), *B. diazoefficiens* RNAP transcribed the *nnrS* and *nnrR* promoters only in the presence of purified FixK₂ protein producing two expectable transcripts of 275 nucleotides (corresponding to *nnrR*), and 199 nucleotides (corresponding to *nnrS*). Altogether, these results allowed us to identify three new direct targets for FixK₂: *cycA*, *nnrR* and *nnrS*.

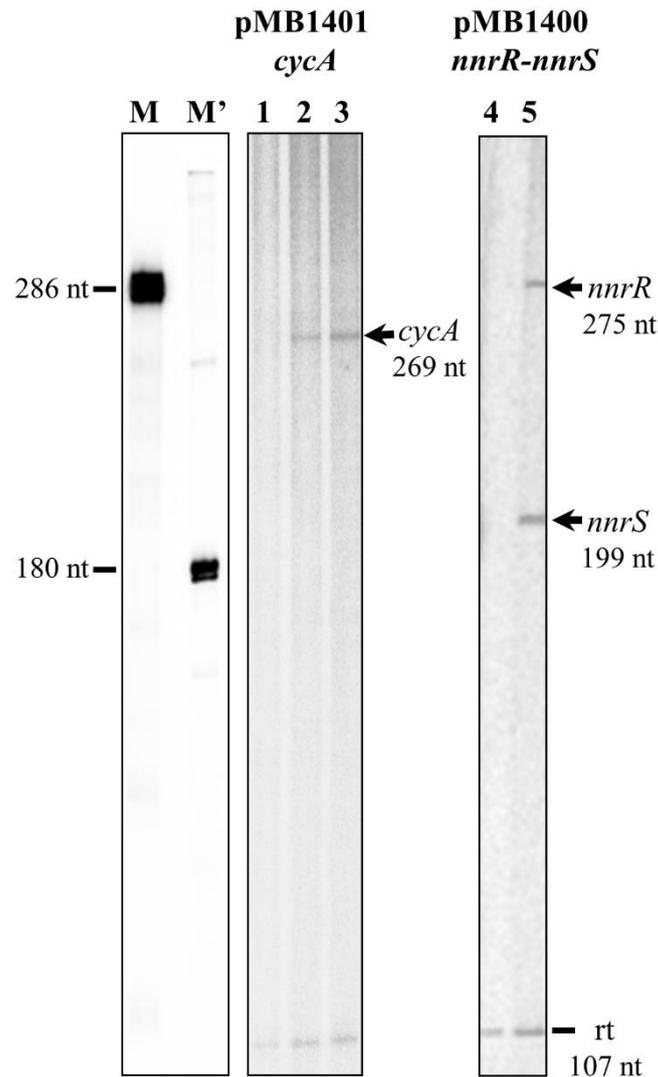


Figure 5.1.4. IVT activation of *nnrR*, *nnrS* and *cycA* genes by *FixK*₂. Plasmids pMB1400 and pMB1401 were used for a multiple-round IVT activation assay with purified *FixK*₂ protein (no protein, lanes 1, and 4; 1.25 μM, lane 2, and 5; 2.5 μM, lane 3) and RNA polymerase of *B. diazoefficiens*. RNA size markers (M, M') were produced as described earlier (Mesa et al., 2005). The positions of the *FixK*₂-dependent transcripts are marked with arrows. A vector-encoded transcript of 107 nucleotides (reference transcript) which serves as internal control appears in all lanes. Transcription products generated from each promoter were run on different gels. nt, nucleotides. rt, reference transcript.

5.1.6. *CycA* is involved in nitrous oxide reductase activity

In order to investigate whether *CycA* could act as a potential electron donor to the nitrous oxide reductase (*N*₂OR) enzyme, we determined *N*₂OR activity in cells of the WT and *cycA* mutant grown under microoxic conditions (2% O₂) in YEM medium supplemented with nitrate. Cells were cultured for 24 h, harvested by centrifugation and subsequently incubated microoxically in a reaction mixture supplemented or

not with succinate as physiological electron donor. The ability of the cells to consume N_2O was measured at 2 and 4 h after cell inoculation. As shown in Figure 5.5.5A, despite of the fact that the presence of succinate in the medium increased about 1.5-fold N_2OR activity in both WT and *cycA* mutant, values of N_2O activity in *cycA* cells were about 65% lower than those observed in wild-type cells. As expected, almost no N_2OR activity was detected in cells of a *nosZ* mutant (Figure 5.1.5A).

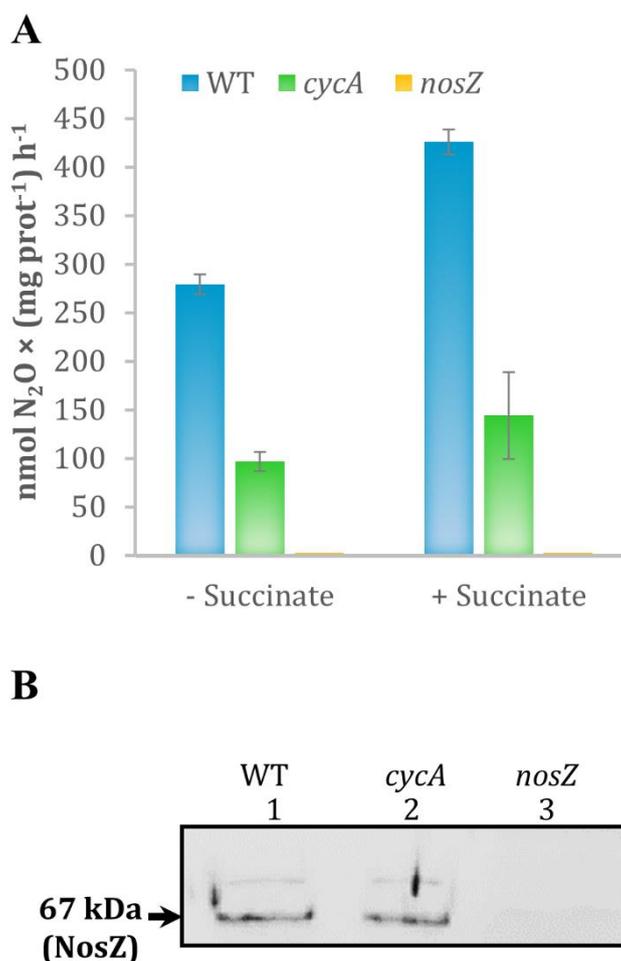


Figure 5.1.5. CycA is involved in nitrous oxide reductase activity. (A) N_2OR activity determined in the WT and *cycA* mutant in the absence or in the presence of succinate as physiological electron donor. Activity is expressed as $nmol N_2O$ consumed per $(mg\ prot^{-1}) h^{-1}$. Shown are means with standard errors of the three measurements of one representative experiment from at least two independent biological replicates. **(B)** Immunodetection of NosZ protein in the soluble fraction of the WT and *cycA* mutant. 20 μg of the soluble fraction of each strain were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-NosZ antibody from *P. denitrificans* (for a detailed description see 4.3.7). The size of the predicted molecular mass of the mature periplasmic NosZ protein (67 kDa) is indicated on the left side. In both series of experiments (panels A and B), cells were grown microaerobically (2% O_2) for 24 h in YEM medium supplemented with nitrate. A *nosZ* mutant was included as negative control.

Results

We also analysed the expression of *nosR*, the first gene of the *nosRZDFYLX* operon, by qRT-PCR as well as the steady-state levels of NosZ, the structural subunit of N₂OR in the WT and the *cycA* mutant. qRT-PCR analyses showed that *nosR* expression was not significantly affected in the *cycA* mutant (FC of -2.9) compared to wild-type cells, both cultivated under microoxic conditions with nitrate. Western blot analysis of NosZ in the soluble fraction of the *cycA* mutant and wild-type cells using an antibody against purified *P. denitrificans* NosZ (Felgate et al., 2012) showed that a band of about 67 kDa corresponding to the predicted molecular mass of the mature periplasmic NosZ protein, was detected with a similar intensity in the soluble fraction of both strains (Figure 5.1.5B, lanes 1, and 2). This band was absent in the soluble fraction extracted from *B. diazoefficiens nosZ* mutant cells which confirmed that corresponds to NosZ (Figure 5.1.5B, lane 3).

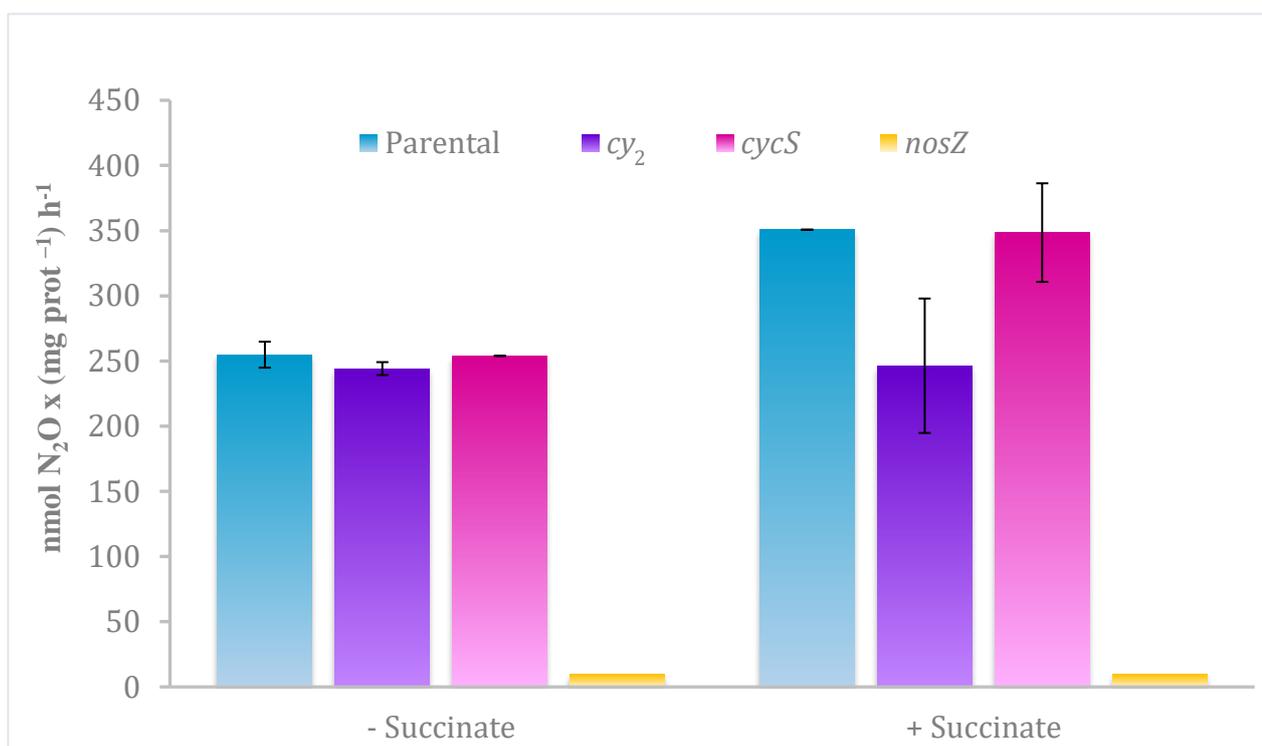


Figure 5.1.6. Nitrous oxide reductase (N₂OR) activity in the absence and in the presence of succinate as electron donor determined in the WT and *cy₂*, and *cycS* mutants. Activity is expressed in nmol N₂O consumed per (mg prot⁻¹) h⁻¹. Cells were grown microoxically (2% O₂) for 24 h in YEM medium supplemented with nitrate. A *nosZ* mutant was included as negative control. Shown are means with standard errors of a representative experiment assayed in triplicates.

Chapter 2

FixK₂ is the main transcriptional activator of *Bradyrhizobium diazoefficiens* nosRZDFYLX genes in response to low oxygen

María J Torres, Emilio Bueno, **Andrea Jiménez-Leiva**, Juan J Cabrera, Eulogio J
Bedmar, Socorro Mesa y María J Delgado

Versión modificada del artículo publicado en *Frontiers in Microbiology* el 30
de agosto de 2017. Doi: 10.3389/fmicb.2017.01621

5.2. Chapter 2: FixK₂ is the main transcriptional activator of *Bradyrhizobium diazoefficiens* *nosRZDFYLX* genes in response to low oxygen

5.2.1. Abstract

The powerful greenhouse gas, nitrous oxide (N₂O) has a strong potential to drive climate change. Soils are the major source of N₂O and microbial nitrification and denitrification the main processes involved. The soybean endosymbiont *B. diazoefficiens* is considered a model to study rhizobial denitrification, which depends on the *napEDABC*, *nirK*, *norCBQD* and *nosRZDFYLX* genes. In this bacterium, the role of the regulatory cascade FixLJ-FixK₂-NnrR in the expression of *napEDABC*, *nirK* and *norCBQD* genes involved in N₂O synthesis has been previously unravelled. However, much remains to be discovered regarding the regulation of the respiratory N₂O reductase (N₂OR), the key enzyme that mitigates N₂O emissions. In this work, we have demonstrated that *nosRZDFYLX* genes constitute an operon which is transcribed from a major promoter located upstream of the *nosR* gene. Low oxygen was shown to be the main inducer of expression of *nosRZDFYLX* genes and N₂OR activity, FixK₂ being the regulatory protein involved in such control. Further, by using an *in vitro* transcription assay with purified FixK₂ protein and *B. diazoefficiens* RNA polymerase we were able to show that the *nosRZDFYLX* genes are direct targets of FixK₂.

5.2.2. Plasmids and bacterial strains construction

Plasmids used in this study are listed in Table 4.1 and 4.2. Primer sequences in this work are compiled in Table 4.3. For construction of transcriptional reporter fusion plasmids, 5' DNA fragments for the *nosR* (558 bp; 132 bp; 128 bp and 75 bp), *nosZ* (1024 bp) and *nosD* (875 pb) promoter regions were amplified using primers' pair a1/PnosR.r, PnosRfull.f/PnosR.r, PnosRhalf.f/PnosR.r, PnosRno.f/PnosR.r, PnosZ.f/PnosZ.r and c1/c2, respectively (Table 4.3). The PCR products were then individually ligated into the pGEM[®]-T vector (Promega), digested with EcoRI or EcoRI-PstI and cloned into the *lacZ* fusion suicide vector pSUP3535 (Mesa *et al.*, 2003), to yield plasmids pBG0301, pBG0304, pBG0305, pBG0306, pBG0302 and pBG0303, respectively (see Table 4.2 for details). The correct orientation of the inserts was verified by sequencing. Plasmids pBG0301, pBG0302, pBG0303,

pBG0304, pBG0305 and pBG0306 were integrated by homologous recombination into the chromosome of wild type *B. diazoefficiens* 110*spc4*, yielding strains 110*spc4*-BG0301, 110*spc4*-BG0302, 110*spc4*-BG0303, 110*spc4*-BG0304, 110*spc4*-BG0305, 110*spc4*-BG0306. Plasmid pBG0301 was also integrated into the chromosome of *napA* (GRAP1), *nirK* (GRK308), *fixK₂* (9043) and *nnrR* (8678) mutants, yielding strains GRPA1-BG0301, GRK308-BG0301, 9043-BG0301 and 8678-BG0301, respectively (Table 4.1). Correct recombination into the chromosome of the corresponding recipient strain was checked by PCR analyses.

The plasmid used as transcription template was based on the plasmid pRJ9519 which contains a *B. diazoefficiens* *rrn* transcriptional terminator (Beck *et al.*, 1997). The *nosRZDFYLX* promoter was PCR-amplified with *nosR_For_Transc* and *nosR_Rev_Transc* primers, subsequently restricted with *Xba*I and *Eco*RI, and finally cloned as a 486-bp fragment into pRJ9519, yielding plasmid pDB4020. The correct nucleotide sequence was confirmed by sequencing.

5.2.3. Transcriptional organization of the *B. diazoefficiens* *nosRZDFYLX* genes

Analysis of the *nosRZDFYLX* sequence did not reveal any predicted transcriptional termination signals (<http://pallab.serc.iisc.ernet.in/gester/dbsearch.php>) which is an indication that they might be transcribed as an operon. Overlapping coding regions between *nosR* and *nosZ*, as well as between *nosD*, *F*, *Y*, and *L* stop and start codons, suggest translational couplings between *nosRZ* and *nosDFYL*. However, unlike these translational couplings, there is a short intergenic region of 14 nucleotides between *nosZ* and *nosD* and 11 nucleotides between *nosL* and *nosX*.

In order to investigate the transcriptional architecture of *nosRZDFYLX* genes, end-point RT-PCR was performed to detect intergenic regions between each pair of correlative genes. To ensure that the amplified RT-PCR product was from the template mRNA, each RT-PCR reaction had a negative control (without reverse transcriptase) and a positive control (genomic DNA). First, total RNA was isolated from *B. diazoefficiens* wild-type cells cultured with initial 0.5% O₂ concentration in the presence of NO₃⁻ and subsequently reverse transcribed to cDNA. As shown in Figure 5.2.1A, specific cDNA products were obtained for intergenic regions designed as b-to-g, but not from those labelled as “a” and “h” corresponding to flanking

regions of the *nosRZDFYLX* genes. These findings reveal that *B. diazoefficiens* *nosRZDFYLX* genes constitute a transcriptional unit, although we cannot discard the presence of additional internal promoters.

To test any potential transcription from the DNA regions upstream of the *nosR*, *nosZ* and *nosD* genes, we determined β -Galactosidase activity of chromosomally integrated transcriptional fusions between the DNA regions preceding the annotated *nosR*, *nosZ*, *nosD* genes and the reporter gene *lacZ* (Figure 5.2.1B). After growing *B. diazoefficiens* cells under an initial O₂ concentration of 0.5% O₂ in the presence of NO₃⁻, the highest transcriptional expression was driven from the *nosR-lacZ* fusion compared to the *nosZ-lacZ* and *nosD-lacZ* fusions (Figure 5.2.1B). These results strongly suggest that transcription of *nosRZDFYLX* mainly depends on a promoter present in the DNA region upstream of *nosR*. However, although β -galactosidase activity from the *nosZ-lacZ* fusion was 6-fold lower to that observed from the *nosR-lacZ* fusion, we cannot exclude the possibility that another internal promoter upstream of *nosZ* might exist.

In order to map transcription initiation within the *nosR* promoter region, we identified their transcriptional start sites (TSS) by using 5'-RACE. As shown in Figure 2A, we identify two TSS (TSS₁ and TSS₂) that initiate at a G and T, 84 and 57 bp upstream of the putative translational start codon, respectively. Analysis of the 5' region of *nosR* revealed the presence of a purine-rich Shine-Dalgarno-like sequence (GAGG) four bases in front of the *nosR* putative translational start codon. Exhaustive inspection of the *nosR* promoter region failed to identify any putative conserved -35/-10- or -24/-12-type elements associated to σ^{70} -dependent or σ^{54} -dependent promoters. However, we noticed the presence of an imperfect palindromic sequence (TTGATCCAGCGCAA) positioned at 40.5 and 67.5 bp from TSS₁ and TSS₂, respectively (Figure 5.2.2A). This sequence resembles reasonably well the consensus sequence of the binding site for FixK-type proteins, 5'-TTGA-N₆-TCAA-3' (Fischer, 1994, Dufour *et al.*, 2010) and specifically the consensus FixK₂ binding site (TTG(A/C)-N₆-(T/G)CAA) recently reported by Bonnet and co-workers (2013) based on the solved FixK₂-DNA complex structure.

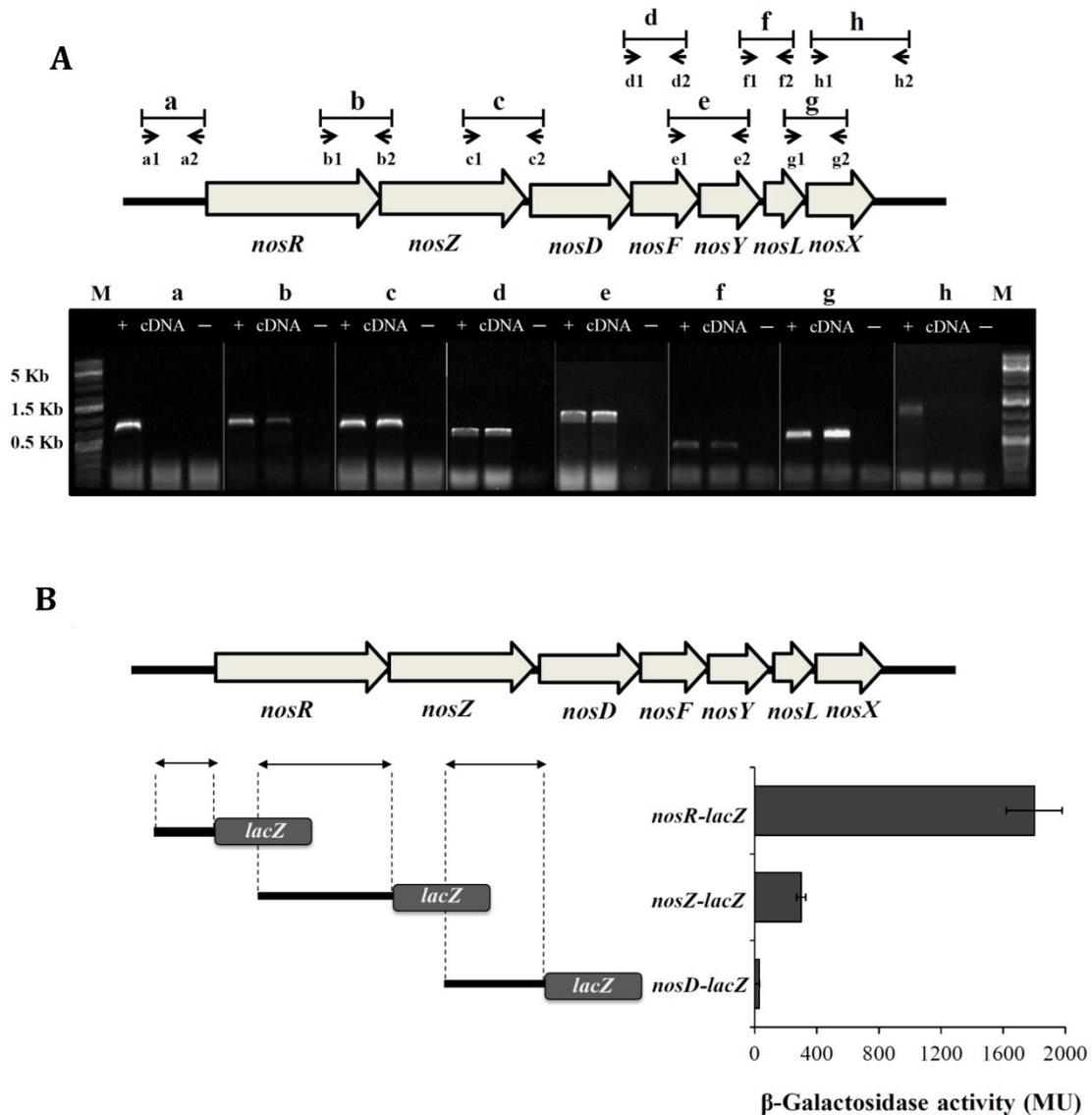


Figure 5.2.1. Transcriptional organization of the *B. diazoefficiens* nosRZDFYLX genes. A. Putative intergenic regions probed by RT-PCR are labelled as “b-to-g” and the small arrows below depict positions and orientation of the PCR primers used for each intergenic region. Combinations of primers a1/a2 and h1/h2 were used to amplify “a” and “h” flanking regions. Primer sequences are shown in Table 4.3. RT-PCR products of each primers’ pair combination were loaded on an agarose gel. Total RNA served as the template for cDNA synthesis by using gene specific primers that hybridize in the complementary sequence of *nosD* and *nosX* genes. PCR amplifications using genomic DNA as template (+) or without reverse transcriptase (-) served as positive and negative controls, respectively. The sizes of the marker (M) bands are labelled on the left side. B. β -galactosidase activity from the DNA regions upstream of *nosR*, *nosZ* and *nosD* genes fused to the *lacZ* reporter gene (on the right). On the left, the DNA regions fused to *lacZ* are depicted by arrows. In A and B, *B. diazoefficiens* wild-type cells were grown for 24 hours under low oxygen conditions (initial 0.5% O₂) with 10 mM KNO₃. Data expressed as Miller units (MU) represent mean values and error bars from triplicate samples from at least two independent cultures.

In order to examine the importance of the FixK₂-like box identified within the *nosR* promoter region in its transcription, we studied the transcriptional expression derived from a battery of *nosR-lacZ* fusions harbouring the full or half FixK₂-like box, or a deletion of this box (plasmids pBG0304, pBG0305, and pBG0306, respectively) (Figure 5.2.2B, Table 5.2.1). These plasmids were integrated into *B. diazoefficiens* wild type and β -galactosidase activity was measured in cells cultured under initial 0.5 % O₂ with NO₃⁻. In contrast to the significant induction of the *nosR-lacZ* transcriptional fusion containing the full FixK₂-like site, expression of *nosR-lacZ* constructs carrying half or deleted FixK₂-like site was basal, which showed the importance of the presence of this FixK₂-like binding site in the induction of *nosR* (Figure 5.2.2B).

5.2.4. Low oxygen is the main signal which induces expression of the *nosRZDFYLX* operon

To address the effect of low oxygen and NO_x in the expression of the *nosRZDFYLX* operon, we analyzed β -galactosidase activity of the *nosR-lacZ* transcriptional fusion in wild-type cells cultured oxically or under initial 0.5% O₂, both for 24 h, and later exposed to different NO_x (NO₃⁻, NO₂⁻, NO or N₂O) for additional 5 h-period. As shown in Figure 3A, β -galactosidase activity values were basal in cells incubated under oxidic conditions. Similar basal levels were observed under oxidic conditions in the presence of NO₃⁻ (data not shown). However, when cells were cultured under 0.5% O₂, expression of the *nosR-lacZ* fusion significantly increased (about 4 fold) as compared to oxidic conditions (Figure 5.2.3A). The presence of NO₃⁻, but not of NO₂⁻, NO or N₂O, slightly increased *nosR-lacZ* expression (about 1.5 fold) compared to that observed in cells incubated microoxically in the absence of any NO_x (Figure 5.2.3A).

Results

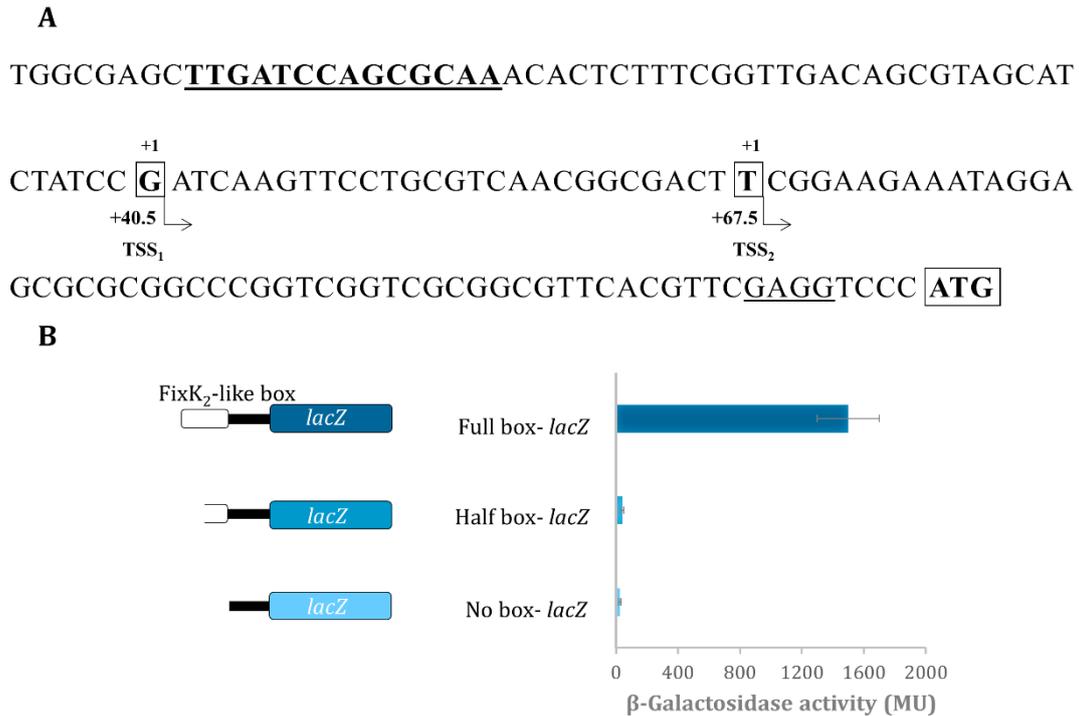
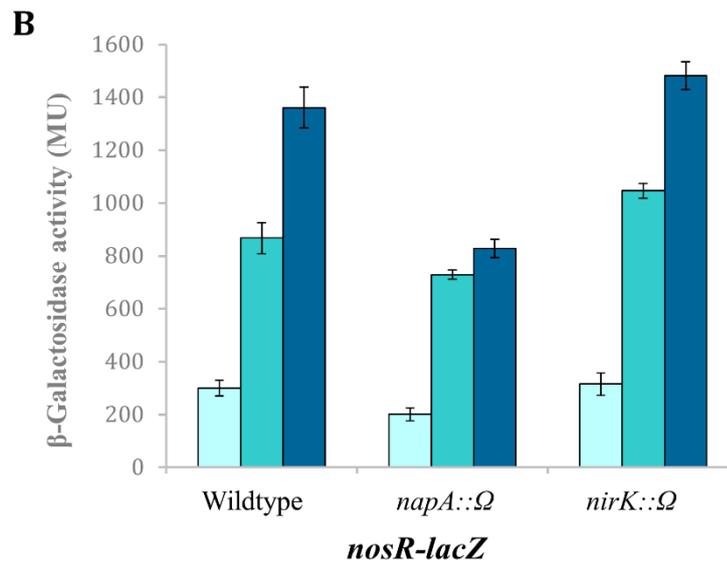
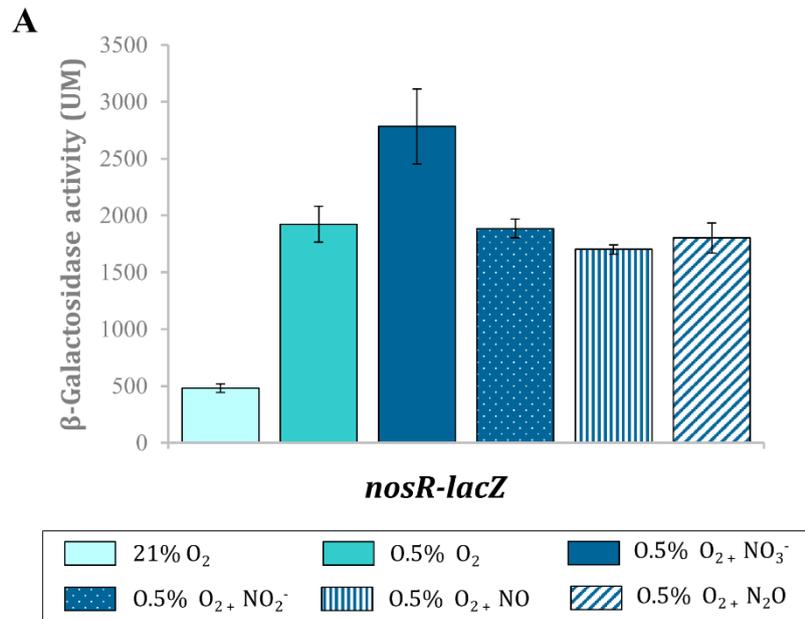


Figure 5.2.2. Structure of the *B. diazoefficiens nosR* promoter. A. Sequence and schematic representation of the *nosR* promoter region. Nucleotides corresponding to the transcription start sites (TSS) located at +40.5 and +67.5 bp from the axis of symmetry of the putative FixK₂-like box (bold and underlined) identified by RACE are shown in bold, marked with “+1” above and highlighted with an open black box. The annotated *nosR* translation start codon (ATG; <http://kazusa.or.jp/rhizobase>) is shown in bold with an open black box. A putative ribosome binding site of *nosR* is underlined. **B.** β-Galactosidase activity from *nosR-lacZ* fusions containing different lengths of the FixK₂-like box is indicated on the left side of the figure. Cells were cultured for 24 hours under low oxygen conditions (0.5% O₂) with 10 mM KNO₃. Data expressed as Miller units (MU) represent mean values and error bars from triplicate samples from at least two independent cultures.

Next, we were interested to confirm that the lack of NO₃⁻ reduction products does not affect *nosR-lacZ* expression. Therefore, β-galactosidase activity from the *nosR-lacZ* fusion was individually analyzed in *napA* or *nirK* mutant strains which are unable to reduce NO₃⁻ or NO₂⁻, respectively (Velasco *et al.*, 2001, Delgado *et al.*, 2003). Again, a slight induction of the *nosR-lacZ* fusion in the wild-type cells cultured under 0.5 % O₂ in the presence of NO₃⁻ was observed (Figure 5.2.3B), however no change was detected in the *napA* mutant cultured under the same conditions, suggesting a requirement of NO₃⁻ reduction on *nosR-lacZ* expression. By contrary, induction by NO₃⁻ of the *nosR-lacZ* fusion was retained in the *nirK* mutant indicating that NO₂⁻ reduction products (NO or N₂O) are not required for activating the expression of *nosRZDFYLX* genes. These results were validated by qRT-PCR analyses

(Figure 5.2.3C). Similarly as we observed by using the *nosR-lacZ* fusion, *nosR* expression was reduced in the *napA* mutant (3.18 fold) compared to wild-type cells, while it was not significantly affected in the *nirK* mutant (1.69 fold), all cultured in the presence of NO_3^- . However, we cannot conclude that the lack of NO_3^- -mediated induction of *nos* genes observed in the *napA* mutant (Figure 5.2.3B and 5.2.3C) is due to the absence of NO_2^- , since the addition of NO_2^- to the medium did not increase *nosR-lacZ* expression (Figure 5.2.3A). Taken together, results from Figures 5.2.3A-C suggest that microoxia is the main signal that induces expression of *B. diazoefficiens* *nosRZDFYLX* genes.



C

		Wildtype	<i>napA::\Omega</i>	<i>nirK::\Omega</i>
Fold Change	0.5% O ₂ + NO ₃ ⁻	1	-3.18 ± 0.39	-1.69 ± 0.21

Figure 5.2.3. Low-oxygen is the main inducer of *nosRZDFYLX* expression. **A.** β -Galactosidase activity derived from a *nosR-lacZ* fusion in *B. diazoefficiens* cells grown oxically or under 0.5 % O₂ for 24 h. Then, cells were incubated for another 5 h with or without 10 mM KNO₃, 500 μ M NaNO₂, 50 μ M NO, and 30 mM N₂O. **B.** β -Galactosidase activity from the *nosR-lacZ* fusion in the *B. diazoefficiens* wild type, and mutant strains *napA* and *nirK*. Cells were grown oxically (white bars) or under 0.5 % O₂ in the absence (grey bars) or in the presence of 10 mM KNO₃ (black bars) during 24 h. **C.** Expression of *nosR* measured by qRT-PCR. After RNA isolation from cells grown under 0.5 % O₂ in the presence of 10 mM KNO₃, qRT-PCR reactions were performed with cDNA synthesized from three independent RNA samples assayed in three parallel reactions. Fold-change values refer to differences of expression in the *napA* and *nirK* mutants relative to the wild type. In A and B data expressed as Miller units (MU) are means with standard error bars from at least two independent cultures, assayed in triplicate.

5.2.5. Selective regulation of *nosRZDFYLX* genes by FixK₂ but not by NnrR

In *B. diazoefficiens*, sensing and transduction of the decrease in O₂ concentration are mediated by two interlinked O₂-responsive regulatory cascades, the FixLJ-FixK₂-NnrR and the RegSR-NifA (Sciotti *et al.*, 2003). A mild decrease in the O₂ concentration in the gas phase ($\leq 5\%$) is sufficient to activate expression of FixLJ-FixK₂-dependent targets, however a ten-fold lower O₂ concentration ($\leq 0.5\%$) is necessary for NifA-mediated activation. In order to investigate how FixK₂ and NnrR control the microoxic expression of *nosRZDFYLX* genes, we analyzed β -Galactosidase activity from the *nosR-lacZ* fusion in the wild type (WT) and $\Delta fixK_2$ and $\Delta nnrR$ strains, incubated for 24 h oxically, and microoxically (2% O₂) in the absence or the presence of 10 mM of KNO₃. In these experiments, 2% O₂ concentration was chosen as a middle concentration between 5% (needed for FixLJ-FixK₂ cascade activation) and 0.5% (required for the activation of the low O₂-responsive NifA protein), in order to circumvent any possible influence by NifA regulation in our assays.

As observed in Figure 5.2.4A, microoxic induction of *nosR-lacZ* was completely abolished in the absence of a functional *fixK₂* gene, however, it was retained in the $\Delta nnrR$ strain, suggesting that microoxic expression of *nosRZDFYLX* genes depends on FixK₂ but not on NnrR. When cells were cultured microoxically in the presence of NO₃⁻, expression of the *nosR-lacZ* fusion was significantly reduced in the *fixK₂* mutant (about 3-fold) compared to that observed in the wild-type cells (Figure 5.2.4A). However, β -galactosidase activity of the *nosR-lacZ* fusion was slightly reduced in the *nnrR* mutant (about 1.75-fold) compared to the wild type (Figure 5.2.4A). This slight reduction of the expression of the *nosR* gene in the *nnrR* mutant is probably due to the toxic effect of NO that is accumulated in *nnrR* cells as previously reported by Bueno and coworkers (2017). To check this hypothesis, a NO scavenger (cPTIO) was added during growth of wild-type and $\Delta nnrR$ cells under microoxic conditions with NO₃⁻. As shown in Figure 4A, while no effect of cPTIO was observed in wild-type cells, *nosR-lacZ* expression in $\Delta nnrR$ cells increased about 40% to that observed in the absence of cPTIO (right panel), which almost corresponds to the expression pattern of the wild type. Thus, this indicates that *nos*

Results

expression could be partially recovered in the $\Delta nnrR$ mutant when NO was sequestered by cPTIO.

The different control of *nosR* expression by FixK₂ or NnrR was also confirmed by qRT-PCR analyses. When cells were cultured microoxically in the absence of NO₃⁻, expression of *nosR* was reduced in the *fixK₂* mutant (3.92 fold) compared to that observed in the wild-type cells (Figure 5.2.4B), however, it was almost not affected in the *nnrR* mutant (Figure 5.2.4B). When NO₃⁻ was added to medium, a significant reduction of *nosR* expression (10.38 fold) was observed in the *fixK₂* mutant but only a slight decrease (2.4 fold) was detected in the *nnrR* mutant, both compared to the wild type cultured in the same conditions (Figure 5.2.4B). Taken together, these results suggest FixK₂ as the transcriptional activator of *nos* genes in response to microoxic conditions.

The differential dependency of *nosRZDFYLX* expression on FixK₂ and NnrR was also confirmed at protein level by immunoblot analyses using antibodies raised against purified *P. denitrificans* NosZ (Felgate *et al.*, 2012). Firstly, we were able to identify NosZ protein in the soluble fraction of *B. diazoefficiens* cells cultured under microoxic conditions (2 % O₂) with NO₃⁻, since a prominent band of about 70 kDa found in the wild type was readily undetectable in the *nosZ* mutant (Figure 5.2.4C, lanes 1 and 2). The size of this band corresponds to the predicted molecular mass of *B. diazoefficiens* NosZ subunit (71.6 kDa; ProtParam tool, <http://web.expasy.org/protparam/>). NosZ was already detected in the wild-type cells cultured microoxically (Figure 5.2.4C, lane 3) but the presence of NO₃⁻ slightly increased NosZ steady-state levels (Figure 5.2.4C, lane 6). This is in line with the observed NO₃⁻-mediated induction of the *nosR-lacZ* fusion (Figures 5.2.3A, 5.2.3B and 5.2.4A). Similarly as the expression pattern observed for the *nosR-lacZ* fusion, NosZ was present in the soluble fraction of $\Delta nnrR$ cells cultured microoxically either in the absence or in the presence of nitrate (Figure 5.2.4C, lanes 5 and 8), although at a slightly lower concentration than in the wild-type cells. As expected, the band of about 70 kDa corresponding to NosZ was absent in the soluble fractions of the $\Delta fixK_2$, independently of the presence or absence of NO₃⁻ in the incubation medium (Figure 5.2.4C, lanes 4 and 7).

Finally, we determined N₂O reductase (N₂OR) activity in *B. diazoefficiens* wild type and *fixK2* and *nnrR* mutant strains as the capacity to reduce a defined initial N₂O concentration. As shown in Figure 4D, values of N₂OR activity in wild-type cells correlated with NosZ steady-state levels in *B. diazoefficiens* cells (Figure 5.2.4C), where a slight induction (about 1.6-fold) of activity was observed in the wild-type cells in the presence of NO₃⁻ (Figure 5.2.4D) compared to that observed in exclusively microoxic conditions. In line with the expression pattern of the *nosR-lacZ* fusion (Figure 5.2.4A), *nosR* expression (Figure 5.2.4B) and NosZ detection (Figure 5.2.4C, lanes 4 and 7), N₂OR activity was severely impaired in the Δ *fixK2* strain cultivated microoxically independently of the presence of NO₃⁻ (Figure 5.2.4D). Under microoxic conditions, cells of the Δ *nnrR* strain showed a milder decrease of N₂OR activity (about 1.75 fold) compared to that observed in wild-type cells (Figure 5.2.4D), which was significantly diminished further (about 10-fold) in the presence of NO₃⁻ (Figure 5.2.4D). As we have mentioned above, this strong decrease is probably due to the higher NO accumulation capacity of Δ *nnrR* cells grown microoxically with nitrate compared to wild-type cells grown under the same conditions (Bueno *et al.*, 2017). In fact, when cPTIO was added during growth, Δ *nnrR* cells restored its ability to reduce N₂O reaching wild-type N₂OR activity values (Figure 5.2.4D). These data discard the involvement of NnrR as direct regulator of *nos* expression and suggest that the incapacity of Δ *nnrR* to reduce N₂O under microoxic conditions with NO₃⁻ is probably due to the accumulation of NO. Taken together, these results pointed out that FixK₂ is the key transcriptional regulator involved in *nosRZDFYLYX* expression.

Results

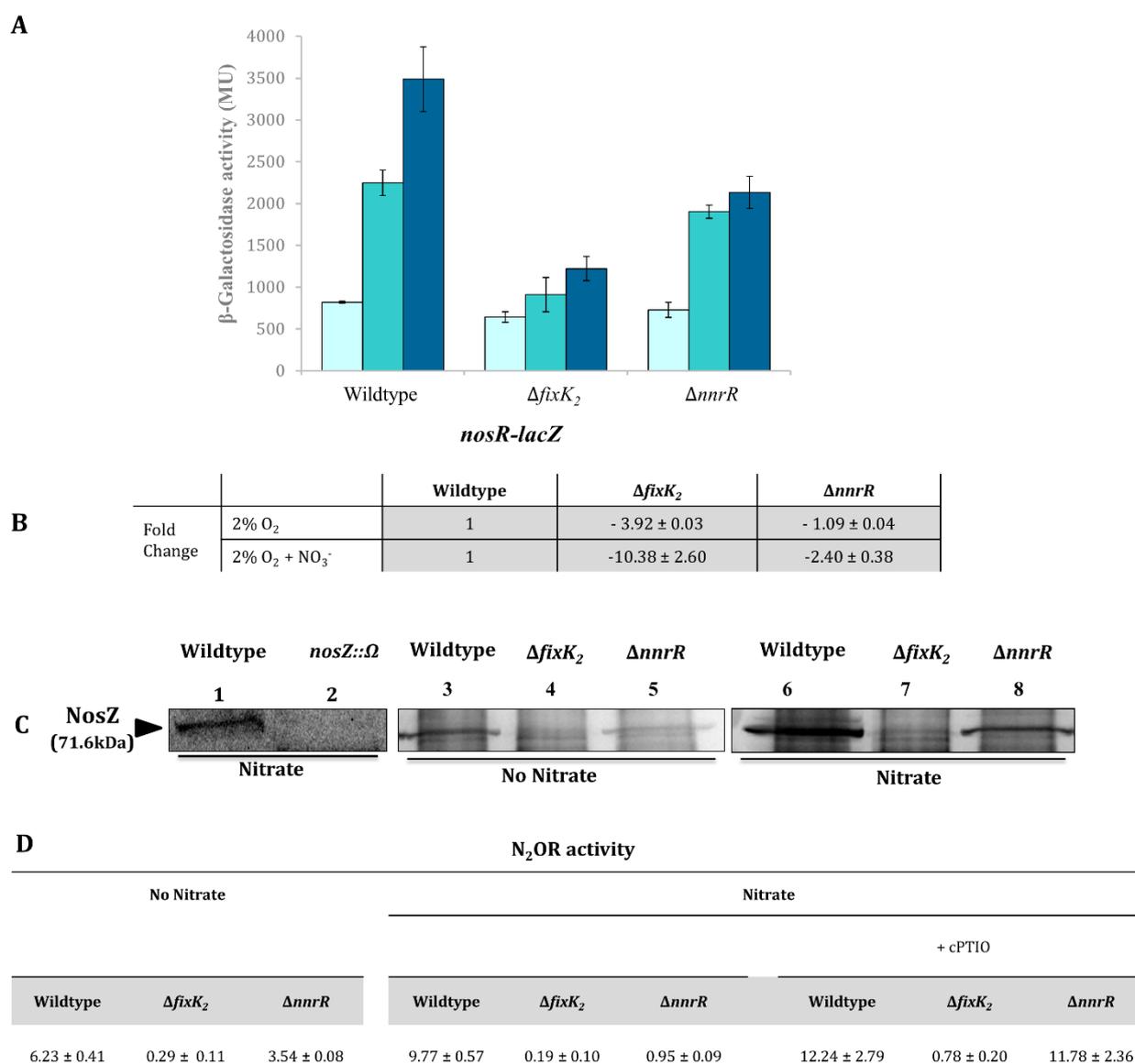


Figure 5.2.4. Control of *nosRZDFYLX* expression by the regulatory proteins FixK₂ and NnrR. A. β -Galactosidase activity expressed as Miller units (MU) from the *nosR-lacZ* transcriptional fusion chromosomally integrated in the *B. diazoefficiens* wild-type strain, and $\Delta nnrR$, and $\Delta fixK_2$ strains grown oxically (white bars), under 2 % O₂ in the absence (light grey bars) or in the presence of 10 mM KNO₃ (black bars) for 24 h. In the right panel, 10 μ M of the NO-scavenger cPTIO was added to a series of cultures containing NO₃⁻ (dark grey bars). **B.** Expression of *nosR* by qRT-PCR in the wild type, and $\Delta nnrR$, and $\Delta fixK_2$ strains. qRT-PCR reactions were performed with cDNA synthesised from three independent RNA samples assayed in triplicate. Fold-change values refer to differences of expression in the $\Delta nnrR$, and $\Delta fixK_2$ mutants relative to the wild type. **C.** Western-blotted SDS-PAGE gels of the soluble fraction from the wild type and $\Delta nnrR$, and $\Delta fixK_2$ strains probed with anti-NosZ antibody from *P. denitrificans*. As control, a *B. diazoefficiens nosZ* mutant was used. The size of *B. diazoefficiens* NosZ is labelled on the left side. **D.** Nitrous oxide reductase (N₂OR) activity in the wild-type and $\Delta nnrR$, and $\Delta fixK_2$ strains expressed as nmol N₂O consumed x (mg prot⁻¹) h⁻¹. In panels B, C and D, cells were grown under 2% O₂ in the absence or in the presence of 10 mM KNO₃ during 24 h. 100 μ M of cPTIO was added to some of the cultures containing NO₃⁻ in D. In panels A, B and D, data shown as means with standard errors from at least two independent cultures, assayed in triplicate.

5.2.6. The *nosRZDFYLX* operon is a novel direct target of FixK₂

In order to investigate whether FixK₂ could have a direct role on *nosRZDFYLX* activation, we monitored RNA synthesis by multiple-round IVT. The *nosR* promoter region was cloned into the template plasmid pRJ9519 (Beck *et al.*, 1997), which carries an *rrn* terminator, yielding plasmid pDB4020. In these experiments, purified C183S-FixK₂-His₆ (Bonnet *et al.*, 2013), hereafter referred as FixK₂, and RNA polymerase (RNAP) holoenzyme from *B. diazoefficiens* that was purified in this work (see Material and Methods) were used. In the absence of FixK₂, *B. diazoefficiens* RNAP was unable to transcribe the *nosR* promoter efficiently (Figure 5.2.5, lane 3), whereas it produced a vector-encoded transcript that served as an internal reference. In the presence of FixK₂ (1.25, and 2.5 μM dimer), *B. diazoefficiens* RNAP transcribed the *nosRZDFYLX* promoter producing a single specific transcript of about 299 nucleotides (Figure 5.2.5, lanes 4 and 5, respectively), which probably initiate at Transcriptional Start Site 1 (TSS₁). This suggested that the *nosR* promoter is directly activated by FixK₂ and that transcription from TSS₁ depends on FixK₂, at least, in *in vitro* conditions.

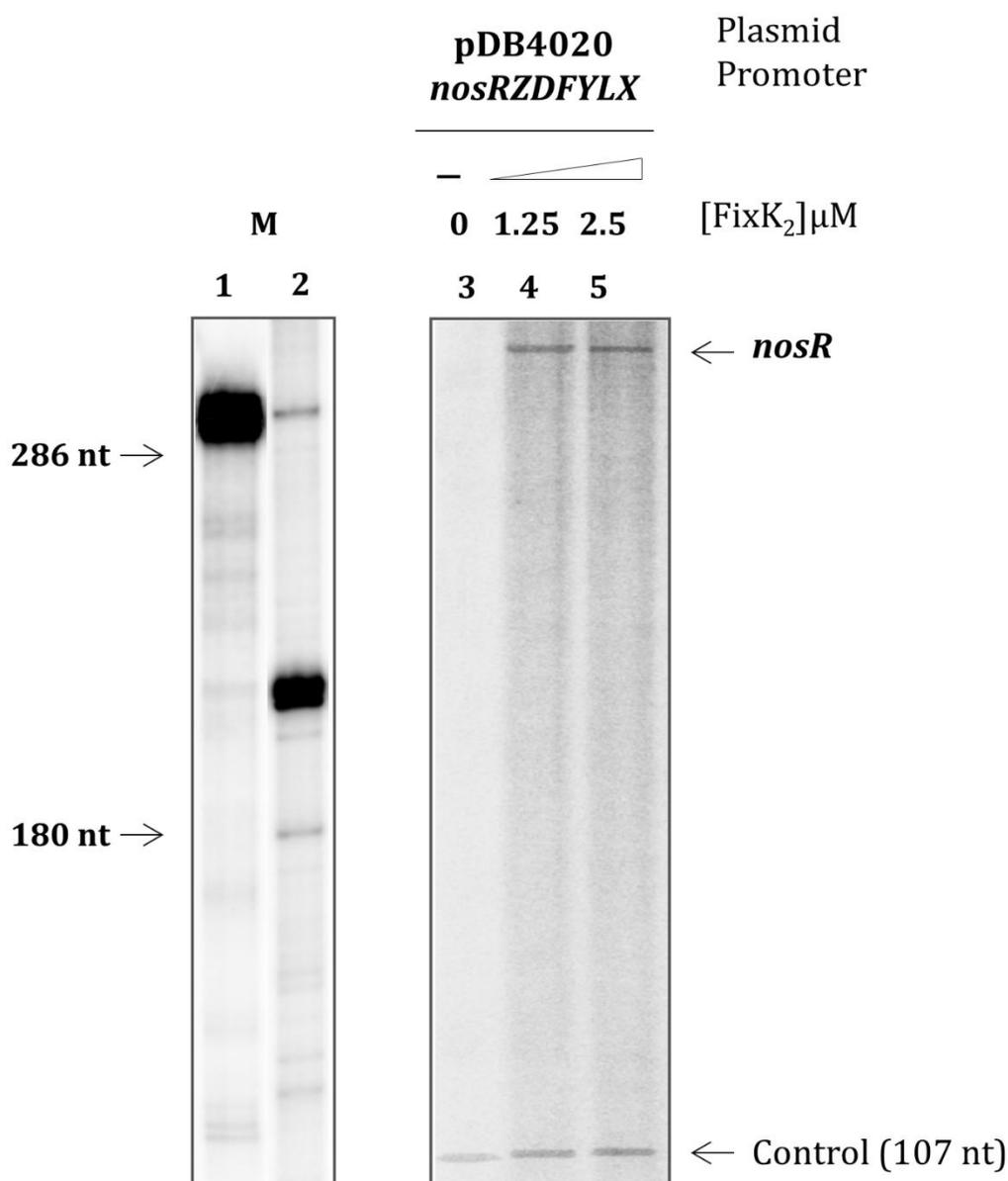


Figure 5.2.5. FixK₂-mediated IVT activation from the *nosRZDFYLX* promoter. pDB4020 plasmid containing the *nosR* promoter cloned upstream of the *rrn* terminator was used for multiple-round IVT assays with different amounts of purified FixK₂ protein and RNAP from *B. diazoefficiens*. FixK₂ concentrations were as follows: no protein, 1.25 μ M and 2.5 μ M (lanes 3-5). Transcripts synthesized *in vitro* in the presence of [α -³²P]UTP were separated on a 6% denaturing polyacrylamide gel and visualized by phosphorimager analysis of the dried gel. RNA size markers (M) loaded in lanes 1 and 2 were produced as described by Mesa and coworkers (2005). The 107-nucleotide transcript present in all lanes originates from a promoter located on the plasmid vector and serves as internal reference. Shown are the results from a transcription experiment that was repeated at least once. Both panels correspond to the same gel. nt, nucleotides

Capítulo 3

**Estudio del mecanismo molecular de la
proteína reguladora NnrR de *Bradyrhizobium
diazoefficiens*: Influencia del hemo en la
detección de NO**

5.3. Capítulo 3. Estudio del mecanismo molecular de la proteína reguladora NnrR de *Bradyrhizobium diazoefficiens*: Influencia del hemo en la detección de NO

5.3.1. Introducción

NnrR es una proteína que es miembro de la familia de factores transcripcionales bacterianos del tipo CRP/FNR (Körner et al., 2003). En particular, pertenece al clado NnrR, que incluye a proteínas que se encargan de modular la expresión de los grupos génicos *nir* y *nor*, con el objeto de mantener las concentraciones de nitrito y NO, por debajo de niveles citotóxicos (Körner et al., 2003 y Mesa et al., 2003). En el caso de *B. diazoefficiens*, NnrR forma parte de la cascada de regulación FixLJ-FixK₂-NnrR, de manera que integra la señal de óxidos de nitrógeno necesaria para la máxima expresión de algunos genes implicados en el proceso de desnitrificación (Mesa et al., 2003; Bueno et al., 2017).

Se ha descrito que las proteínas NnrR de *R. sphaeroides*, NNR de *P. denitrificans*, DNR de *P. aeruginosa*, DnrD de *P. stutzeri* y DnrF de *D. shibae* están implicadas en la activación de los genes *nir* y *nor* en respuesta a NO (revisado en Rodionov et al., 2005; van Spanning, 2011; Torres et al., 2016; Spiro 2017 y Ebert et al., 2017). En particular, DNR de *P. aeruginosa* y DnrF de *D. shibae* son capaces de unirse a NO *in vitro* a través de un cofactor hemo ferroso (Rinaldo et al., 2012 y Ebert et al., 2017). En ese contexto, el NO ha sido propuesto como molécula clave en la regulación de los genes *nor* y *nir* en *B. diazoefficiens* (Bueno et al., 2017).

5.3.2. Caracterización *in silico* de la proteína NnrR

5.3.2.1. Predicción de la estructura secundaria de la proteína NnrR

Para analizar la estructura secundaria de la proteína NnrR se empleó el servidor de proteínas PSIPRED que lleva a cabo su predicción en base a la secuencia de aas de la proteína. Los resultados obtenidos predicen 8 regiones con estructura de α -hélice, 9 zonas con láminas β y 16 giros (Figura 5.3.1). En esta estructura se observa una zona de láminas β , desde el aminoácido 40 hasta el 109 (Figura 5.3.1, cuadro rojo), que podría corresponder al dominio de unión a la ARN polimerasa. También está conservada una hélice central, desde el aminoácido 121 al 165 (Figura 5.3.1, cuadro

Resultados

azul), correspondiente al dominio de dimerización, y en el extremo carboxilo terminal se reconoce una región con un motivo hélice-vuelta-hélice entre los residuos 181 y 204 que sería el dominio de unión a ADN (Figura 5.3.1, cuadro verde).

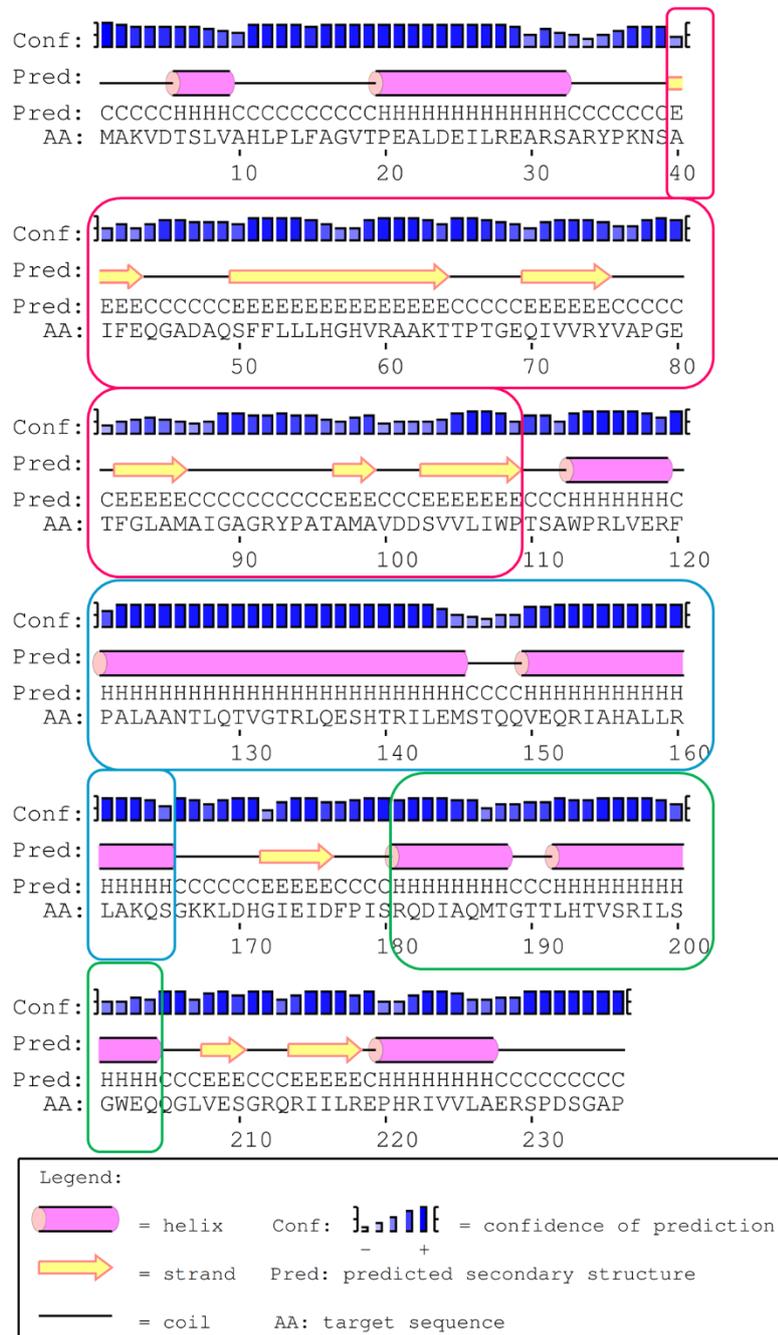


Figura 5.3.1. Secuencia aminoacídica y predicción de estructura secundaria de NnrR. La predicción de estructura fue analizada con el servidor Psiprep (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). Se indica con cuadros los dominios típicos de este tipo de proteínas. Cuadro rojo: Interacción con ARN polimerasa. Cuadro azul: dominio de dimerización. Cuadro verde: Dominio de unión a ADN.

5.3.2.2. Modelo estructural de NnrR

Para llevar a cabo una predicción del posible modelo estructural de NnrR, estructura terciaria y cuaternaria (Figura 5.3.2A), se empleó la herramienta bioinformática SWISS-MODEL, la cual permite obtener diferentes modelos estructurales de la proteína a partir de su secuencia aminoacídica, basándose en estructuras de proteínas homólogas ya resueltas. Uno de los modelos predictivos más adecuados por dicho programa para la proteína NnrR de *B. diazoefficiens* se basa en la estructura de la proteína DNR de *P. aeruginosa* (Giardina et al., 2008), la cual pertenece al clado DNR, similar al de las proteínas de tipo NnrR y con función homóloga a este tipo de proteínas (Mesa et al., 2003; Körner et al., 2003).

El modelo obtenido predice una proteína NnrR homodimérica, constituida por dos monómeros iguales (Figura 5.3.2A), cada uno de ellos con 236 aa y que posee los dominios típicos de los factores transcripcionales de la familia CRP/FNR, al igual de lo observado en la predicción de la estructura secundaria descrita en el apartado anterior. En el extremo carboxilo terminal, un dominio de unión a ADN que posee la estructura de hélice-giro-hélice, una α -hélice de dimerización central, y en el extremo amino terminal un dominio de interacción con la ARN polimerasa formado por láminas β (Figura 5.3.2A). Además, de forma similar a lo observado en la estructura de DNR, en el modelo de NnrR se localiza una cavidad hidrofóbica localizada en la parte amino terminal, en el que encuentran varios residuos de histidina que podrían actuar como ligandos de un posible cofactor. Concretamente, las histidinas 11 y 56 podrían llevar a cabo dicha función, de manera que el cofactor quedaría alojado en el bolsillo hidrofóbico de la proteína (Figura 5.3.2B)

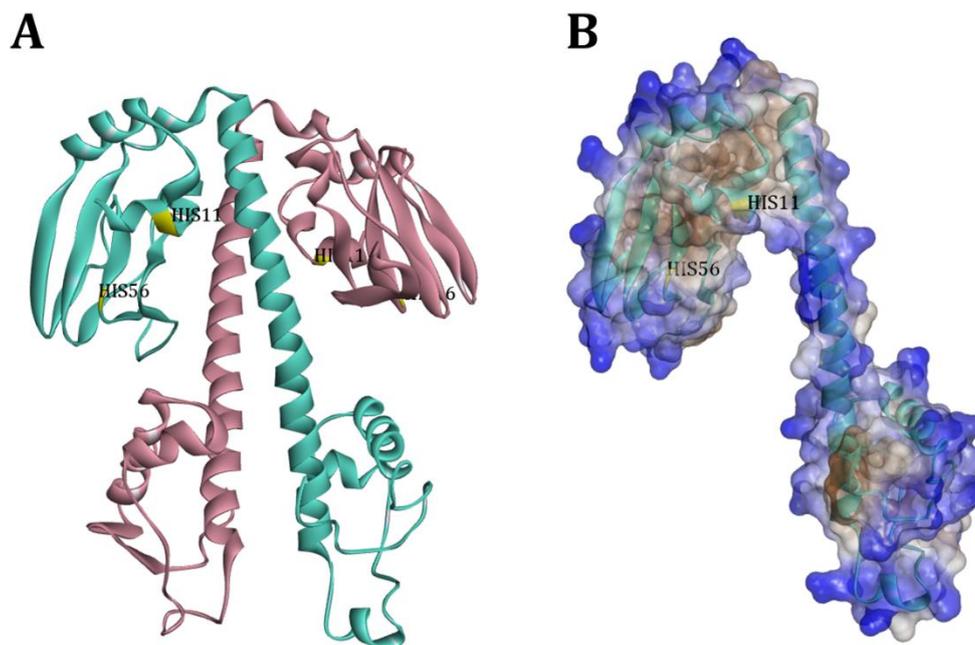


Figura 5.3.2. Predicción bioinformática de la estructura cuaternaria de la proteína NnrR de *B. diazoefficiens*, basada en la estructura resuelta de la proteína DNR de *P. aeruginosa* (Giardina et al., 2008). A. Organización de la estructura terciaria y cuaternaria de NnrR. En amarillo se señalan los residuos de histidina 11 y 56 de cada uno de los monómeros. B. Representación de la hidrofobicidad de la superficie de un monómero de NnrR. En azul se muestran las zonas menos hidrofóbicas, mientras que en marrón se observan las de mayor hidrofobicidad.

5.3.3. Control de la expresión de los genes *norCBQD* por NO y NnrR

5.3.3.1. Efecto del secuestrador de NO, cPTIO, en la expresión de una fusión *norC-lacZ*

El estudio del efecto del secuestrador de NO, cPTIO (2-4-carboxyphenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide), en la expresión de una fusión transcripcional *norC-lacZ* se llevó a cabo en la cepa parental 2499 y en las cepas mutantes *nnrR* y *fixK2*, designadas como 2499R y 2499K2, respectivamente (Tabla 4.1). Todas ellas se incubaron bajo condiciones de microoxia (2%O₂ mantenido) en medio YEM durante 24 h a partir de inducciones a 0,2 de DO₆₀₀ inicial, con o sin 1 mM de cPTIO. El NO (50 μM) se añadió 5 h antes de realizar la medida de expresión, determinada mediante el análisis de la actividad β-galactosidasa de la fusión *norC-lacZ*. Mientras que los niveles de actividad fueron basales en las tres cepas en ausencia de NO, sólo en la cepa parental 2499 se observó una inducción de aproximadamente 10 veces cuando se adicionó NO a los cultivos (Figura 5.3.3). Sin

embargo, en presencia de cPTIO se redujo la expresión de la fusión *norC-lacZ* prácticamente a valores basales en la cepa parental 2499. Estos resultados indican que el NO es la molécula que ejerce la inducción de los genes *norCBQD* de *B. diazoefficiens*, ya que, al eliminar esta molécula mediante la adición de un secuestrador específico de la misma, la expresión de estos genes disminuye (Figura 5.3.3). Como era de esperar, y dado que en las cepas mutantes *fixK₂* y *nnrR* no se observó la inducción por NO, tampoco se detectó el efecto del cPTIO sobre la expresión de la fusión *norC-lacZ* en dichas mutantes (Figura 5.3.3).

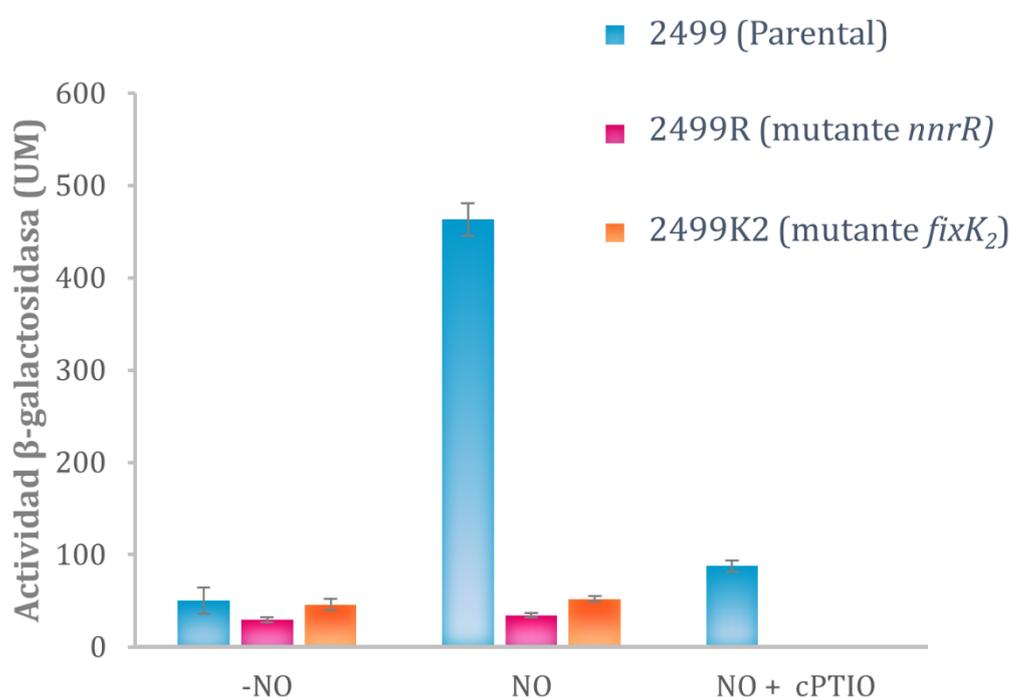


Figura 5.3.3. Actividad β -galactosidasa de la fusión *norC-lacZ* en las cepas de *B. diazoefficiens* parental y mutantes *nnrR* y *fixK₂*. Las células se cultivaron en medio YEM en condiciones de microoxia (2% O₂) durante 24 h con o sin cPTIO (1 mM). 5 h antes de la determinación de actividad en algunos casos se añadió a los cultivos NO (50 μ M). Las barras de error representan la desviación estándar de las medidas de tres réplicas experimentales de un ensayo representativo.

5.3.4. Efecto de la complementación con el gen *nnrR* sobre la expresión de la fusión *norC-lacZ* en las mutantes *nnrR* y *fixK2*

5.3.4.1. Construcción de cepas *fixK2* y *nnrR* complementadas in trans con el gen *nnrR*

La complementación de las cepas mutantes *fixK2* y *nnrR* con el gen *nnrR* se llevó a cabo utilizando dos plásmidos diferentes. En el caso de la cepa mutante *nnrR*, se complementó con el plásmido pRJ8845 (Tabla 4.2), disponible en el grupo, que porta un fragmento de 1474 pb con el gen *nnrR* bajo el control de su propio promotor. Sin embargo, la mutante *fixK2* se complementó con el plásmido pMB1407 (Tabla 4.2 y Figura 5.3.4) construido durante el desarrollo de esta tesis, para la expresión del gen *nnrR* bajo la influencia de un promotor constitutivo, como el promotor del gen *lacZ* presente en el vector pBBR1MCS-2. La razón para construir este plásmido alternativo se basa en el hecho de que FixK2 activa directamente la transcripción de *nnrR* (apartado 5.1.5), y con estos experimentos queríamos analizar la capacidad de la proteína NnrR de activar la expresión de los genes *norCBQD* de forma independiente al control de la proteína FixK2 sobre el gen *nnrR*.

La construcción del plásmido pMB1407 (Figura 5.3.4) se realizó amplificando un fragmento de 770 pb mediante PCR con los oligonucleótidos *nnrR_7_for* y *nnrR_7_rev* (Tabla 4.3), de manera que el fragmento obtenido contiene el gen *nnrR* con sólo 36 nucleótidos de su promotor para mantener el sitio de unión al ribosoma. Tras purificar y cuantificar el fragmento de PCR obtenido, éste se digirió con las endonucleasas *KpnI* y *BamHI*, y se ligó con el vector de clonación pBBR1MCS-2 digerido con las mismas enzimas (Tabla 4.2). De esta manera, el gen *nnrR* se expresa bajo el control del promotor de *lacZ* presente en el vector de clonación. La correcta inserción del fragmento de PCR en el vector, así como la fidelidad de la secuencia amplificada se verificaron secuenciando la construcción con el oligonucleótido *lacZ_rev* (Tabla 4.3).

A continuación, se transfirieron respectivamente los plásmidos pRJ8845 y pMB1407 a las cepas mutantes *nnrR* y *fixK2* por conjugación. La comprobación de la presencia de ambos plásmidos en el genoma de las cepas se realizó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos *ppp375_for* y *ppp375_rev* (Tabla 4.3) para el caso de

la complementación con el plásmido pRJ8845 y los oligonucleótidos M13for y M13rev para el caso del plásmido pMB1407.

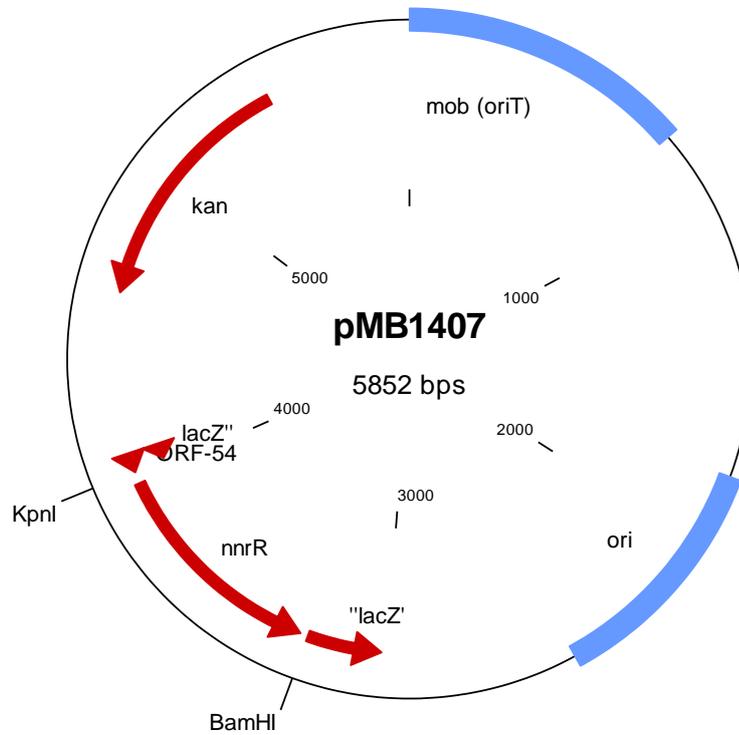


Figura 5.3.4. Mapa del plásmido pMB1407. Este plásmido se empleó para la complementación de la cepa mutante *fixK₂* de *B. diazoefficiens* con el gen *nnrR* bajo el control del promotor constitutivo del gen *lacZ*

5.3.4.2. Expresión de los genes *norCBQD* en las cepas mutantes *fixK₂* y *nnrR* complementadas

Para el estudio de la expresión de los genes *norCBQD* en las mutantes *nnrR* y *fixK₂* complementadas *in trans* con el gen *nnrR* (véase apartado anterior para detalles de las construcciones) se determinó la actividad β -galactosidasa de una fusión *norC-lacZ* en dichas cepas (2499R-*nnrR* y 2499K2-*nnrR*) y como controles la parental (2499) y las mutantes sin complementar (2499R, 2499K2). Las diferentes cepas se cultivaron durante 24 h bajo condiciones de microoxia (2% O₂ mantenido) en medio YEM que se inoculó a una DO₆₀₀ inicial de 0,2. La adición de NO a los cultivos (concentración final de 50 μ M) se realizó 5 h antes de la determinación de actividad β -galactosidasa. Los resultados muestran que, como se observa en la Figura 5.3.3, los valores de expresión de la fusión *norC-lacZ* en las mutantes *nnrR* y *fixK₂* tratadas con NO fue basal. Sin embargo, en las cepas complementadas con el gen *nnrR* se

Resultados

observaron valores incluso superiores a los de la cepa parental 2499 (Figura 5.3.5) cuando las células se trataron con NO. Curiosamente, la inducción basal en ausencia de NO observada en la cepa parental, también se detectó en la cepa *nnrR* complementada. Esto indica que NnrR está implicada en la activación de los genes *norCBQD* de forma independiente a la proteína FixK₂, sobre todo en respuesta a NO.

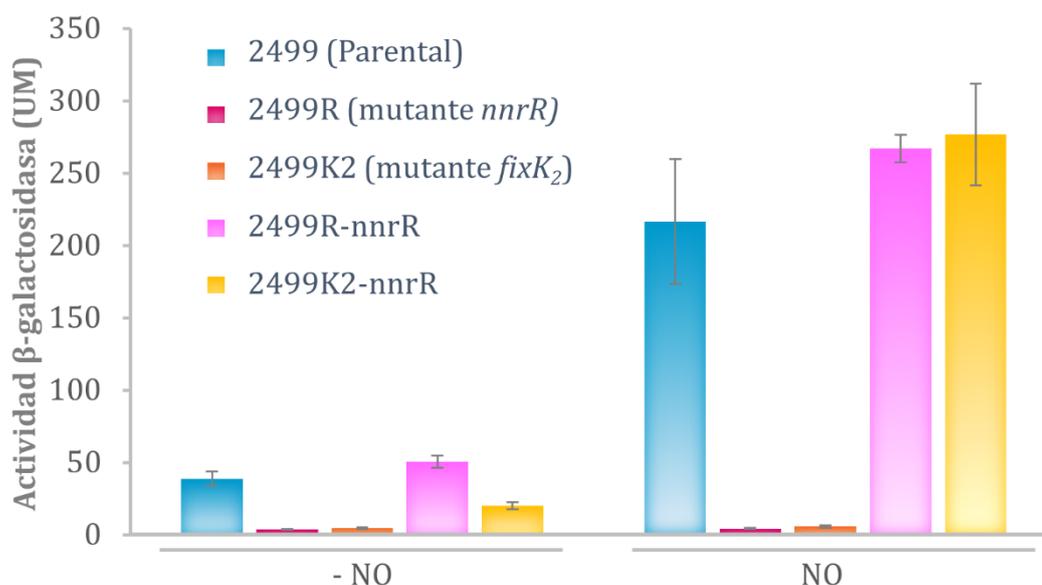


Figura 5.3.5. Actividad β -galactosidasa de la fusión *norC-lacZ* en las cepas de *B. diazoefficiens* parental (2499), mutantes *nnrR* (2499R) y *fixK*₂ (2499K2) y en ambas cepas mutantes complementadas con el gen *nnrR* (2499R-*nnrR* y 2499K2-*nnrR*). Las células se cultivaron en medio YEM en condiciones de microoxia (2% O₂) durante 24 h, y 5 h antes de la determinación de la actividad se añadió NO (50 μ M) a algunos cultivos (panel derecho). Las barras de error representan la desviación estándar de las medidas de tres réplicas experimentales de un ensayo representativo.

5.3.5. Estudio del mecanismo molecular de la proteína NnrR

5.3.5.1. Estudio in vivo de la influencia de la presencia de hemo en la respuesta a NO

5.3.5.1.1. Determinación de las actividades nitrato y nitrito reductasa en una cepa mutante hemN₂ de *B. diazoefficiens*

El gen *hemN₂* de *B. diazoefficiens* codifica la proteína HemN₂, una coproporfirinógeno III deshidrogenasa implicada en la síntesis de hemo. Esta proteína cataliza la conversión de protoporfirinógeno III a protoporfirinógeno IX bajo condiciones de anoxia, con consumo de NADP⁺, ATP, Mg²⁺ y L-metionina. En el genoma de *B. diazoefficiens* existen dos copias de este gen, *hemN₁* y *hemN₂*, las cuales fueron caracterizadas parcialmente por Fischer y colaboradores (2001). En particular, sólo la mutación en *hemN₂* afectó a la eficiencia simbiótica y a la capacidad de crecer en condiciones desnitrificantes de *B. diazoefficiens*. No obstante, este último fenotipo se restauró al observado en la cepa parental cuando la cepa mutante *hemN₂* (GRN307) se cultivó en un medio suplementado con hemina (protoporfirinógeno IX con Fe³⁺) (Fischer et al., 2001).

Puesto que el hemo ferroso se ha descrito como cofactor en las proteínas DNR de *P. aeruginosa* y DnrF de *D. shibae*, se planteó la posibilidad de que el gen *hemN₂* pudiera estar implicado en la síntesis del grupo hemo que se une como cofactor a la proteína NnrR y en consecuencia es necesario para su actividad.

En una primera ronda de experimentos, se llevó a cabo la determinación de las actividades de las enzimas nitrato reductasa (NR) y nitrito reductasa (NiR) en las cepas parental y mutante *hemN₂* (GRN307). Ambas cepas se cultivaron durante 48 h en condiciones desnitrificantes (tubo lleno) en medio YEM con 10 mM de NO₃⁻ que se inoculó a una DO₆₀₀ inicial de 0,2. Los resultados mostrados en la Figura 5.3.6A indican la ausencia de actividad NR en la cepa mutante *hemN₂*, lo que sugiere que la enzima nitrato reductasa respiratoria (Nap) de la ruta de desnitrificación no está funcionando. Esto puede explicarse porque tanto la subunidad NapC como la NapB requieren de grupos hemo para la actividad de la enzima Nap. Cuando se analizó la actividad NiR, se detectaron valores similares en ambas cepas (Figura 5.3.6B). Cabe decir que la enzima NiR respiratoria no requiere de hemo como cofactor para su

Resultados

funcionamiento, debido a que es una NirK que contiene cobre, por lo que era esperable la ausencia de fenotipo en la mutante *hemN₂* en cuanto a la actividad NiR.

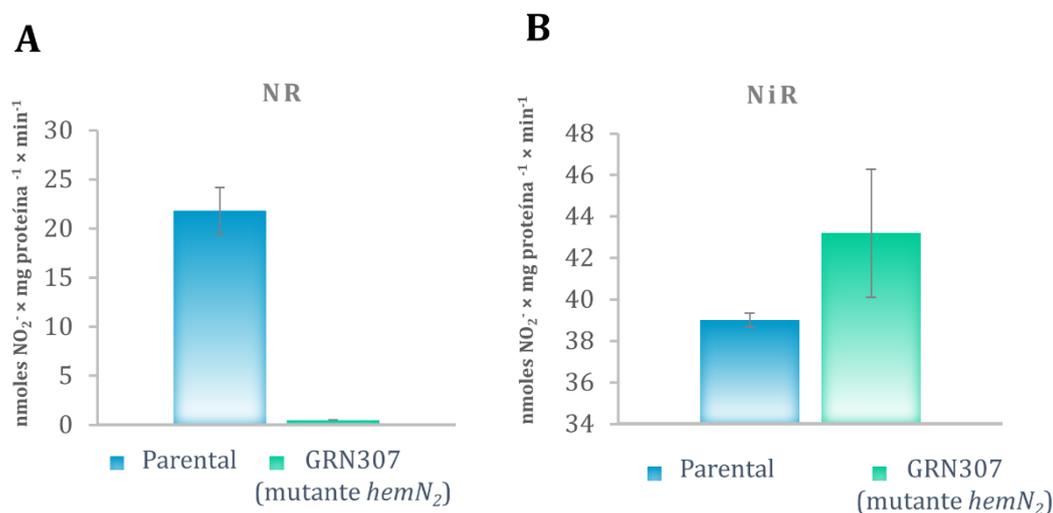


Figura 5.3.6. Actividad nitrato (NR) (A) y nitrito reductasa (NiR) (B) en la cepa parental y GRN307 (mutante *hemN₂*) de *B. diazoefficiens*. Las células se cultivaron durante 48 h en condiciones de anoxia (tubo lleno) en medio YEM con 10 mM NO₃⁻ que se inoculó a una DO₆₀₀ inicial de 0,2. Ambas actividades se expresan en nmoles de NO₂⁻ producido (NR) o consumido (NiR) × mg proteína⁻¹ × min⁻¹. Las barras de error representan la desviación estándar de las medidas de tres réplicas experimentales de un ensayo

5.3.5.1.2. Efecto de la hemina en la expresión de la fusión *norC-lacZ* en la cepa mutante *hemN₂*

Para estudiar el efecto de la hemina en la expresión de los genes *norCBQD*, la cepa parental 2499 y la mutante *hemN₂* (2499*hemN₂*) de *B. diazoefficiens*, que contienen la fusión *norC-lacZ*, se incubaron durante 24 h en anoxia (tubo lleno) en medio YEM en presencia o ausencia de hemina (15 µg/ml de medio de cultivo). El medio se inoculó a una DO₆₀₀ inicial de 0,2 y 5 h antes de realizar la determinación de actividad se adicionó una solución de NO (50 µM, concentración final). En este caso, los niveles de actividad β-galactosidasa se determinan como UM/mg de proteína × min, ya que la hemina genera un color rojizo en el medio de cultivo que afecta a la medida de DO₅₉₅, necesaria para obtener los valores de UM (Unidades Miller).

En la cepa parental se observó una inducción de aproximadamente 2,5 veces de actividad β-galactosidasa en cultivos con NO en comparación con los valores

obtenidos en ausencia de NO (Figura 5.3.7). Estos resultados confirman los obtenidos previamente por Bueno y colaboradores (2017) quienes demostraron que la máxima expresión de los genes *norCBQD* requiere la presencia de NO además de microoxia. En el caso de la mutante *hemN₂*, los valores de actividad β-galactosidasa de la fusión *norC-lacZ* fueron considerablemente más bajos que los de la cepa parental tanto en ausencia como en presencia de NO (1,5 y 3,5 veces inferiores, respectivamente). Resulta interesante el hecho de que al adicionar hemina a los cultivos con NO de la cepa mutante *hemN₂* se restauraron los valores de actividad β-galactosidasa de la cepa parental, es decir que se alcanzó la máxima expresión de los genes *norCBQD* (Figura 5.3.7). La hemina *per se*, en ausencia de NO, no provocó ningún efecto sobre la inducción de la fusión *norC-lacZ*, lo que indica que es la combinación hemina+NO la condición necesaria para obtener la máxima inducción de la fusión *norC-lacZ* en la mutante *hemN₂*.

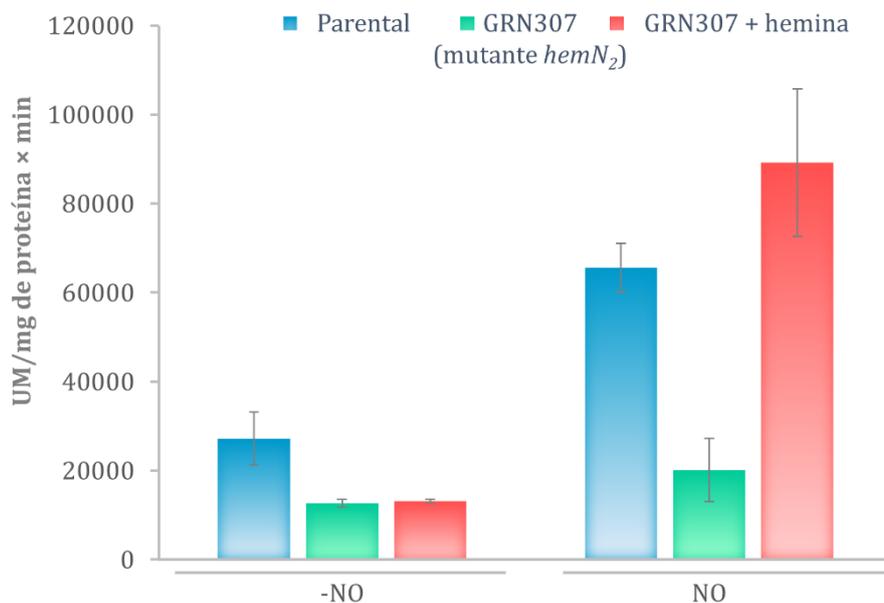


Figura 5.3.7. Actividad β-galactosidasa (UM/mg de proteína × min) de la fusión *norC-lacZ* en las cepas de *B. diazoefficiens* parental y GRN307 (mutante *hemN₂*), en presencia y ausencia de NO. En algunos casos se adicionó hemina (15 μg/ml) a los cultivos de la cepa mutante *hemN₂*. Las células se cultivaron durante 24 h en anoxia (tubo lleno) en medio YEM y 5 h antes de la determinación de actividad se les añadió el NO (50 μM). Las barras de error representan la desviación estándar de las medidas de tres réplicas experimentales de un ensayo representativo.

Estos resultados indican que el hemo sintetizado por la proteína HemN₂ parece ser necesario para la máxima expresión de los genes *norCBQD*. Habiendo demostrado en resultados anteriores que la proteína NnrR controla los genes *norCBQD* independientemente del regulador FixK₂ y que probablemente la forma activa de NnrR requiera hemo como cofactor, se puede vincular la carencia de hemo en la mutante *hemN₂* a la baja expresión de la fusión *norC-lacZ* cuando las células se cultivaron en presencia de NO. En estas condiciones, la proteína NnrR no sería activa puesto que carece de hemo como posible cofactor.

5.3.6. Determinación de la unión de NnrR a hemo *in vitro*

5.3.6.1. Expresión y purificación de la proteína NnrR

5.3.6.1.1. Construcción del plásmido de expresión pMB1122

Para la expresión de la proteína NnrR sin etiqueta, en primer lugar, se amplificó por PCR un fragmento de 740 pb (Figura 5.3.8A) que contiene el gen *nnrR*, utilizando los oligonucleótidos *nnrR-8_for* y *nnrR-8_rev* (Tabla 4.3). Una vez purificado y cuantificado, el fragmento de ADN se digirió con las endonucleasas de restricción *NdeI* y *BcuI* (*SpeI*), y se ligó a continuación a un fragmento de 6636 pb del plásmido pTXB1 (NEB) (Tabla 4.2) digerido con las mismas enzimas, el cual contiene la etiqueta IMPACT (de sus siglas en inglés *Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag*). De esta forma, en el plásmido resultante, el gen *nnrR* queda fusionado en su parte 3' con esta etiqueta. La correcta inserción del fragmento de PCR en el vector, así como la fidelidad de la secuencia amplificada se verificaron secuenciando la construcción con los oligonucleótidos pTXB1_1 y pTXB1_2 (Tabla 4.3). La construcción final dió lugar al plásmido pMB1122 (Figura 5.3.8B).

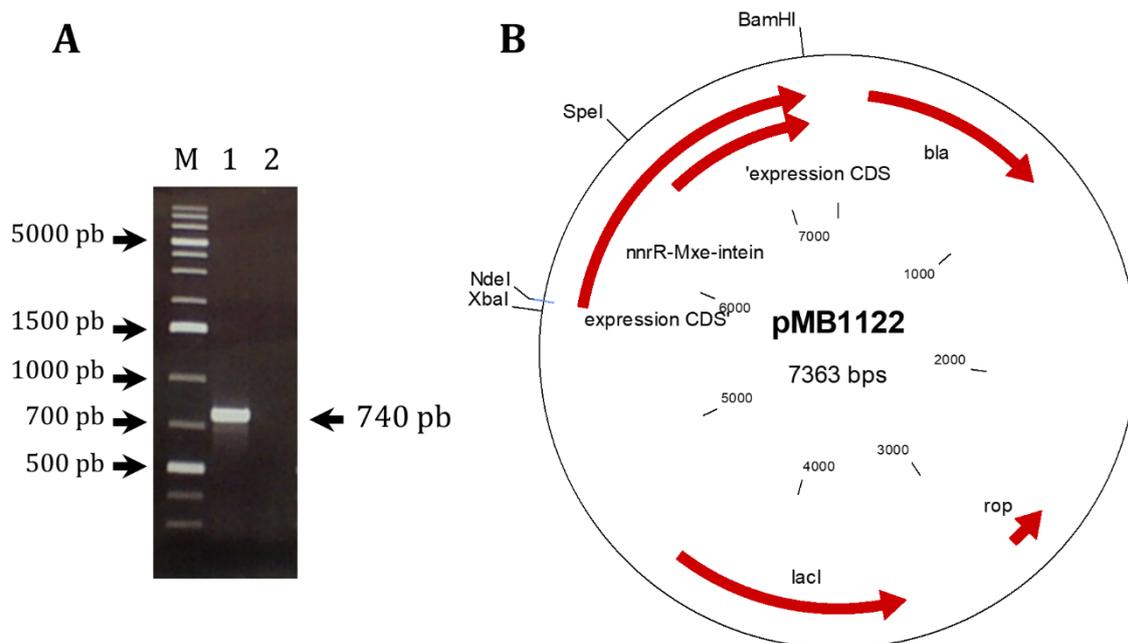


Figura 5.3. 8. Construcción del plásmido pMB1122 que expresa NnrR-Mxe-Inteína-CBD. **A.** Amplificación del fragmento que expresa NnrR para clonaje en fase en pTXB1. Se llevó a cabo una reacción de PCR con los oligonucleótidos nnrR-8_for y nnrR-8_rev y ADN genómico de *B. diazoefficiens* 110spc4 como molde, detectándose un producto de 740 pb (carril 1). Se realizó una reacción de PCR como control negativo sustituyendo el ADN molde por agua (carril 2). M. Marcador molecular de ADN GeneRuler DNA Ladder (Fermentas). **B.** Mapa del plásmido pMB1122. Inserción en fase del gen *nnrR* para dar lugar a una proteína recombinante con la inteína-CBD fusionada en su extremo carboxilo terminal bajo el control del promotor T7.

5.3.6.1.2. Expresión de la proteína NnrR-Mxe-Inteína-dominio de unión a quitina (CBD) en *E. coli* ER2566

Las células competentes de *E. coli* ER2566 transformadas con el plásmido pMB1122 se incubaron a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ de 0,3 (aproximadamente 2 h). A continuación, las células se incubaron a 30°C durante 1 h, de esa manera se consiguió una DO₆₀₀ de 0,6 – 0,8. En ese momento, se tomó una alícuota del cultivo de 1 ml y posteriormente, se adicionó 0,1 mM de IPTG. Se incubaron de nuevo las células a 30°C durante 2 h. Tras la incubación se recogieron las células por centrifugación a 5.500 × *g* durante 7 min. Después del fraccionamiento celular, la electroforesis en SDS-PAGE reveló que la concentración de 0,1 mM de IPTG en el medio fue suficiente para inducir la expresión de proteína NnrR-Mxe-Inteína-CBD (Figura 5.3.9 carril 2).

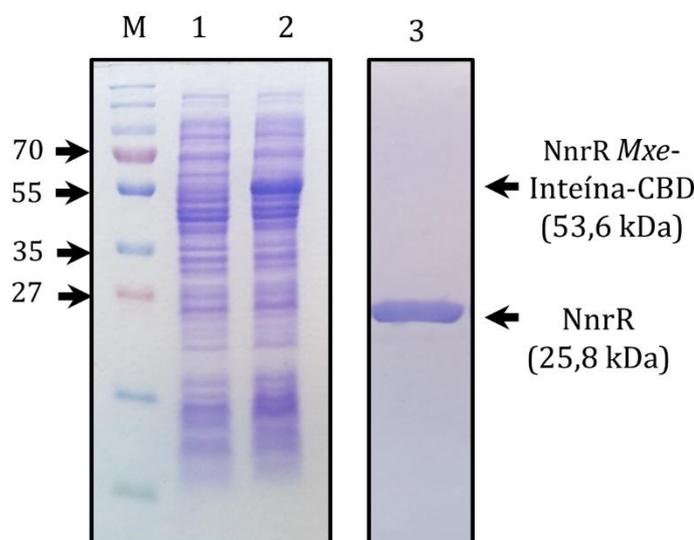


Figura 5.3.9. Sobre-expresión y purificación de la proteína NnrR-*Mxe*-Inteína-CBD. Las células de *E. coli* ER2566 con el plásmido pMB1122 se cultivaron a 30°C durante 2 h tras añadir el IPTG, se lisaron, se sometieron a electroforesis PAGE-SDS, y posteriormente, se tiñó el gel con azul de Coomassie. Se tomó una alícuota del cultivo previo a la inducción por IPTG (carril 1) y otra alícuota después de 2 h de incubación con IPTG (carril 2). La proteína NnrR tras la escisión con DTT y posterior elución de NnrR con “column buffer” se muestra en el carril 3. En el margen derecho de la figura se indican las bandas de 53,4 kDa correspondiente a la proteína NnrR *Mxe*-Inteína-CBD y de 25,8 kDa correspondiente a la proteína NnrR purificada. El primer carril corresponde a marcador molecular de proteínas (M) PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder. El tamaño molecular, en kDa, y la posición de las proteínas marcadoras se indican en el margen izquierdo de la figura.

5.3.6.1.3. Purificación de NnrR por el sistema IMPACT

Para cada lote de proteína NnrR purificada se emplearon 500 ml de cultivo de *E. coli* ER2566 con el plásmido pMB1122. Una vez realizado el fraccionamiento celular (procedimiento detallado en el apartado 4.5.1 de materiales y métodos) y diluido el sobrenadante con “column buffer” (Tabla 4.6) se cargó sobre la columna, empaquetada con resina de quitina, se lavó con “column buffer” y se escindió la proteína con DTT durante 16 h. El DTT provoca una autoescisión en el fragmento de inteína, de tal manera, que la proteína se purifica sin etiqueta ni aas extra, mientras que la ínteína junto con el dominio de unión a quitina quedan adheridos a la matriz de quitina de la columna. La elución de la proteína pura sin etiqueta se llevó a cabo con la adición de “column buffer” en fracciones de 1 ml. De esta manera se obtuvo la

proteína NnrR correspondiente a una banda de aproximadamente 25,8 kDa con una pureza del 99% (Fig. 5.3.9 carril 3) y un rendimiento de 9,6 mg/litro de cultivo.

5.3.6.2. Titulación de NnrR con hemina

Los estudios de interacción NnrR-cofactor, y específicamente NnrR-hemo, se llevaron a cabo con proteína NnrR sin etiqueta purificada en condiciones óxicas tal y como se describe en el apartado anterior. La capacidad de NnrR de unirse a hemo fue determinada espectroscópicamente por titulación de la apoproteína NnrR con hemina, bajo condiciones anóxicas. Una solución de apoproteína NnrR a una concentración de 20 μ M (forma monomérica) en tampón fosfato 40 mM, 300 mM NaCl, pH 7,5 se tituló con una solución de hemina 0,5 mM disuelta en NaOH 0,1 M y reducida con 3 mM de ditionito sódico. La concentración final de hemina fue incrementando con cada adición de alícuotas de 1 o 2 μ l de la solución. Tras cada adición de hemina se realizó un espectro completo UV/Visible (250 nm – 650 nm) (Figura 5.3.10). En el análisis y normalización de los datos obtenidos de cada uno de los espectros, frente a la titulación control sobre tampón, se observan 3 picos; uno a 280 nm, que corresponde a la proteína; y otros dos característicos de hemo reducido unido a proteína, a 427 y 567 nm (Figura 5.3.10). La representación de los valores de absorbancia a 427 nm de cada uno de los espectros normalizados frente a la concentración de hemo, determina la formación de un complejo NnrR:hemo y se observa una unión de aproximadamente 1 mol de hemo por cada mol de proteína NnrR monomérica (Figura 5.3.11).

Resultados

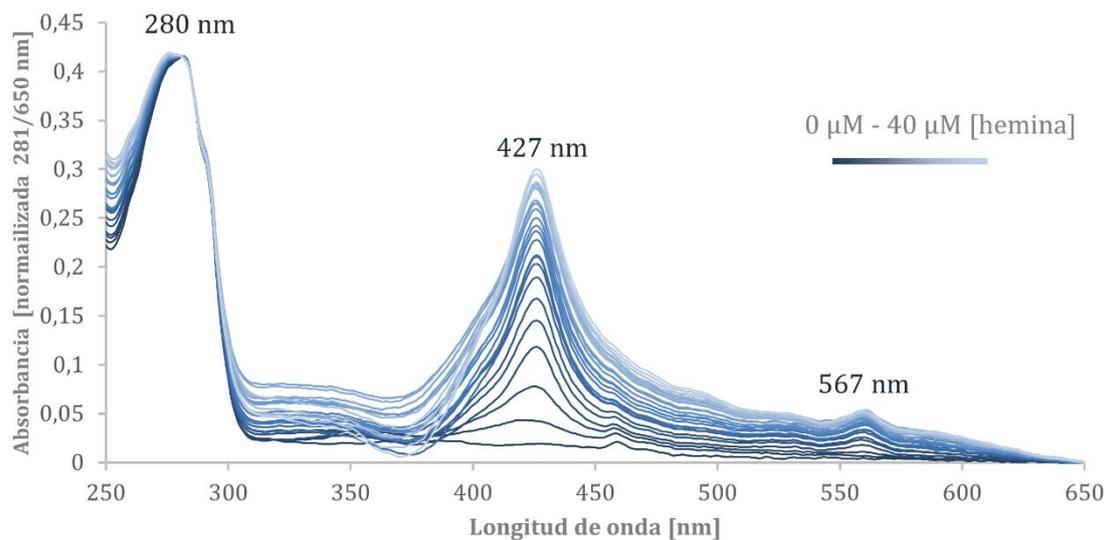


Figura 5.3.10. Cambios espectrales obtenidos en la titulación de proteína NnrR (20 μM monómero) con cantidades crecientes de hemina desde 0 hasta 40 μM. Los datos están normalizados a la longitud de onda de 281 nm y de 650 nm.

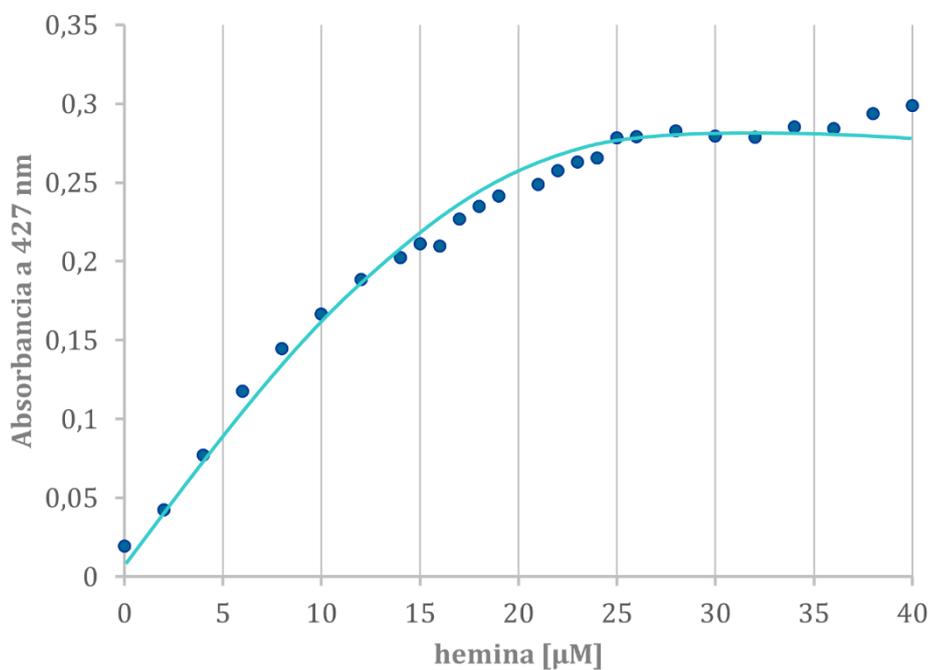


Figura 5.3.11. Representación gráfica de los valores de absorción de cada uno de los espectros obtenidos en la titulación para cada una de las concentraciones de hemina.

5.3.6.3. Reconstitución de NnrR con hemina

La reconstitución de la proteína NnrR con hemina se llevó a cabo mezclando apoproteína NnrR a 32 μM (forma monomérica) en tampón fosfato 40 mM, 300 mM NaCl, pH 7,5 con un exceso estequiométrico de tres veces de hemina. La mezcla se incubó durante 2 h a 16°C en condiciones anóxicas. Tras la incubación, el exceso de hemina fue eliminado por diálisis frente a 1 l del mismo tampón de reconstitución durante una noche a 4°C y posteriormente se realizó una filtración en gel con una columna de Sephadex G-25 (PD-10). Se determinó un espectro completo UV/Vis de la alícuota con NnrR reconstituida con hemo en su forma férrica y se observaron propiedades espectrales compatibles con la unión de hemo a NnrR, concretamente un pico prominente a 411 nm (Figura 5.3.12B), el cual no aparece en la proteína sin reconstituir (sólo se muestra el pico de proteína a 280 nm) (Figura 5.3.12A). La proteína NnrR reconstituida con hemo se redujo añadiéndole un exceso del reductor químico ditionito sódico, bajo condiciones anóxicas y se analizó de nuevo espectrofotométricamente. Los resultados muestran un pico a 425 nm que se corresponde con hemo ferroso (Figura 5.3.12B). Una vez que se obtuvo la proteína NnrR unida a hemo ferroso, se adicionó NO gas, y se volvió a analizar el espectro. Los datos muestran la desaparición del pico de hemo ferroso y la presencia de un hombro a 389 nm que indicarían la unión del NO al hemo ferroso de la proteína reconstituida (Figura 5.3.12B). Según estos experimentos se propone al grupo hemo como posible cofactor de NnrR implicado en la detección de NO.

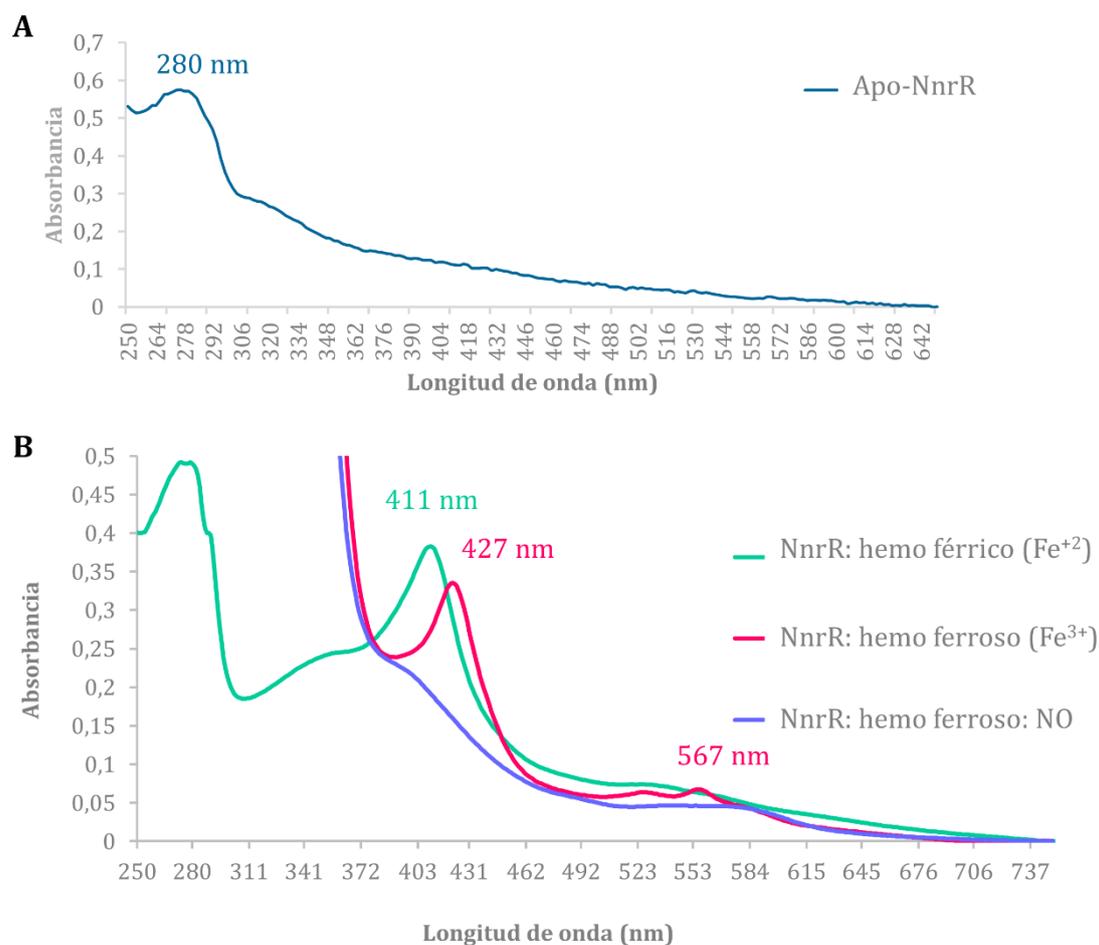


Figura 5.3.11. Propiedades espectrales de NnrR como apo y holoproteína. A. Espectro completo UV/Vis (250 - 650 nm) de apoproteína purificada NnrR (32 μ M monómero) previamente a su reconstitución con hemina. **B.** Espectros completos UV/Vis (250 nm- 750 nm) de proteína NnrR reconstituida con hemo en su forma ferrosa (línea verde), forma reducida (línea roja), forma reducida unida a óxido nítrico (NO) (línea azul).

Capítulo 4

**Determinantes moleculares implicados en la
interacción diferencial de las proteínas FixK₂ y
NnrR con ADN**

5.4. Capítulo 4. Determinantes moleculares implicados en la interacción diferencial de las proteínas FixK₂ y NnrR con ADN

5.4.1. Análisis comparativo de las cajas tipo FixK₂ presentes en los promotores de las dianas directas de esta proteína

Según los resultados obtenidos en ensayos de IVT con proteína FixK₂ recombinante purificada y ARNP de *B. diazoefficiens* (Mesa et al., 2005; Mesa et al., 2008; Reutimann et al., 2010; Bueno et al., 2017; Torres et al., 2017; Tabla 5.4.1), FixK₂ controla directamente la activación de la transcripción de 18 promotores, siendo la caja FixK₂ presente en el promotor del operón *fixNOQP* la que se considera como prototipo para esta proteína. No obstante, también se han descrito casos en los que FixK₂ no fue capaz de activar la transcripción, tales como los genes *norCBQD* que codifican la Nor (Bueno et al., 2017) o el gen *cy2* que codifica un citocromo soluble (Mesa et al., 2008; Tabla 5.4.1). Cabe decir, además, que la única diana directa de la proteína NnrR conocida hasta la fecha son los genes *norCBQD*, ya que proteína NnrR purificada interaccionó de forma específica con la secuencia palindrómica presente en el promotor de estos genes en ensayos de CIT llevados a cabo en condiciones anóxicas (Bueno et al., 2017). Es por ello que esta secuencia se considera como la caja NnrR modelo.

El estudio comparativo del alineamiento de las cajas tipo FixK₂ presentes en la región promotora de los genes no activados por FixK₂ en comparación con aquellos genes activados directamente, así como con con la secuencia consenso de la caja FixK₂ (Tabla 5.4.1) indicó que la principal diferencia entre ellos, en cuanto a los residuos implicados en la interacción FixK₂-ADN (nucleótidos 1, 3, 11 y 12; Bonnet et al., 2013), sería la posición 11, que en el caso de los genes *norCBQD* y *cy2* (no activados por FixK₂ en ensayos de IVT) sería un adenina en lugar de una timina o una guanina (Tabla 5.4.1 y Figura 5.4.1). Por otro lado, tanto la caja FixK₂ consenso como la prototipo presente en el promotor del operón *fixNOQP* son secuencias palindrómicas perfectas en los nucleótidos 1 a 4 y 11 a 14 (Figura 5.4.1), mientras que en el caso de la caja NnrR (*norCBQD*), el residuo 4 no conserva la palindromía del residuo 11.

Resultados

Por tanto, con el objeto de estudiar la relevancia del residuo 11 en la interacción de FixK₂-ADN en comparación con la proteína NnrR, se introdujeron mutaciones (transversiones) en la posición 11 de las cajas FixK₂ y NnrR prototipo presentes en la región promotora de los genes *fixNOQP* y *norCBQD* (Figura 5.4.1). Además, para analizar el efecto de la palindromía de la secuencia de ADN se generaron una serie de derivados con transversiones en las posiciones 4 o 10 de la caja FixK₂ y en la posición 4 de la caja NnrR, además de la mutación en la posición 11 (Figura 5.4.1). Como secuencia control se empleó un derivado con transversiones timina *versus* adenina y guanina *versus* citosina, y viceversa, en las posiciones 1 a 5 y 10 a 14 de la caja FixK₂ (Figura 5.4.1). A continuación, estos derivados se emplearon en las siguientes secciones de este capítulo de resultados (experimentos de interacción proteína-ADN con RPS, IVT y expresión de fusiones con el gen informador *lacZ*) para determinar los nucleótidos discriminatorios de la unión FixK₂-ADN y de su especificidad respecto a NnrR en cuanto a la capacidad de activar sus dianas.

Tabla 5.4.1. Alineamiento de cajas tipo FixK₂ de genes activados o no directamente por FixK₂. Se indican en negrita los nucleótidos conservados con respecto a la caja FixK₂ consenso. En color rojo se indican los nucleótidos que difieren de la caja consenso.

Locus ^a	Gen ^b	Cajas FixK ₂ ^c	Referencia
Genes directamente activados por FixK₂ (IVT)			
bll2109		TTGCGTCACCTCAA	Tesis doctoral Andrea Lindemann
bll2758	ORF138	TTGAGCCAAGTCAA	Reutimann et al., 2010
blr2763	<i>fixN</i>	TTGATTTCAATCAA	Mesa et al., 2005
blr2767	<i>fixG</i>	TTGAGCTGGATCAA	Mesa et al., 2005
bll3998		TTGACCTGTCTCAA	Mesa et al., 2008
blr4637	<i>hspC2</i>	TTGAGCAAATCAA	Mesa et al., 2008
blr4655	<i>ppsA</i>	TTGACCTGCCTCAA	Mesa et al., 2008
bll6061	<i>fixK₁</i>	TTGATCTGGGTCAA	Mesa et al., 2008

blr6062	<i>cycS</i>	TTGACCCAGATCAA	Mesa et al., 2008
blr6070		TTGAGGGAGGTCAA	Mesa et al., 2008
bll6073	<i>phbC</i>	TTGATGCAGCTCAA	Mesa et al., 2008
bsr7036	<i>napE</i>	TTGATCCAGATCAA	Bueno et al., 2017
bll7086	<i>hemN₂</i>	TTGCGCGAGCGCAA	Mesa et al., 2005
bsr7087		TTGCGCTCGCGCAA	Mesa et al., 2008
blr7089	<i>nirK</i>	TTGTTGCAGCGCAA	Bueno et al., 2017
blr7544	<i>cycA</i>	TTGTTGCAGCGCAA	Este trabajo
blr0314	<i>nosR</i>	TTGATCCAGCGCAA	Este trabajo
blr7083/ bll7084	<i>nnrS/nnrR</i>	TTGCGCTATCGCAA	Este trabajo

Genes no activados directamente por FixK₂ (IVT)

bll2388	<i>cy₂</i>	TTGATGCAGGACAA	Mesa et al., 2008
blr3212	<i>norE</i>	TTGCGTCGGCGCAA	S. Mesa, no publicados
blr3214	<i>norC</i>	TTGCGCCCTGACAA	Bueno et al., 2017
blr3999		TTGAGACAGGTCAA	S. Mesa, no publicados
bll3466		TTGATCCGACGCAG	Este trabajo (no se muestran resultados)

a. Nomenclatura de los genes de *B. diazoefficiens* USDA110 según Kaneko et al., (2002); número de acceso en GenBank NC_004463.1. Anotación RefSeq de Enero de 2016.

b. Nomenclatura de los genes de *B. diazoefficiens* 110*spc4* de acuerdo con la anotación de NCBI (número de acceso GenBank CP032617); Fernández et al., 2019.

c. Cajas FixK₂ (ó NnrR) putativas presentes en la región promotora de los genes estudiados.

Caja consenso FixK ₂		1	2	3	4	11	12	13	14
		T	T	G	(A/C)-N ₆	(T/G)	C	A	A
Caja FixK₂ de <i>fixNOQP</i>	Parental	T	T	G	A	TTTCAA	T	C	A
	A vs. T en posición 11	T	T	G	A	TTTCAA	A	C	A
	A vs. T y viceversa en posiciones 10 +11	T	T	G	A	TTTCAT	A	C	A
	A vs. T y viceversa en posiciones 4 +11	T	T	G	T	TTTCAA	A	C	A
	Transversión A vs. T, C vs. G y viceversa (posiciones 1-5 + 10-14)	A	A	C	T	ATTTCAT	A	G	T
Caja NnrR de <i>norCBQD</i>	Parental	T	T	G	C	GCCCTG	A	C	A
	T vs. A en posición 11	T	T	G	C	GCCCTG	T	C	A
	A vs. C en posición 4 y T vs. A en posición 11	T	T	G	A	GCCCTG	T	C	A

Figura 5.4.1. Comparación de las secuencias nucleotídicas de la caja consenso de FixK₂ (Bonnet et al., 2013), la caja FixK₂ presente en el promotor de los genes *fixNOQP*, la caja NnrR presente en el promotor de los genes *norCBQD* y los derivados de cada una de ellas construidos en este trabajo. Se indican en azul y en fucsia, respectivamente, las mutaciones introducidas en las cajas FixK₂ y NnrR.

5.4.2. Estudio *in vitro* de la interacción de FixK₂ con derivados de las cajas FixK₂ y NnrR presentes en los promotores de los genes *fixNOQP* y *norCBQD*, respectivamente

La influencia de las mutaciones introducidas en las cajas FixK₂ y NnrR descritas en el apartado anterior en la capacidad de unión a ADN de la proteína FixK₂, y su especificidad, se realizó mediante experimentos de RPS que permiten analizar a tiempo real interacciones moleculares.

5.4.2.1. Efecto de la mutación en las posiciones 4, 10 y 11 en la interacción FixK₂-ADN por RPS

Para llevar a cabo los experimentos de RPS, se inmovilizaron los distintos derivados de las cajas como oligonucleótidos de doble cadena con las mutaciones de interés (apartado 4.6.2) en “chips” independientes y se analizó la respuesta obtenida al pasar un rango de concentraciones de proteína FixK₂ purificada. En total se

analizaron 7 derivados (4 de la caja FixK₂ y 3 de la caja NnrR; Figuras 5.4.1, 5.4.2 y Tabla 5.4.2).

En los sensogramas obtenidos se pudo determinar interacción específica entre la proteína FixK₂ y la caja parental FixK₂ (Figura 5.4.2A), con una constante de afinidad (KD) de $4,4 \times 10^{-9}$ M y unas constantes de asociación (Ka) y de disociación (Kd) de $4,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $2,1 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente, de acuerdo a un modelo cinético de interacción de un dímero de proteína por molécula de ADN. Por el contrario, el perfil de interacción obtenido con la caja parental NnrR nos indica la interacción inespecífica o no interacción de FixK₂ con esta caja (Figura 5.4.2B), ya que por un lado no alcanza las unidades máximas de respuesta (UR) esperadas incluso a concentraciones de 1 uM, ni tampoco permite calcular las constantes según un modelo cinético ni tampoco de afinidad. Cuando se introdujeron mutaciones en la posición 11 de cada una de las cajas, se observó que mientras que en el caso de la caja FixK₂ la afinidad disminuyó dando lugar a una KD de $7,7 \times 10^{-8}$ M (Figura 5.4.2C), en el caso de la caja NnrR mutada, a diferencia de su caja parental (no unión), FixK₂ fue capaz de interaccionar con una KD de 8×10^{-8} M (Figura 5.4.2D). Con el objeto de analizar el efecto de la palindromía en las interacciones observadas, se incluyó individualmente un segundo intercambio en cada una de las cajas, en la posición 10 de la caja FixK₂ (Figura 5.4.2E) y en la posición 4 de la caja NnrR (Figura 5.4.2F). Ninguna de las dos mutaciones introducidas dio lugar una diferencia considerable en la afinidad (KD de $8,6 \times 10^{-8}$ M para la caja FixK₂ y KD de 1×10^{-7} M para la caja NnrR). Como era de esperar en el derivado con mutaciones en los nucleótidos 1 – 5 + 10 – 14 de la caja de FixK₂ no se observó interacción de la proteína FixK₂ (Figura 5.4.2G). Los cálculos de las constantes de afinidad (KD) en los promotores mutados se calcularon según un modelo de afinidad.

Resultados

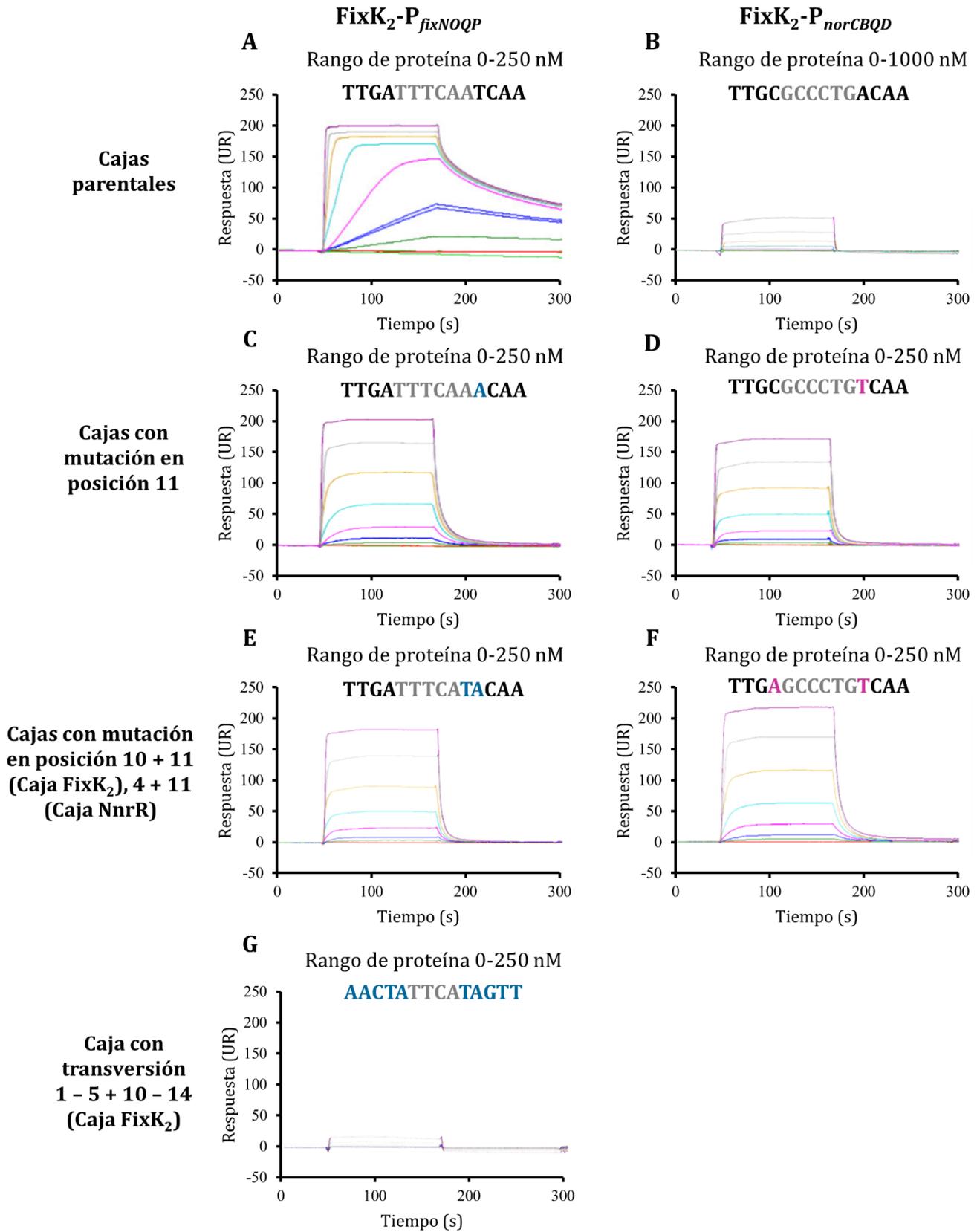


Figura 5.4.2. Interacción de la proteína FixK₂ con las cajas FixK₂ y NnrR presentes en los promotores de los genes *fixNOQP* y *norCBQD*, respectivamente y con derivados mutantes de dichas cajas. Mediante resonancia de plasmón de superficie se analizó la interacción que se produce al pasar un flujo de distintas concentraciones de proteína FixK₂, que se inicia en el segundo 50 y se mantiene durante 2 minutos. Se obtienen sensogramas donde se representa las unidades de respuesta (UR) con respecto al tiempo (s) en cada uno de los experimentos. La columna de sensogramas de la izquierda corresponde con los experimentos llevados a cabo los derivados de la caja FixK₂ del promotor de *fixNOQP* (paneles A, C, E y G), mientras que la columna de la derecha son los sensogramas de los derivados de la caja NnrR del promotor de *norCBQD* (paneles B, D y F). En la parte superior de cada sensograma se indica la secuencia nucleotídica de la caja específica usada, con las mutaciones introducidas respecto a la caja parental indicadas en azul (caja FixK₂) o fucsia (caja NnrR). **A.** Interacción de FixK₂ con la caja FixK₂ parental. **B.** Interacción FixK₂ con la caja NnrR parental. **C.** Interacción de FixK₂ con la caja FixK₂ mutada en la posición 11. **D.** Interacción de FixK₂ con la caja NnrR mutada en posición 11. **E.** Interacción de FixK₂ con la caja FixK₂ mutada en las posiciones 10 + 11. **F.** Interacción de FixK₂ con la caja NnrR FixK₂ mutada en las posiciones 4 + 11. **G.** Interacción de FixK₂ con la caja FixK₂ mutada en las posiciones 1 – 5 + 10 – 14.

Tabla 5.4.2. Derivados de las cajas FixK₂ (*fixNOQP*) y NnrR (*norCBQD*) usados en este estudio. Se detallan las mutaciones y la secuencia de cada uno de los derivados junto con la constante de afinidad (KD) obtenida en los experimentos de RPS de la interacción de la proteína FixK₂ con cada caja. Se indican en rojo los nucleótidos mutados.

Figura	Caja	Mutación	Secuencia	KD (M)
A	FixK ₂	-	TTGATTTCAATCAA	4,4 x 10 ⁻⁹
C	FixK ₂	A vs. T en posición 11	TTGATTTCAA A CAA	7,7 x 10 ⁻⁸
E	FixK ₂	A vs. T y viceversa en posiciones 10 +11	TTGATTTCA T A C AA	8,6 x 10 ⁻⁸
G	FixK ₂	Transversión A vs. T, G vs. C y viceversa (posiciones 1-5+10-14)	A A C T A T T C A T A G T T	No hay unión
B	NnrR	-	TTGCGCCCTGACAA	No hay unión
D	NnrR	T vs. A en posición 11	TTGCGCCCTG T CAA	8 x 10 ⁻⁸
F	NnrR	A vs. C en posición 4 y T vs. A en posición 11	TTG A GCCCTG T CAA	1,0 x 10 ⁻⁷

5.4.2.2. Efecto de la mutación en las posiciones 4, 10 y 11 en la activación de la transcripción mediada por FixK₂

5.4.2.2.1. Mutagénesis de la caja FixK₂ de *fixNOQP*

Para la construcción de los derivados de la caja FixK₂ con mutaciones en la posición 11 (A vs. T) y 4 + 11 y 10 + 11 (A vs. T y viceversa) se siguió la siguiente estrategia. En primer lugar, se amplificó por PCR un fragmento de 378 pb con extremos *EcoRI* y *HindIII* empleando como molde ADN genómico y los oligonucleótidos *fixN7_for* y *fixN7_rev* (Tabla 4.3), el cual se clonó en el vector pBluescript KS+ (Tabla 4.2), para dar lugar al plásmido pMB1300 (Tabla 4.2). El extremo 5' de dicho fragmento contiene la secuencia 3' de la caja FixK₂ presente en el promotor de *fixNOQP* y permite la clonación de fragmentos con mutaciones en la caja FixK₂ mediante el empleo de una enzima compatible como *MunI* (*MfeI*). La ligación con extremos *MunI* y *EcoRI*, por un lado, reconstruye la secuencia CAA de la caja FixK₂ (posiciones 12-14), por el otro, permite introducir mutaciones puntuales en el oligonucleótido reverso hasta la posición 11 (Figura 5.4.3). A continuación, se amplificaron por PCR tres fragmentos independientes con extremos *BamHI* y *MunI* empleando las combinaciones de oligonucleótidos *fixN8_for/fixN11_rev*, *fixN8_for/fixN27_rev* y *fixN8_for/fixN12_rev* (Tabla 4.3), que incluyen en su extremo 3', respectivamente, mutaciones de las posiciones 11, 10 + 11 y 4 + 11 de la caja FixK₂. El clonaje individual de los tres fragmentos con extremos *BamHI* y *MunI* en el plásmido pMB1300 digerido con *BamHI* y *EcoRI* dió lugar a los plásmidos pMB1307, pMB1357 y pMB1310 (Tabla 4.2).

Para la construcción del derivado del promotor *fixNOQP* con transversiones en las posiciones 1-5 y 10-14 de la caja FixK₂, se solicitó a la empresa Eurofins Genomics la síntesis de un fragmento de 1040 pb con el promotor de *fixNOQP* que incluía las mutaciones de interés. El fragmento de ADN se suministró por la empresa clonado con extremos *MreI* en el vector pEX-K4, el cual se nombró como pMB1316.

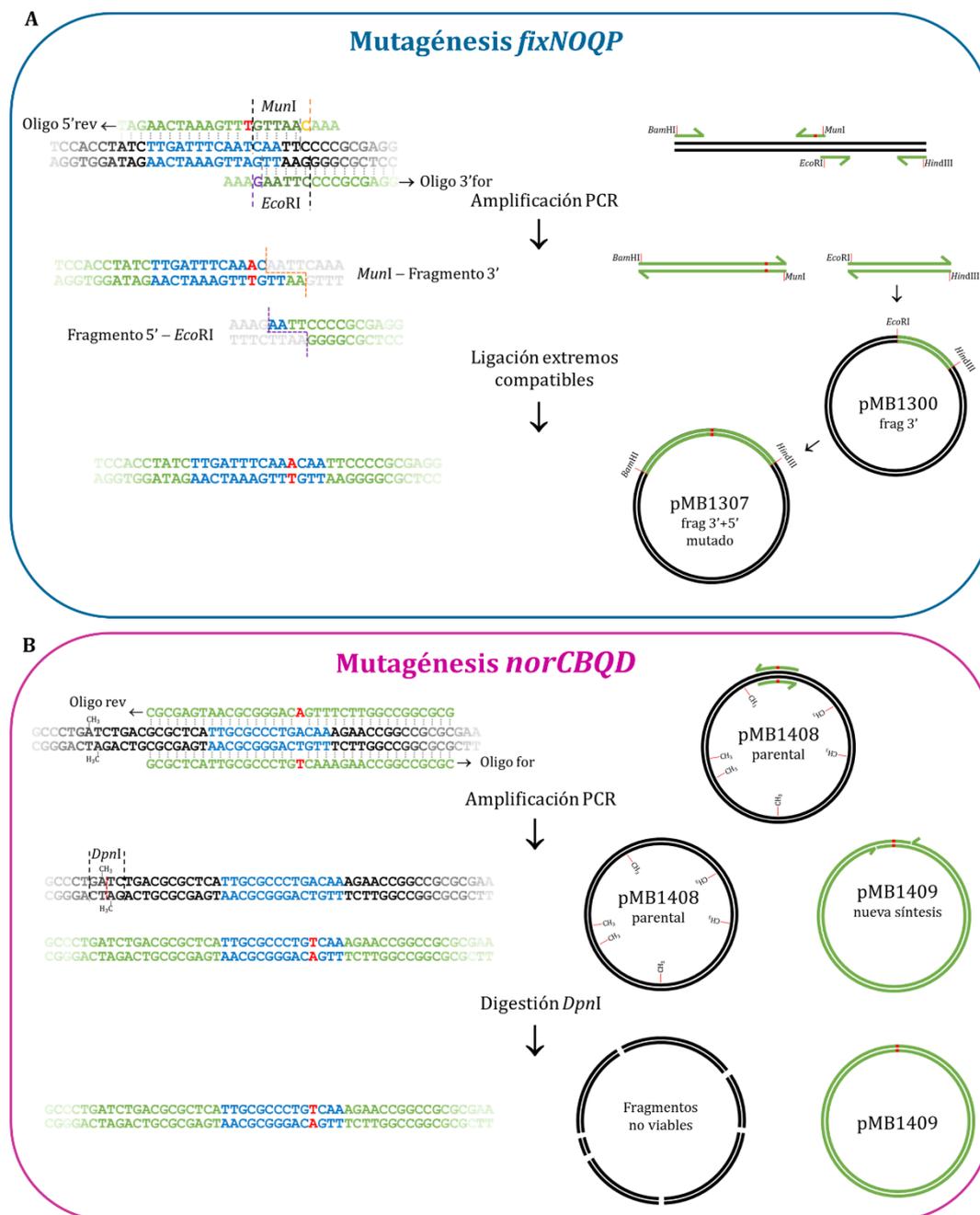


Figura 5.4.3. Estrategia de mutación de la caja $FixK_2$ del promotor de *fixNOQP* y la caja $NnrR$ del promotor de *norCBQD*. **A.** Mutagénesis de la caja $FixK_2$ mediante la fusión de dos fragmentos de PCR empleando las dianas compatibles *MunI* y *EcoRI*. Los fragmentos 5' contienen las mutaciones puntuales en la caja $FixK_2$ hasta la posición 11 y el lugar de reconocimiento de *MunI*. La ligación individual de dichos fragmentos con el plásmido pMB1300 cortado con *EcoRI* y *HindIII* reconstruye la secuencia CAA de la caja $FixK_2$ (posiciones 12-14), dando lugar a los distintos derivados de la caja $FixK_2$. **B.** Esquema de la metodología de mutación puntual dirigida por la técnica de QuikChange de un nucleótido (marcado en rojo) en la caja $NnrR$. Para ello se amplifica el plásmido completo con el fragmento de interés, empleando dos oligonucleótidos antiparalelos que incluyen la mutación en el centro de su secuencia. La selección de los plásmidos de nueva síntesis se realiza por digestión con *DpnI* (el ADN sintetizado *de novo* presenta las dianas *DpnI* metiladas, por lo que no es susceptible a digestión).

5.4.2.2.2. Mutagénesis de la caja NnrR de *norCBQD*

Para la construcción de derivados con mutaciones en la caja NnrR presente en el promotor de los genes *norCBQD* se empleó el plásmido pRJ2499 como molde (fusión *norC-lacZ*; Mesa et al., 2003). Con tal objeto, se amplificó un fragmento de 1098 pb por PCR con los oligonucleótidos *norC8_For* y *norC8_Rev* (Tabla 4.3), el cual, previa digestión con las endonucleasas de restricción *HindIII* y *PstI*, se ligó con el plásmido pBluescript KS+ (Tabla 4.2) digerido con las mismas enzimas. La fidelidad de la secuencia del inserto se verificó con los oligonucleótidos M13for y M13rev (Tabla 4.3). La construcción obtenida se denominó pMB1408 (Tabla 4.2), que contiene la versión parental de la caja NnrR.

Para la introducción de la transversión T vs. A en posición 11 de la caja NnrR, se empleó la técnica de mutagénesis puntual dirigida (apartado 4.4.8) empleando como molde el plásmido pMB1408 y los oligonucleótidos *norC9_mut_for* y *norC9_mut_rev* (Tabla 4.3), para dar lugar al plásmido pMB1409 (Figura 5.4.3B; Tabla 4.2).

En el caso de la construcción del derivado con mutaciones en las posiciones 4 (A vs. C) y 11 (T vs. A) de la caja NnrR se empleó el plásmido pEX_K168 NnrRbox mut 4, 11 (Eurofins Genomics; Tabla 4.2), el cual contiene un fragmento *EcoRI/PstI* de 243 pb con las mutaciones de interés clonado en el vector pEX-K4.

5.4.2.2.3. Construcción de plásmidos empleados en ensayos de IVT

Para determinar el efecto de cada una de las mutaciones introducidas, tanto en el promotor de *fixNOQP* como en el de *norCBQD*, en la activación de la transcripción *in vitro* mediada por FixK₂ se construyeron una serie de plásmidos que se emplearon como molde en experimentos de IVT.

Los derivados del promotor de *fixNOQP* con las mutaciones en las posiciones 11, 4 + 11, 10 +11 y 1-5+10-14 se construyeron amplificando por PCR fragmentos de 573 pb con los oligonucleótidos *fixN4_for* y *fixN4_rev* (Tabla 4.3), empleando como molde los plásmidos pMB1307, pMB1310, pMB1357 y pMB1316 (Tabla 4.2), respectivamente. Estos fragmentos se digirieron con las enzimas *BamHI* y *EcoRI* y se clonaron a continuación en el plásmido pRJ9519 (Tabla 4.2) cortado con las mismas enzimas para dar lugar a los plásmidos pMB1363, pMB1364, pMB1366 y

pMB1367. Cabe mencionar, que para estas construcciones se siguió la misma estrategia que para el plásmido pRJ8816 (Mesa et al., 2005), que contiene la caja genuina del promotor *fixNOQP* el cual se empleó como referencia en los experimentos.

Los derivados del promotor de *norCBQD* se generaron a partir de los plásmidos pMB1408, pMB1409 y pEX_K168 NnrRbox mut 4, 11 (Tabla 4.2) descritos en el apartado anterior. Para ello, se amplificaron por PCR fragmentos de 243 pb con extremos *EcoRI/HindIII* con los oligonucleótidos norC11_for y norC12_rev (Tabla 4.3) que se clonaron individualmente en el plásmido pRJ9519 cortado con las mismas enzimas (Tabla 4.2). Las construcciones finales se nombraron como pMB1414 (caja parental), pMB1415 (caja con mutación en posición 11), pMB1417 (caja con mutación en posición 4 + 11) (Tabla 4.2).

5.4.2.2.4. Ensayos de IVT en presencia de FixK₂ de los derivados de *fixNOQP* y *norCBQD*

En los experimentos de IVT en presencia de distintas concentraciones de FixK₂ se espera detectar dos transcritos, uno control de 107 nt, independiente de FixK₂ y otro específico de 243 nt, en el caso del promotor *fixNOQP* (Figuras 5.4.4), o de 231 nt, en el caso del promotor *norCBQD* (Figura 5.4.5). Cabe mencionar que la intensidad del transcrito específico es la que se considera para determinar la capacidad de FixK₂ de activar la transcripción de cada uno de los derivados.

En el caso del promotor *fixNOQP*, la transversión A vs. T en posición 11 de la caja FixK₂ dio lugar a una reducción considerable de la intensidad del transcrito dependiente de FixK₂ (Figura 5.4.4 carriles 5 y 6), en comparación con la intensidad de la banda específica obtenida con el derivado que contiene la caja parental (Figura 5.4.4 carriles 2 y 3), lo cual se relaciona con una disminución de transcripción debido a la mutación introducida. Cuando se incluyó una segunda mutación en posición 4 (Figura 5.4.4 carriles 8 y 9) o en posición 10 (Figura 5.4.4 carriles 11 y 12) en la caja FixK₂, el transcrito específico que se detectó fue prácticamente imperceptible, con una intensidad similar a la que se observó con el derivado con mutaciones en las posiciones 1 - 5 + 10 - 14 (Figura 5.4.4 carril 14) que se empleó como control negativo. En los carriles 1, 4, 7, 10 y 13 se cargaron reacciones de IVT realizadas con

Resultados

cada uno de los plásmidos usados como molde en ausencia de proteína FixK₂ por lo que, como era de esperar, solo se detectó el transcrito control de 107 nt.

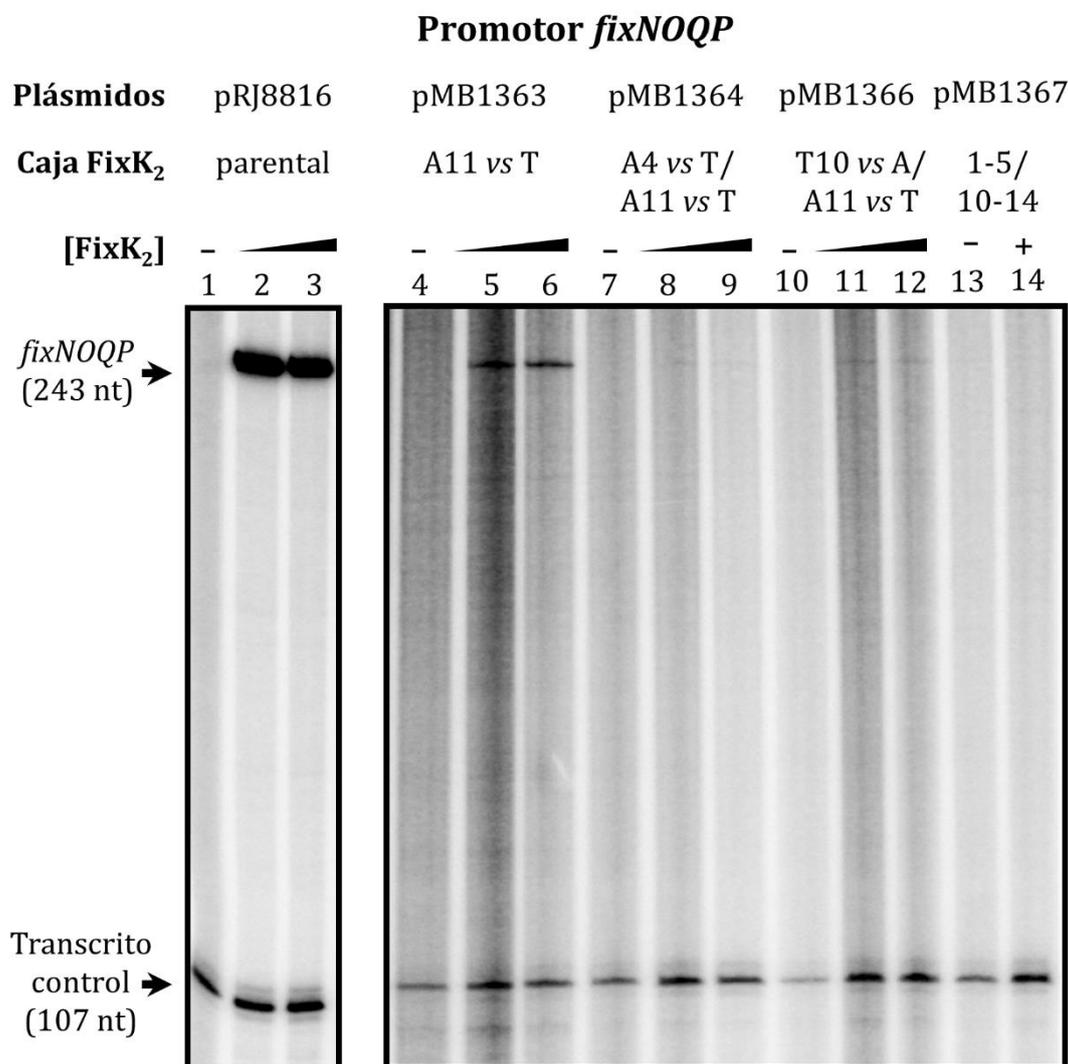


Figura 5.4.4. Activación de la transcripción *in vitro* por la proteína FixK₂ de derivados del promotor del operón *fixNOQP*. Los plásmidos pRJ8816, pMB1363, pMB1364 y pMB1367 se usaron para ensayos de IVT de ronda múltiple con proteína FixK₂ purificada y ARNP de *B. diazoefficiens* (reacciones sin proteína en los carriles 1, 4, 7, 10 y 13; con 1,25 μM de FixK₂ los carriles 2, 5, 8 y 11; con 2,5 μM de FixK₂ en los carriles 3, 6, 9, 12 y 14). Se detallan las mutaciones introducidas de la caja FixK₂ presentes en los plásmidos empleados. En el margen izquierdo de la figura se indican los transcritos obtenidos con sus tamaños moleculares. nt, nucleótidos.

Cuando se analizó la capacidad de activar la transcripción de los distintos derivados del promotor *norCBQD* por la proteína FixK₂, no se detectó transcrito específico ni con la caja NnrR parental (Figura 5.4.5, carriles 2 y 3) ni tampoco con el derivado con la transversión T vs. A en la posición 11 (Figura 5.4.5, carriles 5 y 6). Sin embargo, la introducción de una segunda mutación en posición 4 (A vs. C) dió

lugar a un transcrito dependiente de FixK₂ cuya intensidad incrementó con la concentración de proteína (Figura 5.4.5, carriles 8 y 9).

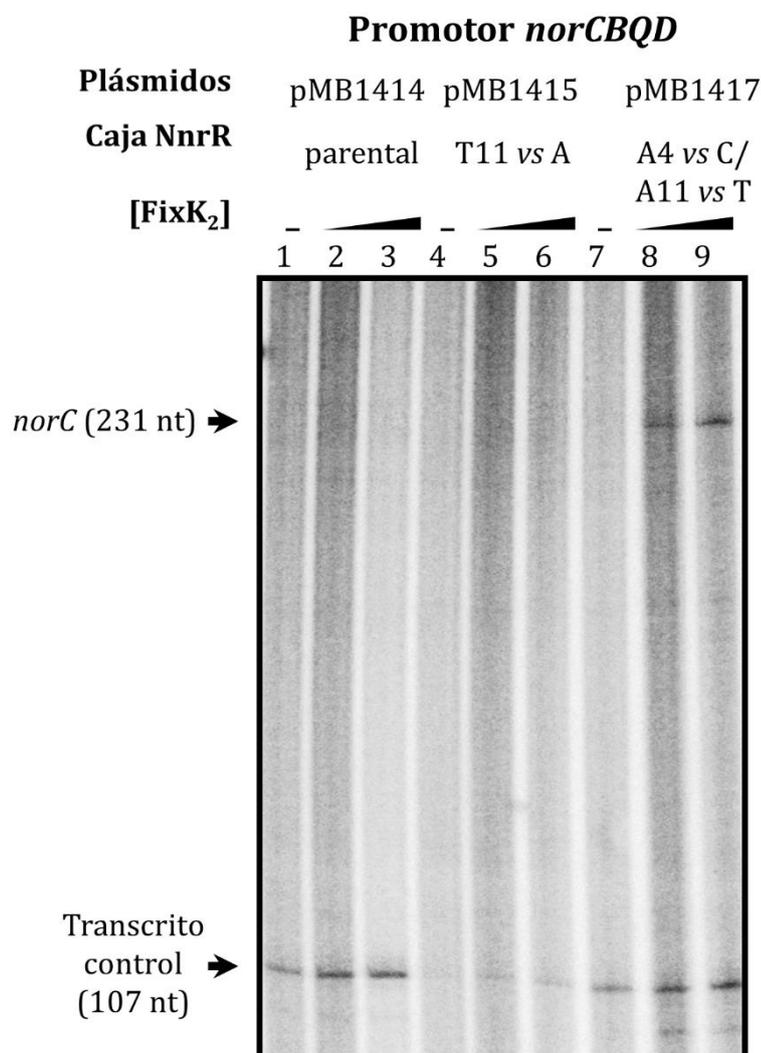


Figura 5.4.5. Ensayos de IVT en presencia de proteína FixK₂ de derivados del promotor de los genes *norCBQD*. Los plásmidos pMB1414, pMB1415 y pMB1417 se usaron para ensayos de IVT de ronda múltiple con proteína FixK₂ purificada y ARNP de *B. diazoefficiens* (reacciones sin proteína en los carriles 1, 4, 7; con 1,25 μM de FixK₂ los carriles 2, 5, 8; con 2,5 μM de FixK₂ en los carriles 3, 6, 9). Se detallan las mutaciones introducidas de la caja NnrR presentes en los plásmidos empleados. En el margen izquierdo de la figura se indican los transcritos obtenidos con sus tamaños moleculares. nt, nucleótidos.

5.4.3. Estudio *in vivo* del efecto de las mutaciones de las cajas FixK₂ y NnrR en la expresión de los genes *fixNOQP* y *norCBQD*, respectivamente

5.4.3.1. Construcción de fusiones *fixN-lacZ* y *norC-lacZ* con mutaciones en las cajas FixK₂ y NnrR

Los resultados obtenidos en ensayos de RPS e IVT se compararon con estudios *in vivo* mediante determinación de actividad β-galactosidasa de una batería de fusiones transcripcionales *fixN-lacZ* y *norC-lacZ* con las mutaciones en las cajas FixK₂ y NnrR de los genes *fixNOQP* y *norCBQD*, respectivamente, analizadas en capítulos anteriores.

Para la construcción de las fusiones *fixN-lacZ* se amplificaron individualmente productos de PCR de 574 pb empleando los oligonucleótidos *fixN28_for* y *fixN28_rev* y como molde los plásmidos pMB1307, pMB1310, pMB1357 y pMB1316, para la construcción de derivados con las mutaciones en las posiciones 11, 4 + 11, 10 + 11 y 1-5 + 10-14, respectivamente. En el caso de la construcción con la caja FixK₂ parental se empleó como molde ADN genómico. Los oligonucleótidos *fixN28_for* y *fixN28_rev* incluyen en sus secuencias, respectivamente, dianas para las enzimas de restricción *EcoRI* y *PstI* lo que permite la clonación de los fragmentos amplificados con la orientación correcta en el vector pSUP3535 cortado con las mismas enzimas. Las construcciones finales se nombraron como pMB1370 (caja parental), pMB1373 (caja con mutación en posición 11) y pMB1374 (caja con mutaciones en posición 4 + 11), pMB1376 (caja mutaciones en posición 10 + 11) y pMB1377 (caja con mutaciones en posiciones 1 – 5 + 10 – 14) (Figura 5.4.1; Tabla 4.2)

En la construcción de las fusiones *norC-lacZ* se emplearon como molde los plásmidos pMB1408 y pEX_K168 NnrRbox mut 4, 11 (Tabla 4.2). Para ello, se amplificaron fragmentos *EcoRI/PstI* de 243 pb con los oligonucleótidos *norC11_for* y *norC11_rev* (Tabla 4.3), que contienen diferentes mutaciones de la caja NnrR, que se ligaron en el plásmido pSUP3535 digerido con las mismas endonucleasas para dar lugar a los plásmidos pMB1412 (caja NnrR parental) y pMB1416 (caja con mutación en posiciones 4 + 11) (Tabla 4.2).

Finalmente, los plásmidos pMB1370, pMB1373, pMB1374, pMB1376 y pMB1377, derivados de la fusión *fixN-lacZ*, y pMB1412 y pM1416, derivados de la fusión *norC-lacZ* se transfirieron por conjugación a la cepa parental de *B. diazoefficiens* 110*spc4* para dar lugar a las cepas 110*spc4*-MB1370, 110*spc4*-MB1373, 110*spc4*-MB1374, 110*spc4*-MB1376, 110*spc4*-MB1377, 110*spc4*-MB1412 y 110*spc4*-MB1416.

5.4.3.2. Determinación de la expresión de los derivados de las fusiones *fixN-lacZ* y *norC-lacZ* en células de *B. diazoefficiens*

Las cepas se cultivaron en medio YEM en condiciones de microoxia (0,5% O₂ mantenido) partiendo de una DO₆₀₀ de 0,2 durante 24 h. En el caso de la fusión *norC-lacZ*, las cepas también se cultivaron en medio YEM suplementado con 10 mM de NO₃⁻ y bajo condiciones de 2% O₂ mantenido (condiciones para la máxima inducción de los genes *norCBQD*).

La actividad β-galactosidasa de la fusión *fixN-lacZ* con la mutación en la posición 11 fue 4 veces inferior que la observada en la fusión parental (Figura 5.4.6A) en células cultivadas en condiciones microóxicas (0,5% O₂). La introducción de mutaciones en las posiciones 4 y 10, además de la posición 11, resultó en valores basales de actividad β-galactosidasa, similar a la mutación de las posiciones 1+5 y 10+14. Estos resultados confirman los obtenidos en ensayos de RPS y de IVT.

En cuanto a la fusión *norC-lacZ*, el intercambio de las posiciones 4 y 11 redujo aproximadamente al 50% los valores de actividad β-galactosidasa en células cultivadas microóxicamente (2% O₂) en presencia de nitrato (Figura 5.4.6B), condiciones necesarias para su máxima expresión, la cual depende de la proteína NnrR. Curiosamente, cuando las células se cultivaron en microoxia (0,5% O₂) en ausencia de nitrato (condiciones idóneas para el control por la proteína FixK₂), la fusión *norC-lacZ* con mutaciones las posiciones 4 y 11 dio lugar a valores de expresión superiores (casi el doble) a los observados en la fusión con el promotor parental (Figura 5.4.6C). Estos resultados confirman lo observado en experimentos de RPS e IVT, en los que las posiciones 4 y 11 de la caja NnrR parecen ser importantes

Resultados

para la interacción con el promotor y consecuentemente la activación de los genes *norCBQD* por la proteína FixK₂.

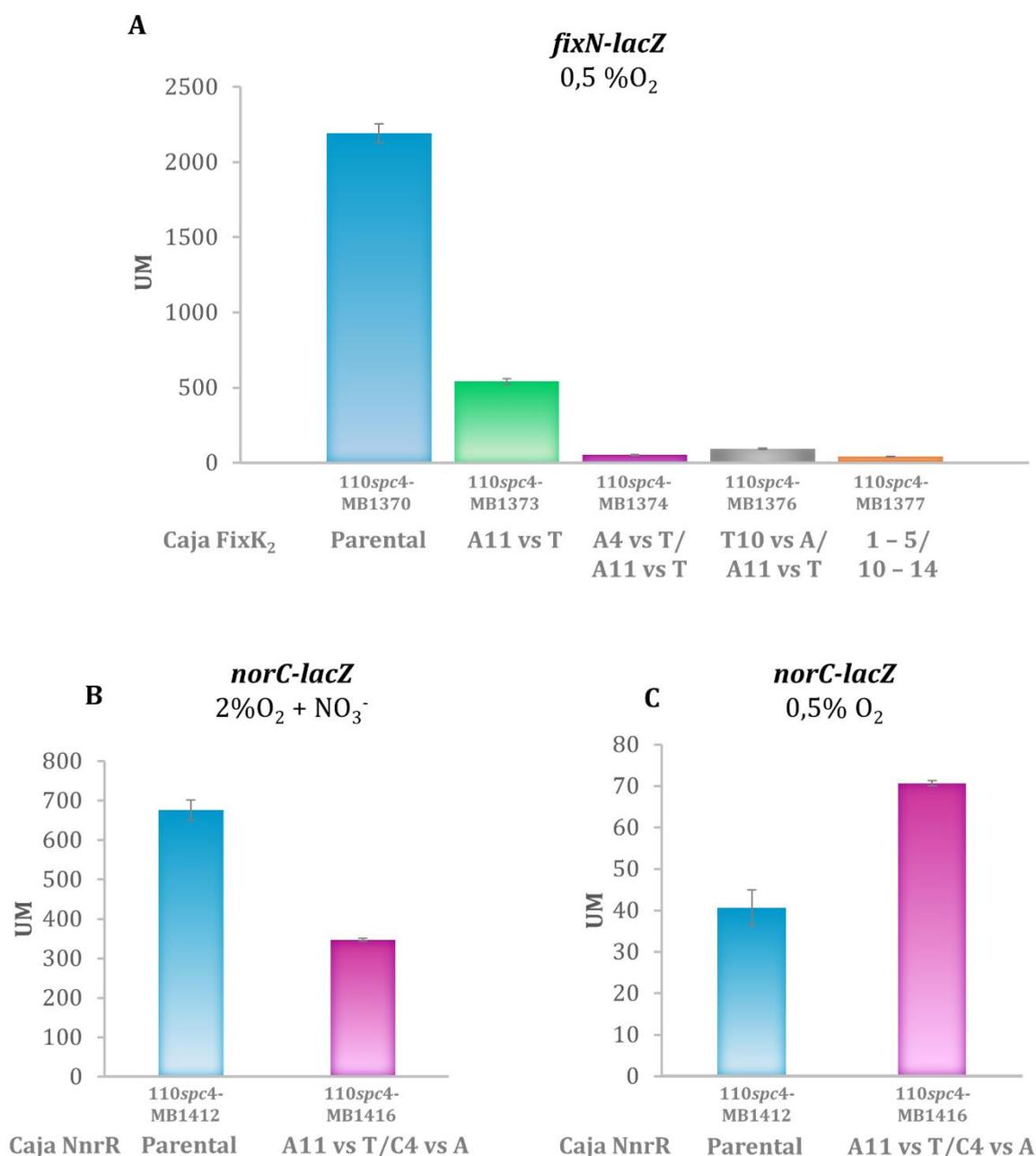


Figura 5.4.6. Efecto de las mutaciones en las cajas FixK₂ y NnrR de *fixNOQP* y *norCBQD*, respectivamente, en la expresión de las fusiones *fixN-lacZ* y *norC-lacZ*. La expresión de los derivados de las fusiones *fixN-lacZ* (A) y *norC-lacZ* (B) se analizó en células cultivadas microóxicamente (0,5% O₂) durante 24 horas. También se determinó la actividad β-galactosidasa de los derivados de la fusión *norC-lacZ* en células cultivadas en medio con nitrato bajo condiciones microóxicas (2% O₂) (C). Los valores de actividad β-galactosidasa representan la media y desviación estándar de dos cultivos independientes ensayados por triplicado. Se muestran los datos de un experimento representativo de los tres realizados.

6

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN GENERAL

Expandiendo el regulón del factor transcripcional NnrR de *B. diazoefficiens*: Nuevos descubrimientos en la ruta de la desnitrificación

La desnitrificación en bacterias (revisado en Zumft, 1997; Kraft et al., 2011; van Spanning et al., 2007; Richardson, 2011; Bueno et al., 2012; Torres et al., 2016), y específicamente en el organismo modelo *B. diazoefficiens* (revisado en Bedmar et al., 2005, 2013) ha sido un proceso ampliamente estudiado hasta la fecha. La proteína reguladora NnrR desempeña un papel importante en *B. diazoefficiens*, ya que expande la cascada reguladora FixLJ-FixK₂ e integra la señal de óxidos de nitrógeno (Mesa et al., 2003). Sin embargo, el regulón de NnrR aún no había sido estudiado al completo. En este trabajo, se realizó un análisis del transcriptoma de una mutante *nnrR* en comparación con la cepa parental, ambas cultivadas bajo condiciones de anoxia, y se comparó con el grupo de genes inducidos por anoxia en la cepa parental. Esta comparación llevó a la identificación de 175 genes inducidos por anoxia bajo el control positivo de NnrR (Tabla Suplementaria S1). Dentro de este grupo, hay tres genes diana (*nirK*, *norCBQD*, *nosRZDFYLX*) que había sido previamente descritos bajo el control directo o indirecto de NnrR (Mesa et al., 2003; Robles et al., 2006; Bueno et al., 2017; Torres et al., 2017). En particular, nuestros resultados confirman aquellos que mostraron una expresión reducida de las fusiones *nirK-lacZ*, *norC-lacZ* y *nosR-lacZ* en una mutante *nnrR* (Bueno et al., 2017; Torres et al. 2017). Sin embargo, la única diana directa conocida para NnrR es el grupo de genes *norCBQD*, ya que la proteína NnrR recombinante purificada fue capaz de unirse a su región promotora de forma específica bajo condiciones de anoxia (Bueno et al., 2017), mientras que la disminución de la expresión de *nirK* y *nosRZDFYLX* se atribuyó al efecto tóxico de la acumulación de NO en la mutante *nnrR* (Torres et al., 2017). En este trabajo, también identificamos como genes diana de NnrR a genes involucrados en el transporte electrónico implicado en el proceso de desnitrificación. Este es el caso de *cycA* que codifica un citocromo *c*₅₅₀ que actúa como donador de electrones de NirK (Bueno et al., 2008) y *cy2* que codifica el citocromo *c*₂, descrito previamente como un gen regulado indirectamente por FixK₂ (Mesa et al., 2008). Otros genes supuestamente activados por NnrR son *hemN*₁ y *hemN*₂, siendo el producto de este último requerido para la desnitrificación, así como para la fijación de nitrógeno

simbiótico según se describe en Fischer et al. (2001). Además de los genes descritos anteriormente, encontramos que *rpoN₁* es un gen bajo el control positivo de NnrR, lo que indica un control cruzado adicional entre las dos cascadas reguladoras sensibles al oxígeno RegSR-NifA y FixLJ-FixK₂-NnrR. De hecho, 14 de los 65 genes que constituyen el regulón directo NifA + RpoN₁ (Hauser et al., 2007) mostraron una expresión regulada a la baja en la mutante *nnrR* (Tabla suplementaria S1). Tomados en conjunto, estos resultados expanden el regulón de *B. diazoefficiens* en condiciones desnitrificantes. En otros rizobios como *E. meliloti*, los estudios transcriptómicos confirmaron nuestros hallazgos e identificaron los genes de la desnitrificación (*nirK* y *norC*), así como otros genes asociados a la desnitrificación (*azu1*, *hemN*, *nnrU* y *nnrS*) como genes diana de NnrR (Meilhoc et al., 2010). A diferencia de lo que ocurre en *B. diazoefficiens*, las proteínas NnrR y FixK presentes en *E. meliloti* son parte de dos cascadas reguladoras diferentes (revisado en Cabrera et al., 2011).

Los ortólogos NnrR están presentes en otros organismos, tales como NnrR de *R. sphaeroides* 2.4.1. En células expuestas a estrés nitrosativo, los genes *norCBQD* y otros genes codifican putativas proteínas accesorias para el ensamblaje de cNor (Arai et al., 2013). De manera similar, como se encontró para NnrR en *B. diazoefficiens*, el análisis de microarrays de células mutantes en DNR, en la bacteria *P. aeruginosa*, cultivadas en condiciones anaeróbicas reveló que los genes estructurales de la desnitrificación *nirS*, *norCB* y *nosR*, así como *hemN*, y los genes que codifican los citocromos tipo *c* están controlados por esta proteína (Trunk et al., 2010; Rodionov et al., 2005). Del mismo modo, se requiere DnrF de la bacteria marina *D. shibae* para la inducción de la expresión de *norCB*, *hemA* que codifica la 5-aminolevulinato sintasa y un gen responsable de la biosíntesis del citocromo *c* (Ebert et al., 2017).

También realizamos una caracterización en profundidad de *cycA*, uno de los genes bajo el control positivo de NnrR. Al realizar los análisis de qRT-PCR y de detección de citocromos *c*, pudimos validar el requisito de NnrR para la inducción de *cycA* en células cultivadas bajo condiciones desnitrificantes. Además de NnrR, la inducción máxima de *cycA* en respuesta a la anoxia también fue controlada por FixK₂. Sin embargo, *cycA* no parecía ser un gen controlado directamente por FixK₂.

en análisis previos de microarrays de una mutante *fixK2* cultivado bajo condiciones de microoxia (Mesa et al., 2008). Por lo tanto, postulamos que la anoxia podría ser necesaria para el control por FixK2 de la inducción del gen *cycA*. De hecho, niveles similares de proteína CycA fueron encontrados en los ensayos de detección de citocromos *c* en la mutante *fixK2* con respecto a los niveles observados en células de la cepa salvaje, ambas cultivadas bajo microoxia y óxia. Sin embargo, la inducción significativa de CycA que se observó en la cepa salvaje en respuesta a condiciones anóxicas desnitrificantes en comparación con condiciones óxicas y microóxicas no fue percibida en células mutantes en *fixK2*. La participación de FixK2 en la inducción de *cycA* en condiciones anóxicas también se confirmó a nivel transcripcional en experimentos de qRT-PCR. Además, también pudimos identificar *cycA* como gen controlado directamente por FixK2, basándonos en el transcrito dependiente de FixK2 perteneciente al gen *cycA* detectado en los experimentos de IVT. En estudios previos, se demostró que la proteína FixK2 purificada transcribe eficientemente desde los promotores *napEDABC*, *nirK* y *nosRZDFYLYX*, pero no desde el promotor de *norCBQD* (Bueno et al., 2017; Torres et al., 2017), siendo NnrR el candidato para controlar directamente la expresión de los genes *norCBQD*. En este trabajo, demostramos que *nnrR* y *nnrS* (genes divergentes que comparten el mismo promotor) son dos genes directamente activados por la proteína FixK2. Estos resultados están de acuerdo con la dependencia de FixK2 para la inducción de ambos genes observada previamente (Mesa et al., 2003; Mesa et al., 2008) y también ratificaron que el control de FixK2 sobre los genes *norCBQD* es indirecto a través de NnrR.

CycA es un citocromo soluble involucrado en el crecimiento anaeróbico de *B. diazoefficiens* utilizando nitrato o nitrito como aceptor final de electrones, lo que sugiere un papel de este citocromo en la desnitrificación (Bott et al., 1995; Bueno et al., 2008). Específicamente, está involucrado en la transferencia de electrones del complejo de membrana *bc1a* la nitrito reductasa (NirK) (Bueno et al., 2008). Ahora hemos demostrado, por primera vez, el papel de CycA en el funcionamiento de la óxido nitroso reductasa, dada la reducida actividad de N₂OR observada en la mutante *cycA* en comparación con la cepa salvaje. Además de su participación en el proceso de desnitrificación, CycA desempeña un papel en el crecimiento

quimiolitotrófico de *B. diazoefficiens* cuando se usa tiosulfato como donador de electrones (Masuda et al., 2017). En esta condición de crecimiento, los electrones se canalizan preferentemente a través del citocromo CycA a la citocromo oxidasa hemo-cobre *aa-3* tipo codificada por los *coxBAFC* genes. Cabe destacar que NirK, NosZ y CoxB tienen centros de cobre (Cu), en particular NosZ y CoxB contienen centros de Cu tipo A (Cu_A) (Bühler et al., 2010). Estas observaciones nos permiten sugerir que CycA podría ser responsable de la transferencia de electrones a proteínas que contienen Cu pertenecientes a diferentes vías respiratorias.

En particular, la mutante *cycA* conservó cierta actividad N₂OR, lo que sugiere que donadores de electrones alternativos también podrían participar en la transferencia de electrones a Nos. Del mismo modo que se observó para la desnitrificación, también se propuso la presencia de rutas alternativas para la transferencia de electrones en el crecimiento quimiolitotrófico según Masuda y colaboradores (2017). Para identificar a otros candidatos como posibles donantes de electrones a Nos, determinamos la actividad N₂OR en cepas de *B. diazoefficiens* mutantes en los citocromos solubles *c₂* codificado por el gen *bll2388* y CycS codificado por *bll6062* (Mesa et al., 2008). Como se muestra en la Figura 5.1.6, ninguno de estos mutantes mostró un efecto negativo en la actividad N₂OR en comparación con los niveles de actividad de la cepa salvaje. En consecuencia, ninguno de estos citocromos está implicado en la transferencia de electrones a Nos, al menos cuando CycA está presente. Por lo tanto, proponemos el citocromo soluble CycA como el principal donante de electrones a la óxido nitroso reductasa.

En resumen, este trabajo ha contribuido a aumentar la comprensión de la regulación de la desnitrificación en el modelo desnitrificante de rizobios *B. diazoefficiens* al expandir el regulón de NnrR, una de las proteínas clave involucradas en el control de este proceso. El gen *cycA*, uno de los objetivos identificados, también resultó activado directamente por el factor de transcripción FixK₂. Además, demostramos el vínculo directo entre FixK₂ y *nnrR*, reforzando el papel de NnrR como intermediario en el control mediado por FixK₂ de ciertos genes diana. Finalmente, descubrimos un nuevo papel para el citocromo soluble CycA en la transferencia de electrones a la Nos, añadiendo un nuevo jugador en la reducción del óxido nitroso en las bacterias endosimbióticas del suelo.

La proteína FixK₂ es el principal activador transcripcional de los genes *nosRZDFYLX* de *B. diazoefficiens* en respuesta a bajo oxígeno

Dado el efecto perjudicial que posee el N₂O, sobre el cambio climático, por ser un potente GEI, se deben desarrollar estrategias para mitigar sus emisiones con el fin de aumentar la eficiencia agrícola y disminuir los niveles actuales de producción de N₂O, y así satisfacer las demandas del crecimiento continuo de la población (Richardson et al., 2009 y Thomson et al., 2012). Estas estrategias deben incluir una mejor comprensión de los factores ambientales y moleculares que contribuyen a la generación y al consumo biológico de N₂O. *B. diazoefficiens*, el endosimbionte de la soja, contribuye a las emisiones de N₂O, dada su capacidad para llevar a cabo el proceso de desnitrificación, tanto en condiciones de vida libre como simbióticas. A pesar del importante conocimiento disponible en esta especie de rizobio sobre la regulación de las tres primeras enzimas de desnitrificación (Nap, NirK y cNor) involucradas en la producción de N₂O (Bueno et al., 2017), los mecanismos reguladores involucrados en el control del paso clave en la mitigación de N₂O (la reducción de N₂O a N₂) en respuesta al bajo nivel de oxígeno y NO_x no se han estudiado en detalle. Estudios anteriores han demostrado que la expresión de una fusión *nosZ-lacZ* depende de bajo O₂, la presencia de NO₃⁻, las proteínas reguladoras FixLJ, FixK₂ y NosR (Velasco et al., 2004). La capacidad de *B. diazoefficiens* para acoplar la reducción de N₂O al crecimiento, así como el papel del sistema regulador NasST en la modulación de la transcripción del gen *nosZ* también se ha descrito (Sánchez et al., 2013; Sánchez et al., 2014). Además, estudios recientes han demostrado la capacidad de NasT para interactuar con el ARN líder 5' del gen *nosR* de *B. diazoefficiens* (Sánchez et al., 2017).

En este trabajo, hemos analizado, por primera vez, la organización transcripcional de los *nosRZDFYLX* en *B. diazoefficiens*. Mediante el uso de RT-PCR, encontramos que los genes *nosRZDFYLX* se transcriben como un solo ARNm policistrónico y, por lo tanto, se organizan como un operón. La disposición transcripcional de los genes *nos* en otros desnitrificantes indica la existencia de una diversidad de promotores transcripcionalmente activos detectados a lo largo de los genes *nos* entre diferentes especies bacterianas (Zumft y Kroneck, 2007). Apoyando nuestros hallazgos, los genes *nos* de *P. aeruginosa* están dispuestos en un solo

operón *nosRZDFYL* hexacistrónico (Arai et al., 2013). También, solo se identificó un único transcrito *nosZ* en *P. fluorescens* (Philippot et al., 2001). Sin embargo, en *P. stutzeri* se ha propuesto la existencia de tres unidades monocistrónicas a partir de *nosR*, *nosZ*, y del operón *nosDFYLtatE* (Cuypers et al., 1992; Vollack y Zumft, 2001; Honisch y Zumft, 2003). De manera similar, la organización transcripcional de los genes *nos* de *E. meliloti* y *P. denitrificans* comprende tres transcritos: *nosR*, *nosZ* y *nosDF(Y)*, y *nosCR*, *nosZ* y *nosDFYLY*, respectivamente (Holloway et al., 1996 y van Spanning, 2011). Con el fin de confirmar los resultados obtenidos por RT-PCR, se buscaron promotores transcripcionalmente activos dentro del operón *nosRZDFYLY* de *B. diazoefficiens*, analizando la fuerza transcripcional impulsada por las regiones 5' de ADN de los genes *nosR*, *nosZ* y *nosD*. Curiosamente, la actividad transcripcional más alta se derivó de la región 5' del gen *nosR* en comparación con la detectada del gen *nosZ*, y no se observó transcripción de la región de 5' del gen *nosD*. La presencia de un promotor transcripcionalmente activo en la región 5' del gen *nosZ* se demostró previamente mediante el uso de una fusión transcripcional *nosZ-lacZ* (Velasco et al., 2004) y con la realización del ensayo de 5'-RACE (Sánchez et al., 2017). Sin embargo, dado que sólo se detecta la presencia de un motivo de unión para los reguladores de tipo FixK en la región promotora de *nosR*, sugerimos que este promotor desempeña el papel principal en la regulación de los genes *nosRZDFYLY* de *B. diazoefficiens*.

En este trabajo, hemos identificado dos TSS de *nosR*, es decir, TSS₁ y TSS₂, posicionados a +40,5 y +67,5 pb, respectivamente, desde el eje de simetría del sitio de unión tipo FixK (TTGATCCAGCGCAA). De manera similar, un TSS en +40,5 desde el eje de simetría de la caja FixK ha sido identificado recientemente por Sánchez y colaboradores (2017). En contraste con nuestros resultados, el TSS a +67,5 pb no se identificó en los últimos estudios. Esta discrepancia podría deberse a las diferentes condiciones de crecimiento utilizadas por Sánchez y colaboradores, donde las células se cultivaron en medio HMM (Sameshima-Saito et al., 2006) en condiciones anóxicas (reemplazo de O₂ por N₂ en la fase gaseosa). Cajas tipo FixK₂ están presentes dentro de los promotores de los genes *napEDABC* (TTGATCCAGATCAA), *nirK* (TTGTTGCAGCGCAA) y *norCBDQD* (TTGCGCCCTGACAA) de *B. diazoefficiens* (Velasco et al., 2001; Mesa et al., 2002; Delgado et al., 2003). Curiosamente, solo la caja FixK₂ asociada a los genes *napEDABC*, así como la caja de *nosR* identificada en este trabajo, coinciden bastante bien con la caja consenso FixK₂, TTG(A /C)-N₆-

(T/G)CAA (Mesa et al., 2008; Mesa et al., 2009; Bonnet et al., 2013). La eliminación de esta caja FixK₂ dio como resultado la desaparición completa de la *nosR-lacZ* expresión, lo que indica su papel esencial en la transcripción del operón *nosRZDFYLX*.

Células de *B. diazoefficiens* cultivadas en condiciones óxicas mostraron una expresión basal de la fusión *nosR-lacZ*. En este sentido, observaciones previas mostraron que el gen *nosZ* de *P. stutzeri* también se puede expresar a altas concentraciones de O₂ (Miyahara et al., 2010). Apoyando estos hallazgos, recientemente se demostró la capacidad de *P. stutzeri* y *P. denitrificans* para reducir el N₂O en condiciones óxicas (Desloover et al., 2014; Qu et al., 2015).

De manera similar a lo descrito para los genes *napEDABC* (Bueno et al., 2017), encontramos que la microoxia es suficiente para inducir la expresión de la fusión *nosR-lacZ*, los niveles de NosZ y la actividad N₂OR. A diferencia de lo observado para la expresión de *nosR* y la actividad de NosZ, resultados previos demostraban que la expresión microóxica de los genes *norCBQD* de *B. diazoefficiens* requerían la presencia de NO₃⁻, NO₂⁻ o NO (Bueno et al., 2017). La ligera inducción de la fusión *nosR-lacZ* en células de la cepa salvaje cultivadas en presencia de NO₃⁻ no se observó en las células de una mutante *napA* que no reduce el NO₃⁻. Sin embargo, los resultados de la Figura 5.2.3A sugieren que cualquiera de los NO_x deriva de NO₃⁻ reducción (NO₂⁻, NO o N₂O) no son inductores de la expresión de *nosR-lacZ*. Además, no se requiere NO para la inducción de *nosR-lacZ*, ya que los niveles de expresión de *nosR* presentes en células parentales se observaron en una cepa mutante *nirK*, que no reduce el NO₂⁻ a NO. Del mismo modo que encontramos en este trabajo, estudios previos sugirieron que N₂O es un inductor débil de los genes *nosZ* en varias bacterias (Kroneck et al., 1989; Richardson et al., 1991 y Sabaty et al., 1999). En conjunto, estas observaciones sugieren un efecto muy leve de los NO_x en la expresión de los genes *nos*. Por lo tanto, podría ser posible que un cambio en el estado redox celular derivado de la reducción de NO₃⁻ por Nap esté involucrado en la inducción de *nosR-lacZ*. De hecho, propios resultados previos demostraron la participación de la proteína reguladora sensible a redox RegR de *B. diazoefficiens*, en la expresión de los genes *nos* (Torres et al., 2014). Alternativamente, el sistema NasST podría estar

involucrado en la respuesta de la expresión de los genes *nos* mediada por NO_3^- (Sánchez et al., 2014).

La inducción microóxica de los genes *nosRZDFYLX*, así como la expresión de *NosZ* en *B. diazoefficiens* depende de *FixK₂*, pero no de *NnrR*. La dependencia de la transcripción de *nosRZDFYLX* por *FixK₂* se demostró por experimentos de transcripción IVT llevadas a cabo con la proteína purificada en condiciones óxicas, en colaboración con la RNAP de *B. diazoefficiens*. Del mismo modo, la inducción microóxica de los genes *napEDABCB* de *B. diazoefficiens* depende de *FixK₂*, pero no de *NnrR*, probablemente debido a su expresión independiente de NO_x (Bueno et al., 2017). De hecho, *FixK₂* también activa la transcripción de los *napEDABC* genes (Bueno et al., 2017).

En contraste con nuestros resultados, el NO se ha propuesto como la señal que regula al alza los promotores *nosR*, *nosZ* y *nosD* en *P. aeruginosa*, *P. stutzeri* y *P. denitrificans* (revisado por Zumft y Kroneck, 2007). En *R. sphaeroides* IL106 la expresión de *nosZ* depende de uno de los productos de reducción de NO_3^- , lo que sugiere también al NO como la molécula señal (Sabaty et al., 1999). Además, el análisis global de la expresión génica llevado a cabo en *E. meliloti* mostró una inducción de los genes *nos* en respuesta a NO (Meilhoc et al., 2010). La inducción dependiente de NO de los genes *nos* de *P. aeruginosa*, *P. stutzeri* o *P. denitrificans* se procesa a través de las proteínas reguladoras DNR / *DnrD* / NNR, respectivamente (van Spanning et al., 1999; Vollack y Zumft, 2001 y Arai et al., 2013). Mientras que DNR de *P. aeruginosa* está bajo el control de ANR, proteína que detecta la baja tensión de O_2 (Trunk et al., 2010), la transcripción de *dnrD* de *P. stutzeri* se activa en células cultivadas bajo condiciones de limitación de O_2 , siendo particularmente fuerte en condiciones desnitrificantes, pero no bajo el control del *FnrA*, detector de bajo O_2 (Vollack et al., 1999). Un caso particular encontramos en *P. denitrificans*, donde la reducción de N_2O se somete a una regulación robusta por *FnrP* y NNR en respuesta a bajo nivel de oxígeno (a través de *FnrP*) o NO (a través de NNR) (Bergaust et al., 2012).

La reducción de la inducción de la expresión de *nosR* observada en células mutantes en el gen *nnrR* cultivadas con NO_3^- también se ha descrito anteriormente para la expresión de los genes *napEDABC* (Bueno et al., 2017), podría ser una

consecuencia de una mayor capacidad para acumular NO por la cepa mutante *nnrR* en comparación con la cepa salvaje (Bueno et al., 2017). En apoyo de esta hipótesis, cuando el NO se eliminó por la adición de cPTIO, un secuestrador de NO, en cultivos de células mutantes *nnrR* con NO₃⁻, la expresión de *nosR-lacZ*, así como la actividad N₂OR se restauró a niveles de cepa salvaje. Podría ser posible que el centro catalítico de NosZ, Cu_z, el cual permanece en un estado redox-inerte, estado paramagnético Cu_z* (Wunsch y Zumft, 2005), se inactive en presencia de NO acumulado en la mutante *nnrR* (Dell'Acqua et al., 2011). Sin embargo, el mecanismo preciso involucrado en la inactivación de NosZ por NO es aún desconocido.

Este trabajo realizado con el rizobio modelo para el estudio de la desnitrificación, *B. diazoefficiens*, amplía la comprensión de los factores ambientales y reguladores involucrados en la reducción de N₂O, el paso clave que mitiga las emisiones de N₂O. Esperamos que nuestros resultados ayuden a establecer planes de acción para el desarrollo de estrategias prácticas para la mitigación de las emisiones de N₂O de los cultivos de leguminosas.

Estudio del mecanismo molecular de la proteína reguladora NnrR de *Bradyrhizobium diazoefficiens*: Influencia del hemo en la detección de NO

Debido a que la estructura de la proteína NnrR no ha sido aún resuelta, se decidió realizar varias predicciones bioinformáticas para conocer su posible estructura secundaria, terciaria y cuaternaria. La estructura secundaria, basada en la secuencia aminoacídica, confirma que la proteína consta de los cuatro dominios típicos que aparecen en todas las proteínas tipo CRP/FNR (Körner et al., 2013). Además, se pudo obtener un buen modelo de estructura terciaria y cuaternaria basándose en la estructura resuelta de la proteína DNR de *P. aeruginosa*, cristalizada por Giardina y colaboradores en 2008. El modelo muestra a NnrR como un homodímero, cuyos monómeros interactúan entre sí por una gran hélice α de dimerización. Al igual que en la proteína FixK₂, ambos monómeros presentan un giro pronunciado de sus estructuras, entre la hélice de dimerización y el dominio de interacción con la ARN polimerasa (Figura 5.3.2A), pero con la diferencia de que este giro, en la proteína NnrR, provoca un entrelazado entre ambos monómeros del mismo modo que en la proteína DNR (Giardina et al., 2008). Este entrelazado entre los dos monómeros no aparece en la estructura de FixK₂, resuelta por Bonnet y

colaboradores en 2013 (Figura 2.7). Por otro lado, en la proteína DNR se observa la presencia de un bolsillo hidrofóbico en el extremo N-terminal, en cuya formación intervienen dos residuos de histidina (His13 e His14; Giardina et al., 2008). Por analogía en la predicción de la estructura de NnrR, también se puede distinguir una zona hidrofóbica (Figura 5.3.2.B) en la parte amino terminal, en la cual intervienen los residuos de histidina 11 y 56.

Datos publicados anteriormente en Bueno et al., 2017, muestran que tanto el nitrato, nitrito o el NO, son necesarios para la máxima inducción de los genes *norCBQD*, sin embargo, en cepas mutantes en el gen *napA* (Nitrato reductasa periplásmica) o *nirK* (Nitrito reductasa) crecidas en presencia de NO₃⁻ o NO₂⁻, respectivamente, no se induce la expresión de *norC*. Esos resultados avalan los datos obtenidos en esta tesis que señalan al NO como la molécula que ejerce esa inducción directamente, ya que cuando se retira del medio, esa inducción de expresión se reduce. La inducción por nitrato y nitrito se explicaría por la formación de NO que tiene lugar a partir de ambos NO_x durante el proceso de desnitrificación.

En las cepas mutantes *fixK2* y *nnrR*, la inducción de los genes *nor* no tiene lugar en ninguna de ellas, ni en ausencia ni presencia de NO, por lo que para discernir cuál de las dos proteínas reguladoras, FixK₂ o NnrR, regula la activación de los genes *norCBQD*, se complementaron ambas cepas mutantes con el gen *nnrR in trans*. La expresión de los genes *nor* se restauró en ambas cepas complementadas, incluso hasta niveles más altos que la parental, lo que puede ser explicado debido a que el número de copias del gen *nnrR* en las cepas complementadas es más alto que en la parental, ya que se inserta en un plásmido de alto número de copias. Estos datos indican que NnrR está implicada en la activación de los genes *norCBQD* de manera independiente a FixK₂, lo cual está de acuerdo con resultados obtenidos anteriormente en Bueno et al., 2017, donde se demuestra la interacción entre NnrR y el promotor de los genes *norCBQD*. Además, la disminución de expresión de los genes *nor* en la mutante *fixK2* es lógica, ya que NnrR se encuentra jerárquicamente por debajo en la cascada regulatoria, y su expresión está directamente controlada por FixK₂ (apartado 5.1.5), por lo que en una mutante *fixK2* no está presente la proteína NnrR.

Para el estudio del mecanismo molecular de la proteína NnrR se realizaron ensayos tanto *in vivo* como *in vitro*. Entre los reguladores CRP/FNR conocidos que detectan cambios redox, los únicos cofactores que se han identificados son, por un lado, grupos Fe-S, como es el caso de la proteína FNR y ANR, las cuales detectan oxígeno en *E. coli* y *P. aeruginosa* (Körner et al., 2003), y por otro lado el grupo hemo, presente en CoxA, proteína que detecta CO (Lanzilotta et al., 2000), en DNR de *P. aeruginosa* (Giardina et al., 2008) y en DnrF de *D. shibae* (Ebert et al., 2017). En la proteína NnrR la presencia de un grupo Fe-S como cofactor está excluida ya que no posee ningún residuo de cisteína en la secuencia aminoacídica completa, necesario para la formación de un enlace con un grupo Fe-S. Por ello se propone la hipótesis de que NnrR pueda consistir en una proteína que contiene hemo como cofactor.

En primer lugar, para determinar si la molécula de hemo es un posible cofactor de NnrR, se analizó, en experimentos *in vivo*, la expresión de una fusión *norC-lacZ* introducida en una cepa mutante *hemN₂*, gen necesario en *B. diazoefficiens* para la síntesis de hemo, ya que codifica la proteína HemN₂ que cataliza la conversión de protoporfirinógeno III a protoporfirinógeno IX (hemo), bajo condiciones de anoxia. En esta cepa mutante no se produce la inducción de los genes *norCBQD* en respuesta a NO. Ya que, como anteriormente se ha demostrado, NnrR controla estos genes independientemente del regulador FixK₂, la bajada de inducción observada en la mutante *hemN₂* indicaría una disfuncionalidad de la proteína NnrR. Sin embargo, al añadir hemo al medio, de forma exógena, se vuelve a recuperar la actividad de NnrR, ya que se vuelve a observar la inducción del promotor de *norC* en respuesta a NO, demostrándose así que NnrR requiere de hemo para poder detectar la presencia de NO y activar la transcripción de sus genes dianas. Esta deficiencia de actividad de la proteína NnrR cuando carece de hemo apoya la observación realizada por Fischer y colaboradores (2001) de que la mutación del gen *hemN₂* afecta a la eficiencia simbiótica y a la capacidad de crecer de *B. diazoefficiens* en condiciones desnitrificantes.

Cuando se analiza las actividades NR y NiR de esa cepa mutante, podemos verificar que es incapaz de sintetizar hemo, ya que carece de actividad NR, pero no de NiR. Este comportamiento se explica ya que, tanto la subunidad NapC como la NapB, de la nitrato reductasa respiratoria de *B. diazoefficiens*, requieren de grupos

hemo para su actividad, mientras que la enzima Nir respiratoria es de tipo NirK, y por tanto contiene como cofactor cobre, por lo que no requiere de hemo para su actividad, y por ello la actividad de Nir no se ve afectada en esta mutante. De hecho, el análisis de los citocromos *c* de membranas, aisladas de la mutante *hemN₂* cultivada en condiciones desnitrificantes, reveló la ausencia en las mismas de un citocromo de 25 kDa correspondiente a NapC (Fischer et al., 2001; Delgado et al., 2003).

Por otro lado, los ensayos *in vitro* de unión de hemo a NnrR mostraron una estequiometría de unión de 1:1 (monómero NnrR:hemo), de la misma manera que se observa en la proteína DNR (Giardina et al., 2008), cuando se analiza la titulación con hemo de proteína NnrR, ya que se observa una gráfica que alcanza un plató a una concentración de hemo igual a la concentración de proteína titulada. La reconstitución con hemo también indica una unión entre NnrR y hemo, ya que las propiedades espectrales tanto de la forma oxidada (férrica) del hemo como la reducida (ferrosa) se ajustan a una unión entre hemo y proteína, cambiando el pico de 411 nm a 427, respectivamente. Además, la forma NnrR-hemo ferrosa es capaz de unir NO, de igual manera a lo observado tanto en DNR como en DnrF. (Giardina et al., 2008; Ebert et al., 2017).

Determinantes moleculares implicados en la interacción diferencial de las proteínas FixK₂ y NnrR con ADN

Con el objeto de investigar los determinantes moleculares implicados en la interacción diferencial de las proteínas FixK₂ y NnrR con ADN se realizó un estudio comparativo de alineamiento de las cajas tipo FixK₂ presentes en 23 promotores, de los cuales 18 estaban activados directamente por FixK₂, entre ellos se encuentra la caja FixK₂ de los genes *fixNOQP* que se considera prototipo de la proteína FixK₂ (Mesa et al., 2005), y 5 promotores no eran directamente activados, resultados conocidos por ensayos previos de IVT, entre esos 5 se encuentra el de los genes *norCBQD* (Caja NnrR) ya que hasta el momento es la única diana directa conocida de la proteína NnrR (Bueno et al., 2017), a partir de experimentos de CIT. El análisis indicó que la principal diferencia entre ellos se encontraba en el nucleótido de la posición 11 de la caja. Además, estudios llevados a cabo *in silico* con las proteínas FixKf, homólogo de FixK₂ y NnrR de *R. etli* muestran una interacción diferencial de ambas proteínas con las cajas. De tal manera que FixKf interacciona con el

nucleótido 12 de la caja a través de un residuo de glutamato con un enlace de hidrógeno. Sin embargo, dicho enlace desaparece por la presencia de un residuo de histidina que posee NnrR en el dominio de unión a ADN, lo cual provoca que se genere una interacción hidrofóbica con el nucleótido de la posición 11 de la caja. (Zamorano-Sánchez y Girard, 2015). Tanto FixK₂ como NnrR de *B. diazoefficiens* poseen el mismo motivo de unión a ADN, EXXSR y HTVSR, presente en FixKf y NnrR, de *R. etli*, respectivamente.

A parte del estudio de la posición 11, también se analiza el efecto de la posición 4 ó 10 de la caja FixK₂ y la posición 4 de la caja NnrR, con el objetivo de analizar la influencia de la palindromía de la caja, ya que este tipo de cajas son reconocidas por proteínas homodiméricas, por lo que ambos monómeros reconocen un extremo de la caja, por ello su estructura palindrómica.

El estudio del efecto de las mutaciones mencionadas se realizó tanto a nivel *in vitro*, por RPS y IVT, como *in vivo*, a través del análisis de la expresión de una fusión *fixN* o *norC* con el gen reportero *lacZ*, mediante actividad β-galactosidasa.

Los resultados de PRS muestran que la proteína FixK₂ interacciona de forma específica con la caja parental FixK₂ presente en el promotor de *fixNOQP*, de manera que se pueden calcular constantes de asociación, disociación y de afinidad de acuerdo a un modelo cinético de interacción de proteína dimérica por molécula de ADN. Mientras, que para el caso de la caja NnrR, la proteína FixK₂ es incapaz de interaccionar ni incluso a altas concentraciones, lo que no permite calcular constantes ni por modelo cinético, ni por afinidad. Ambos resultados son esperables, ya que la caja FixK₂ de *fixNOQP* se sabe que su transcripción es activada *in vitro* por FixK₂ (Mesa et al., 2005), mientras que a partir de la caja NnrR de los genes *norCBQD*, FixK₂ no genera transcrito específico (Bueno et al., 2017). Los resultados obtenidos de la mutación de ambas cajas en posición 11, ya revelan una implicación de ese nucleótido en la interacción, ya que en el caso de la caja FixK₂ disminuye la KD un rango de magnitud, y para el caso de la caja NnrR se observa interacción por parte de FixK₂, y se pueden calcular constantes, a diferencia de lo que ocurre con la caja parental NnrR, donde no hay unión. Para el estudio de la palindromía se muta la posición 10 además de la 11 en la caja FixK₂ y la posición 4 junto a la 11 en la caja NnrR. En ambos casos no se observan cambios considerables con respecto a la

mutación sólo en la posición 11, por lo que no se considera la palindromía un requisito indispensable en la unión de FixK₂.

Los datos obtenidos en los ensayos de IVT para la mutación de la posición 11 de ambas cajas provoca un empeoramiento de la transcripción por FixK₂ de la caja FixK₂, lo que confirma los resultados mostrados por RPS, sin embargo, en el caso de la caja NnrR, se comienza a observar transcripción cuando se muta, además del nucleótido 11, el 4. Las mutaciones en posición 4 + 11 y 10 + 11 en la caja FixK₂ da lugar a un transcrito mucho menos visible que para el caso de la mutación 11 sola.

Los estudios *in vivo* corroboran los resultados obtenidos *in vitro*, ya que la expresión de una fusión *fixN-lacZ* con la mutación en posición 11 fue 4 veces menor que la de la fusión parental, cuando se cultivan las células a 0,5% de O₂ mantenido, las mutaciones 4 y 10 además de la 11 dio lugar a expresiones basales, de igual manera que ocurrió con esos derivados en IVT. Las condiciones de cultivo (0,5% O₂) son las necesarias para la máxima inducción de los genes *fixNOQP* (Bueno et al., 2017). Sin embargo, las condiciones de cultivo para la máxima inducción de los genes *norCBQD* son 2% O₂ con nitrato (Bueno et al., 2017), en esas condiciones la cepa con la caja NnrR mutada en posición 4 + 11 presentó menos actividad β-galactosidasa que la parental, lo que corrobora de nuevo los resultados *in vitro*. Cuando se analiza la misma cepa en condiciones de 0,5% de O₂ se puede observar un aumento de expresión *norC-lacZ* de casi el doble con respecto a la parental. Estos resultados sugieren que FixK₂ está activando los genes *norCBQD* cuando se encuentra la caja NnrR mutada en la posición 4 + 11 y las condiciones son de 0,5% de O₂. Sin embargo, en condiciones de 2% de O₂ con nitrato es NnrR la que funciona y está interaccionando de peor manera con la caja mutada, de ahí la disminución de expresión de los genes *norCBQD*.

Con estos resultados se puede concluir que la posición 11 de la caja tipo FixK₂ está implicada en la discriminación de las proteínas FixK₂ y NnrR para interaccionar con su ADN diana. Pero no debe ser el único determinante molecular de la discriminación de secuencias, ya que no se pierde completamente la interacción cuando está mutada la caja FixK₂, ni tampoco se recupera totalmente la interacción con la caja NnrR. Hay que seguir profundizando en el estudio de otros determinantes

moleculares y posiciones de la caja que puedan estar también implicadas en la especificidad de la unión entre proteínas reguladoras y promotores.

7



CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. El regulón de la proteína NnrR de *Bradyrhizobium diazoefficiens* determinado en condiciones desnitrificantes está constituido por 175 genes, entre los que se encuentran genes estructurales (*nirK*, *norCBQD*, *nosRZDFYLX*), genes accesorios (*cycA*, *cy2* y *hemN₁₊₂*) y genes reguladores (*rpoN₁*).
2. Los factores transcripcionales NnrR y FixK₂ son necesarios para la inducción de *cycA* en respuesta a anoxia y nitrato.
3. El citocromo soluble CycA está implicado en la actividad de la óxido nítrico reductasa, por lo que podría actuar como intermediario en la transferencia de electrones a esta enzima.
4. Los genes *nosRZDFYLX* constituyen una unidad transcripcional policistrónica con dos inicios de la transcripción.
5. La proteína FixK₂ es el regulador clave que regula la expresión del operón *nosRZDFYLX* en respuesta a microoxia.
6. Los genes *cycA*, *nnrR*, *nnrS* y *nosRZDFYLX* son dianas directas de FixK₂.
7. NnrR activa la expresión de los genes *norCBQD* en respuesta a óxido nítrico (NO) de forma independiente a FixK₂.
8. Se propone al grupo hemo como cofactor de NnrR, siendo el complejo NnrR-hemo ferroso el responsable de la unión a NO *in vitro*.
9. El nucleótido 11 de las cajas FixK₂ y NnrR es el determinante principal implicado en la interacción diferencial de estas proteínas con sus respectivas dianas.

1. The *Bradyrhizobium diazoefficiens* NnrR regulon in anoxic denitrifying conditions comprises 175 genes, including *nirK*, *norCBQD*, *nosRZDFYLX*, accessory genes for denitrification (*cycA*, *cy2* y *hemN₁₊₂*), and genes encoding regulatory factors (*rpoN₁*).
2. NnrR and FixK₂ are both required for the induction of *cycA* in response to anoxia and nitrate.
3. The soluble cytochrome CycA is involved in nitrous oxide reductase activity, probably acting as electron transfer intermediary for this enzyme.
4. The *nosRZDFYLX* gene cluster constitutes a single polycistronic transcriptional unit transcribed from two transcriptional start sites.
5. FixK₂ is the main regulator that controls the expression of the *nosRZDFYLX* genes in response to microoxia.
6. *cycA*, *nnrR*, *nnrS*, and *nosRZDFYLX* genes are direct targets for FixK₂.
7. NnrR activates *norCBQD* genes expression in response to nitric oxide (NO) in a FixK₂-independent manner.

8. Heme is likely the cofactor for NnrR, being the NnrR-ferrous heme complex the responsible for NO binding *in vitro*.
9. The nucleotide position eleven within the FixK₂ and NnrR boxes constitutes the main determinant in the differential control of FixK₂ and NnrR transcription factors of their target genes.

8

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Arai, H., Roh, J. H., Eraso, J. M., and Kaplan, S. (2013) Transcriptome response to nitrosative stress in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 111-118
- Bali, S., Palmer, D. J., Schroeder, S., Ferguson, S. J., and Warren, M. J. (2014) Recent advances in the biosynthesis of modified tetrapyrroles: the discovery of an alternative pathway for the formation of heme and heme d_1 . *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 2837-2863
- Barnett, M. J., Fisher, R. F., Jones, T., Komp, C., Abola, A. P., Barloy-Hubler, F., Bowser, L., Capela, D., Galibert, F., Gouzy, J., Gurjal, M., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R. W., Kahn, D., Kahn, M. L., Kalman, S., Keating, D. H., Palm, C., Peck, M. C., Surzycki, R., Wells, D. H., Yeh, K. C., Davis, R. W., Federspiel, N. A., and Long, S. R. (2001) Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 9883-9888
- Barrios, H., Fischer, H. M., Hennecke, H., and Morett, E. (1995) Overlapping promoters for two different RNA polymerase holoenzymes control *Bradyrhizobium japonicum* *nifA* expression. *J. Bacteriol.* **177**, 1760-1765
- Barros-Carvalho, G. A., Hungria, M., Lopes, F. M., and Van Sluys, M. A. (2019) Brazilian-adapted soybean *Bradyrhizobium* strains uncover IS elements with potential impact on biological nitrogen fixation. *FEMS Microbiol. Lett.*
- Bauer, E., Kaspar, T., Fischer, H. M., and Hennecke, H. (1998) Expression of the *fixR-nifA* operon in *Bradyrhizobium japonicum* depends on a new response regulator, RegR. *J. Bacteriol.* **180**, 3853-3863
- Beck, C., Marty, R., Klausli, S., Hennecke, H., and Gottfert, M. (1997) Dissection of the transcription machinery for housekeeping genes of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* **179**, 364-369
- Becker, A., Berges, H., Krol, E., Bruand, C., Ruberg, S., Capela, D., Lauber, E., Meilhoc, E., Ampe, F., de Bruijn, F. J., Fourment, J., Francez-Charlot, A., Kahn, D., Kuster, H., Liebe, C., Puhler, A., Weidner, S., and Batut, J. (2004) Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Mol. Plant Microbe Interact.* **17**, 292-303
- Bedmar, E. J., Bueno, E., Correa, D., Torres, M. J., Delgado, M. J., and Mesa, S. (2013) Ecology of denitrification in soils and plant-associated bacteria. *Beneficial plant-microbial interactions: Ecology and applications*, 164-182
- Bedmar, E. J., Robles, E. F., and Delgado, M. J. (2005) The complete denitrification pathway of the symbiotic, nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 141-144
- Bennett, S., Soriano Laguna, M., Bradley, J., Svistunenko, D., J. Richardson, D., Gates, A., and Le Brun, N. (2019) NosL is a dedicated copper chaperone for assembly of the Cu₂ center of nitrous oxide reductase. *Chem. Sci.* **10**, 4985-4993
- Bergaust, L., Mao, Y., Bakken, L. R., and Frostegård, Å. (2010) Denitrification response ratterns during the transition to anoxic respiration and posttranscriptional effects of suboptimal pH on Nitrogen Oxide Reductase in *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 6387-6396
- Bergaust, L., van Spanning, R. J. M., Frostegård, Å., and Bakken, L. R. (2012) Expression of nitrous oxide reductase in *Paracoccus denitrificans* is regulated by oxygen and nitric oxide through FnrP and NNR. *Microbiology* **158**, 826-834

- Berks, B. C., Ferguson, S. J., Moir, J. W., and Richardson, D. J. (1995) Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. *Biochim. Biophys. Acta* **1232**, 97-173
- Black, A., Hsu, P.-C. L., Hamonts, K. E., Clough, T. J., and Condrón, L. M. (2016) Influence of copper on expression of *nirS*, *norB* and *nosZ* and the transcription and activity of NIR, NOR and N₂OR in the denitrifying soil bacteria *Pseudomonas stutzeri*. *Microb. Biotechnol.* **9**, 381-388
- Blasco, F., Iobbi, C., Ratouchniak, J., Bonnefoy, V., and Chippaux, M. (1990) Nitrate reductases of *Escherichia coli*: sequence of the second nitrate reductase and comparison with that encoded by the *narGHJ* operon. *Mol. Gen. Genet.* **222**, 104-111
- Bobik, C., Meilhoc, E., and Batut, J. (2006) FixJ: a major regulator of the oxygen limitation response and late symbiotic functions of *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **188**, 4890-4902
- Bonnet, M., Stegmann, M., Maglica, Ž., Stiegeler, E., Weber-Ban, E., Hennecke, H., and Mesa, S. (2013) FixK₂, a key regulator in *Bradyrhizobium japonicum*, is a substrate for the protease ClpAP in vitro. *FEBS Lett.* **587**, 88-93
- Booger, F. C., van Verseveld, H. W., and Stouthamer, A. H. (1980) Electron transport to nitrous oxide in *Paracoccus denitrificans*. *FEBS Lett.* **113**, 279-284
- Bott, M., Thony-Meyer, L., Loferer, H., Rossbach, S., Tully, R. E., Keister, D., Appleby, C. A., and Hennecke, H. (1995) *Bradyrhizobium japonicum* cytochrome *c*₅₅₀ is required for nitrate respiration but not for symbiotic nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* **177**, 2214-2217
- Bouchal, P., Struharova, I., Budinska, E., Sedo, O., Vyhliadalova, T., Zdrahal, Z., van Spanning, R., and Kucera, I. (2010) Unraveling an FNR based regulatory circuit in *Paracoccus denitrificans* using a proteomics-based approach. *Biochim. Biophys. Acta* **1804**, 1350-1358
- Brennan, R. G., and Matthews, B. W. (1989) The helix-turn-helix DNA binding motif. *J. Biol. Chem.* **264**, 1903-1906
- Bricio, C., Alvarez, L., San Martín, M., Schurig-Briccio, L. A., Gennis, R. B., and Berenguer, J. (2014) A third subunit in ancestral cytochrome *c*-dependent nitric oxide reductases. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 4871-4878
- Bueno, E., Bedmar, E. J., Richardson, D. J., and Delgado, M. J. (2008) Role of *Bradyrhizobium japonicum* cytochrome *c*₅₅₀ in nitrite and nitrate respiration. *FEMS Microbiol. Lett.* **279**, 188-194
- Bueno, E., Gomez-Hernandez, N., Girard, L., Bedmar, E. J., and Delgado, M. J. (2005) Function of the *Rhizobium etli* CFN42 *nirK* gene in nitrite metabolism. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 162-163
- Bueno, E., Mania, D., Frostegard, A., Bedmar, E. J., Bakken, L. R., and Delgado, M. J. (2015) Anoxic growth of *Ensifer meliloti* 1021 by N₂O-reduction, a potential mitigation strategy. *Front. Microbiol.* **6**, 537
- Bueno, E., Mesa, S., Bedmar, E. J., Richardson, D. J., and Delgado, M. J. (2012) Bacterial adaptation of respiration from oxic to microoxic and anoxic conditions: redox control. *Antioxid. Redox Signal.* **16**, 819-852
- Bueno, E., Mesa, S., Sanchez, C., Bedmar, E. J., and Delgado, M. J. (2010) NifA is required for maximal expression of denitrification genes in *Bradyrhizobium japonicum*. *Environ. Microbiol.* **12**, 393-400

- Bueno, E., Robles, E. F., Torres, M. J., Krell, T., Bedmar, E. J., Delgado, M. J., and Mesa, S. (2017) Disparate response to microoxia and nitrogen oxides of the *Bradyrhizobium japonicum* *napEDABC*, *nirK* and *norCBQD* denitrification genes. *Nitric Oxide* **68**, 137-149
- Bueno, E., Sit, B., Waldor, M. K., and Cava, F. (2018) Anaerobic nitrate reduction divergently governs population expansion of the enteropathogen *Vibrio cholerae*. *Nat. Microbiol.* **3**, 1346-1353
- Buhler, D., Rossmann, R., Landolt, S., Balsiger, S., Fischer, H. M., and Hennecke, H. (2010) Disparate pathways for the biogenesis of cytochrome oxidases in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Biol. Chem.* **285**, 15704-15713
- Busby, S., and Ebricht, R. H. (1999) Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J. Mol. Biol.* **293**, 199-213
- Butland, G., Spiro, S., Watmough, N. J., and Richardson, D. J. (2001) Two conserved glutamates in the bacterial nitric oxide reductase are essential for activity but not assembly of the enzyme. *J. Bacteriol.* **183**, 189-199
- Cabrera, J. J., Salas, A., Torres, M. J., Bedmar, E. J., Richardson, D. J., Gates, A. J., and Delgado, M. J. (2016) An integrated biochemical system for nitrate assimilation and nitric oxide detoxification in *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochem. J.* **473**, 297-309
- Cabrera, J. J., Sanchez, C., Gates, A. J., Bedmar, E. J., Mesa, S., Richardson, D. J., and Delgado, M. J. (2011) The nitric oxide response in plant-associated endosymbiotic bacteria. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 1880-1885
- Canfield, D. E., Glazer, A. N., and Falkowski, P. G. (2010) The evolution and future of Earth's nitrogen cycle. *Science* **330**, 192-196
- Carreira, C., Mestre, O., Nunes, R. F., Moura, I., and Pauleta, S. R. (2018) Genomic organization, gene expression and activity profile of *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* denitrification enzymes. *PeerJ.* **6**, e5603
- Carreira, C., Pauleta, S. R., and Moura, I. (2017) The catalytic cycle of nitrous oxide reductase - The enzyme that catalyzes the last step of denitrification. *J. Inorg. Biochem.* **177**, 423-434
- Carrica Mdel, C., Fernandez, I., Marti, M. A., Paris, G., and Goldbaum, F. A. (2012) The NtrY/X two-component system of *Brucella* spp. acts as a redox sensor and regulates the expression of nitrogen respiration enzymes. *Mol. Microbiol.* **85**, 39-50
- Carrica Mdel, C., Fernandez, I., Sieira, R., Paris, G., and Goldbaum, F. A. (2013) The two-component systems PrrBA and NtrYX co-ordinately regulate the adaptation of *Brucella abortus* to an oxygen-limited environment. *Mol. Microbiol.* **88**, 222-233
- Castiglione, N., Rinaldo, S., Giardina, G., and Cutruzzolà, F. (2009) The transcription factor DNR from *Pseudomonas aeruginosa* specifically requires nitric oxide and haem for the activation of a target promoter in *Escherichia coli*. *Microbiology* **155**, 2838-2844
- Cava, F., Zafra, O., and Berenguer, J. (2008) A cytochrome *c* containing nitrate reductase plays a role in electron transport for denitrification in *Thermus thermophilus* without involvement of the *bc* respiratory complex. *Mol. Microbiol.* **70**, 507-518
- Chahlafi, Z., Alvarez, L., Cava, F., and Berenguer, J. (2018) The role of conserved proteins DrpA and DrpB in nitrate respiration of *Thermus thermophilus*. *Environ. Microbiol.* **20**, 3851-3861
- Chan, Y.-K., Barran, L., and Bromfield, E. (1989) Denitrification activity of phage types representative of two populations of indigenous *Rhizobium meliloti*. *Can. J. Microbiol.* **35**, 737-740

- Cheung, J., and Hendrickson, W. A. (2009) Structural analysis of ligand stimulation of the histidine kinase NarX. *Structure* **17**, 190-201
- Chhabra, S., and Spiro, S. (2015) Inefficient translation of nsrR constrains behaviour of the NsrR regulon in *Escherichia coli*. *Microbiology* **161**, 2029-2038
- Crack, J. C., and Le Brun, N. E. (2019) Mass spectrometric identification of [4Fe-4S] (NO)_x intermediates of nitric oxide sensing by regulatory iron-sulfur cluster proteins. *Chemistry* **25**, 3675-3684
- Crack, J. C., Munnoch, J., Dodd, E. L., Knowles, F., Al Bassam, M. M., Kamali, S., Holland, A. A., Cramer, S. P., Hamilton, C. J., Johnson, M. K., Thomson, A. J., Hutchings, M. I., and Le Brun, N. E. (2015) NsrR from *Streptomyces coelicolor* is a nitric oxide-sensing [4Fe-4S] cluster protein with a specialized regulatory function. *J. Biol. Chem.* **290**, 12689-12704
- Cuypers, H., Viebrock-Sambale, A., and Zumft, W. G. (1992) NosR, a membrane-bound regulatory component necessary for expression of nitrous oxide reductase in denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. *J. Bacteriol.* **174**, 5332-5339
- Daniel, R. M., and Appleby, C. A. (1972) Anaerobic-nitrate, symbiotic and aerobic growth of *Rhizobium japonicum*: effects on cytochrome P450, other haemoproteins, nitrate and nitrite reductases. *Biochim. Biophys. Acta* **275**, 347-354
- Daskalakis, V., Ohta, T., Kitagawa, T., and Varotsis, C. (2015) Structure and properties of the catalytic site of nitric oxide reductase at ambient temperature. *Biochim. Biophys. Acta* **1847**, 1240-1244
- D'Autréaux, B., Tucker, N. P., Dixon, R., and Spiro, S. (2005) A non-haem iron centre in the transcription factor NorR senses nitric oxide. *Nature* **437**, 769-772
- de Boer, A. P., van der Oost, J., Reijnders, W. N., Westerhoff, H. V., Stouthamer, A. H., and van Spanning, R. J. (1996) Mutational analysis of the nor gene cluster which encodes nitric oxide reductase from *Paracoccus denitrificans*. *Eur. J. Biochem.* **242**, 592-600
- Delamuta, J. R., Ribeiro, R. A., Ormeno-Orrillo, E., Melo, I. S., Martinez-Romero, E., and Hungria, M. (2013) Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**, 3342-3351
- Delgado, M. J., Bonnard, N., Tresierra-Ayala, A., Bedmar, E. J., and Muller, P. (2003) The *Bradyrhizobium japonicum* napEDABC genes encoding the periplasmic nitrate reductase are essential for nitrate respiration. *Microbiology* **149**, 3395-3403
- Delgado, M. J., Olivares, J., and Bedmar, E. J. (1989) Nitrate reductase activity of free-living and symbiotic uptake hydrogenase-positive and uptake hydrogenase-negative strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *Arch. Microbiol.* **151**, 166-170
- Dell'Acqua, S., Pauleta, S. R., Monzani, E., Pereira, A. S., Casella, L., Moura, J. J. G., and Moura, I. (2008) Electron transfer complex between nitrous oxide reductase and cytochrome c₅₅₂ from *Pseudomonas nautica*: Kinetic, nuclear magnetic resonance, and docking studies. *Biochemistry* **47**, 10852-10862
- Dell'Acqua, S., Pauleta, S. R., Moura, I., and Moura, J. J. (2011) The tetranuclear copper active site of nitrous oxide reductase: the CuZ center. *J. Biol. Inorg. Chem.* **16**, 183-194
- Desloover, J., Roobroeck, D., Heylen, K., Puig, S., Boeckx, P., Verstraete, W., and Boon, N. (2014) Pathway of nitrous oxide consumption in isolated *Pseudomonas stutzeri* strains under anoxic and oxic conditions. *Environ. Microbiol.* **16**, 3143-3152
- Downie, J. A. (2005) Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. *Curr. Biol.* **15**, R196-198

- Dufour, Y. S., Kiley, P. J., and Donohue, T. J. (2010) Reconstruction of the core and extended regulons of global transcription factors. *PLoS Genet.* **6**
- Robles, E. (2006) *Regulación por óxido de nitrógeno de los genes de la desnitrificación en Bradyrhizobium japonicum. Caracterización de la proteína NnrR*, Universidad de Granada
- Eady, R. R., Antonyuk, S. V., and Hasnain, S. S. (2016) Fresh insight to functioning of selected enzymes of the nitrogen cycle. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **31**, 103-112
- Ebert, M., Laass, S., Thurmer, A., Roselius, L., Eckweiler, D., Daniel, R., Hartig, E., and Jahn, D. (2017) FnrL and three Dnr regulators are used for the metabolic adaptation to low oxygen tension in *Dinoroseobacter shibae*. *Front. Microbiol.* **8**, 642
- Ebert, M., Schweyen, P., Broring, M., Laass, S., Hartig, E., and Jahn, D. (2017) Heme and nitric oxide binding by the transcriptional regulator DnrF from the marine bacterium *Dinoroseobacter shibae* increases napD promoter affinity. *J. Biol. Chem.* **292**, 15468-15480
- Ellis, M. J., Grossmann, J. G., Eady, R. R., and Hasnain, S. S. (2007) Genomic analysis reveals widespread occurrence of new classes of copper nitrite reductases. *J. Biol. Inorg. Chem.* **12**, 1119-1127
- Felgate, H., Giannopoulos, G., Sullivan, M. J., Gates, A. J., Clarke, T. A., Baggs, E., Rowley, G., and Richardson, D. J. (2012) The impact of copper, nitrate and carbon status on the emission of nitrous oxide by two species of bacteria with biochemically distinct denitrification pathways. *Environ. Microbiol.* **14**, 1788-1800
- Fernández, N., Cabrera, J. J., Salazar, S., Parejo, S., Rodríguez, M. C., Lindemann, A., Bonnet, M., Hennecke, H., Bedmar, E. J., and Mesa, S. (2016) Molecular determinants of negative regulation of the *Bradyrhizobium diazoefficiens* transcription factor FixK₂. in *Biological Nitrogen Fixation and Beneficial Plant-Microbe Interaction* (González-Andrés, F., and James, E. eds.), Springer International Publishing, Cham. pp 57-72
- Fernández, N., Cabrera, J. J., Varadarajan, A. R., Lutz, S., Ledermann, R., Roschitzki, B., Eberl, L., Bedmar, E. J., Fischer, H.-M., Pessi, G., Ahrens, C. H., and Mesa, S. (2019) An integrated systems approach unveils new aspects of microoxia-mediated regulation in *Bradyrhizobium diazoefficiens*. *Front. Microbiol.* **10**
- Figurski, D. H., and Helinski, D. R. (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 1648-1652
- Fischer, H. M. (1994) Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol. Rev.* **58**, 352-386
- Fischer, H. M., Velasco, L., Delgado, M. J., Bedmar, E. J., Scharen, S., Zingg, D., Gottfert, M., and Hennecke, H. (2001) One of two *hemN* genes in *Bradyrhizobium japonicum* is functional during anaerobic growth and in symbiosis. *J. Bacteriol.* **183**, 1300-1311
- Fujita, K., Hirasawa-Fujita, M., Brown, D. E., Obara, Y., Ijima, F., Kohzuma, T., and Dooley, D. M. (2012) Direct electron transfer from pseudoazurin to nitrous oxide reductase in catalytic N₂O reduction. *J. Inorg. Biochem.* **115**, 163-173
- Gaimster, H., Alston, M., Richardson, D. J., Gates, A. J., and Rowley, G. (2018) Transcriptional and environmental control of bacterial denitrification and N₂O emissions. *FEMS Microbiol. Lett.* **365**
- Galibert, F., Finan, T. M., Long, S. R., Pühler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M. J., Becker, A., Boistard, P., Bothe, G., Boutry, M., Bowser, L., Buhrmester, J., Cadieu, E., Capela, D., Chain, P., Cowie, A., Davis, R. W., Dréano, S., Federspiel, N. A., Fisher, R. F.,

- Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Golding, B., Gouzy, J., Gurjal, M., Hernandez-Lucas, I., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R. W., Jones, T., Kahn, D., Kahn, M. L., Kalman, S., Keating, D. H., Kiss, E., Komp, C., Lelaure, V., Masuy, D., Palm, C., Peck, M. C., Pohl, T. M., Portetelle, D., Purnelle, B., Ramsperger, U., Surzycki, R., Thébault, P., Vandenbol, M., Vorhölter, F.-J., Weidner, S., Wells, D. H., Wong, K., Yeh, K.-C., and Batut, J. (2001) The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293**, 668-672
- Garcia-Plazaola, J., Becerril, J., Arrese-Igor, C., Gonzalez-Murua, C., and Aparicio-Tejo, P. (1993) The contribution of *Rhizobium meliloti* to soil denitrification. *Plant Soil* **157**, 207-213
- Gardner, A. M., Gessner, C. R., and Gardner, P. R. (2003) Regulation of the nitric oxide reduction operon (*norRVW*) in *Escherichia coli*. Role of NorR and σ^{54} in the nitric oxide stress response. *J. Biol. Chem.* **278**, 10081-10086
- Giardina, G., Rinaldo, S., Johnson, K. A., Di Matteo, A., Brunori, M., and Cutruzzola, F. (2008) NO sensing in *Pseudomonas aeruginosa*: structure of the transcriptional regulator DNR. *J. Mol. Biol.* **378**, 1002-1015
- Gilles-Gonzalez, M. A., Gonzalez, G., Sousa, E. H., and Tuckerman, J. (2008) Oxygen-sensing histidine-protein kinases: assays of ligand binding and turnover of response-regulator substrates. *Methods Enzymol.* **437**, 173-189
- Girard, L., Brom, S., Davalos, A., Lopez, O., Soberon, M., and Romero, D. (2000) Differential regulation of *fixN*-reiterated genes in *Rhizobium etli* by a novel *fixL*-*fixK* cascade. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**, 1283-1292
- Goddard, A. D., Bali, S., Mavridou, D. A., Luque-Almagro, V. M., Gates, A. J., Dolores Roldan, M., Newstead, S., Richardson, D. J., and Ferguson, S. J. (2017) The *Paracoccus denitrificans* NarK-like nitrate and nitrite transporters-probing nitrate uptake and nitrate/nitrite exchange mechanisms. *Mol. Microbiol.* **103**, 117-133
- Goddard, A. D., Moir, J. W., Richardson, D. J., and Ferguson, S. J. (2008) Interdependence of two NarK domains in a fused nitrate/nitrite transporter. *Mol. Microbiol.* **70**, 667-681
- Gomez-Hernandez, N., Reyes-Gonzalez, A., Sanchez, C., Mora, Y., Delgado, M. J., and Girard, L. (2011) Regulation and symbiotic role of *nirK* and *norC* expression in *Rhizobium etli*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **24**, 233-245
- González, P., Rivas, M., and Moura, J. (2017) CHAPTER 3: Structure, function and mechanisms of respiratory nitrate reductases. in *Metalloenzymes in Denitrification: Applications and Environmental Impacts* (Isabel Moura, J. J. G. M., Sofia R Pauleta, Luisa B Maia ed.), The Royal Society of Chemistry. pp 39-58
- Gonzalez, P. J., Correia, C., Moura, I., Brondino, C. D., and Moura, J. J. (2006) Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction. *J. Inorg. Biochem.* **100**, 1015-1023
- González, P. J., Correia, C., Moura, I., Brondino, C. D., and Moura, J. J. G. (2006) Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction. *J. Inorg. Biochem.* **100**, 1015-1023
- Gottfert, M., Grob, P., and Hennecke, H. (1990) Proposed regulatory pathway encoded by the *nodV* and *nodW* genes, determinants of host specificity in *Bradyrhizobium japonicum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 2680-2684
- Granados, M., Gómez-Hernández, N., Mora, Y., Delgado, M., Romero, D., and Girard, L. (2007) Novel reiterated *Fnr*-type proteins control the production of the symbiotic terminal oxidase *cbb₃* in *Rhizobium etli* CFN42,

- Green, J., Scott, C., and Guest, J. R. (2001) Functional versatility in the CRP-FNR superfamily of transcription factors: FNR and FLP. *Adv. Microb. Physiol.* **44**, 1-34
- Hartig, E., Schiek, U., Vollack, K. U., and Zumft, W. G. (1999) Nitrate and nitrite control of respiratory nitrate reduction in denitrifying *Pseudomonas stutzeri* by a two-component regulatory system homologous to NarXL of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**, 3658-3665
- Hartsock, A., and Shapleigh, J. P. (2010) Identification, functional studies, and genomic comparisons of new members of the NnrR regulon in *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **192**, 903-911
- Hauser, F., Pessi, G., Friberg, M., Weber, C., Rusca, N., Lindemann, A., Fischer, H. M., and Hennecke, H. (2007) Dissection of the *Bradyrhizobium japonicum* NifA+ σ^{54} regulon, and identification of a ferredoxin gene (*fdxN*) for symbiotic nitrogen fixation. *Mol. Genet. Genomics* **278**, 255-271
- Heinze, S., Kornberger, P., Gratz, C., Schwarz, W. H., Zverlov, V. V., and Liebl, W. (2018) Transmating: conjugative transfer of a new broad host range expression vector to various *Bacillus* species using a single protocol. *BMC Microbiol.* **18**, 56
- Herridge, D. F., Peoples, M. B., and Boddey, R. M. (2008) Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil* **311**, 1-18
- Hidalgo-García, A., Torres, M., Salas, A., Bedmar, E., Girard, L., and Delgado, M. (2019) *Rhizobium etli* produces nitrous oxide by coupling the assimilatory and denitrification pathways,
- Hino, T., Matsumoto, Y., Nagano, S., Sugimoto, H., Fukumori, Y., Murata, T., Iwata, S., and Shiro, Y. (2010) Structural basis of biological N₂O generation by bacterial nitric oxide reductase. *Science* **330**, 1666-1670
- Hoffmann, T., Troup, B., Szabo, A., Hungerer, C., and Jahn, D. (1995) The anaerobic life of *Bacillus subtilis*: cloning of the genes encoding the respiratory nitrate reductase system. *FEMS Microbiol. Lett.* **131**, 219-225
- Holloway, P., McCormick, W., Watson, R. J., and Chan, Y. K. (1996) Identification and analysis of the dissimilatory nitrous oxide reduction genes, *nosRZDFY*, of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **178**, 1505-1514
- Honisch, U., and Zumft, W. G. (2003) Operon structure and regulation of the nos gene region of *Pseudomonas stutzeri*, encoding an ABC-Type ATPase for maturation of nitrous oxide reductase. *J. Bacteriol.* **185**, 1895-1902
- Horrell, S., Kekilli, D., Strange, R. W., and Hough, M. A. (2017) Recent structural insights into the function of copper nitrite reductases. *Metallomics* **9**, 1470-1482
- Hutchings, M. I., and Spiro, S. (2000) The nitric oxide regulated nor promoter of *Paracoccus denitrificans*. *Microbiology* **146**, 2635-2641
- Itoh, M., Matsuura, K., and Satoh, T. (1989) Involvement of cytochrome *bc₁* complex in the electron transfer pathway for N₂O reduction in a photodenitrifier, *Rhodobacter sphaeroides* f. s. *denitrificans*. *FEBS Lett.* **251**, 104-108
- J.J., C. (2017) *A coordinated pathway for nitrate assimilation and nitric oxide detoxification in Bradyrhizobium diazoefficiens*, University of Granada
- Jang, J., Ashida, N., Kai, A., Isobe, K., Nishizawa, T., Otsuka, S., Yokota, A., Senoo, K., and Ishii, S. (2018) Presence of Cu-Type (NirK) and *cd₁*-Type (NirS) Nitrite Reductase Genes in the Denitrifying Bacterium *Bradyrhizobium nitroreducens* sp. nov. *Microbes Environ.* **33**, 326-331

- Jetten, M. S., Niftrik, L., Strous, M., Kartal, B., Keltjens, J. T., and Op den Camp, H. J. (2009) Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **44**, 65-84
- Jordan, P. A., Thomson, A. J., Ralph, E. T., Guest, J. R., and Green, J. (1997) FNR is a direct oxygen sensor having a biphasic response curve. *FEBS Lett.* **416**, 349-352
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Iriguchi, M., Kawashima, K., Kohara, M., Matsumoto, M., Shimpo, S., Tsuruoka, H., Wada, T., Yamada, M., and Tabata, S. (2002) Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res.* **9**, 189-197
- Kits, K. D., Sedlacek, C. J., Lebedeva, E. V., Han, P., Bulaev, A., Pjevac, P., Daebeler, A., Romano, S., Albertsen, M., Stein, L. Y., Daims, H., and Wagner, M. (2017) Kinetic analysis of a complete nitrifier reveals an oligotrophic lifestyle. *Nature* **549**, 269-272
- Klink, A., Elsner, B., Strube, K., and Cramm, R. (2007) Characterization of the signaling domain of the NO-responsive regulator NorR from *Ralstonia eutropha* H16 by site-directed mutagenesis. *J. Bacteriol.* **189**, 2743-2749
- Körner, H., Sofia, H. J., and Zumft, W. G. (2003) Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 559-592
- Kovach, M. E., Phillips, R. W., Elzer, P. H., Roop, R. M., 2nd, and Peterson, K. M. (1994) pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* **16**, 800-802
- Kraft, B., Strous, M., and Tegetmeyer, H. E. (2011) Microbial nitrate respiration-genes, enzymes and environmental distribution. *J. Biotechnol.* **155**, 104-117
- Kroneck, P. M., Antholine, W. A., Riester, J., and Zumft, W. G. (1989) The nature of the cupric site in nitrous oxide reductase and of Cu_A in cytochrome *c* oxidase. *FEBS Lett.* **248**, 212-213
- Kullik, I., Fritsche, S., Knobel, H., Sanjuan, J., Hennecke, H., and Fischer, H. M. (1991) *Bradyrhizobium japonicum* has two differentially regulated, functional homologs of the sigma 54 gene (*rpoN*). *J. Bacteriol.* **173**, 1125-1138
- Lanzilotta, W. N., Schuller, D. J., Thorsteinsson, M. V., Kerby, R. L., Roberts, G. P., and Poulos, T. L. (2000) Structure of the CO sensing transcription activator CooA. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 876-880
- Lee, Y. Y., Shearer, N., and Spiro, S. (2006) Transcription factor NNR from *Paracoccus denitrificans* is a sensor of both nitric oxide and oxygen: isolation of *nnr** alleles encoding effector-independent proteins and evidence for a haem-based sensing mechanism. *Microbiology* **152**, 1461-1470
- Lindemann, A., Moser, A., Pessi, G., Hauser, F., Friberg, M., Hennecke, H., and Fischer, H. M. (2007) New target genes controlled by the *Bradyrhizobium japonicum* two-component regulatory system RegSR. *J. Bacteriol.* **189**, 8928-8943
- Liu, B., Frostegard, A., and Bakken, L. R. (2014) Impaired reduction of N₂O to N₂ in acid soils is due to a posttranscriptional interference with the expression of *nosZ*. *MBio* **5**, e01383-01314
- Liu, B., Morkved, P. T., Frostegard, A., and Bakken, L. R. (2010) Denitrification gene pools, transcription and kinetics of NO, N₂O and N₂ production as affected by soil pH. *FEMS Microbiol. Ecol.* **72**, 407-417
- Lobato, L., Bouzahir-Sima, L., Yamashita, T., Wilson, M. T., Vos, M. H., and Liebl, U. (2014) Dynamics of the heme-binding bacterial gas-sensing dissimilative nitrate respiration

- regulator (DNR) and activation barriers for ligand binding and escape. *J. Biol. Chem.* **289**, 26514-26524
- Mahinthichaichan, P., Gennis, R. B., and Tajkhorshid, E. (2018) Bacterial denitrifying nitric oxide reductases and aerobic respiratory terminal oxidases use similar delivery pathways for their molecular substrates. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **1859**, 712-724
- Martínez-Espinosa, Rosa M., Cole, Jeffrey A., Richardson, David J., and Watmough, Nicholas J. (2011) Enzymology and ecology of the nitrogen cycle. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 175-178
- Martinez-Espinosa, R. M., Dridge, E. J., Bonete, M. J., Butt, J. N., Butler, C. S., Sargent, F., and Richardson, D. J. (2007) Look on the positive side! The orientation, identification and bioenergetics of 'Archaeal' membrane-bound nitrate reductases. *FEMS Microbiol. Lett.* **276**, 129-139
- Masuda, S., Hennecke, H., and Fischer, H. M. (2017) Requirements for efficient thiosulfate oxidation in *Bradyrhizobium diazoefficiens*. *Genes (Basel)* **8**
- Matsubara, T., and Iwasaki, H. (1972) A new-type of copper-protein from *Alcaligenes faecalis*. *J. Biochem.* **71**, 747-750
- Matsumoto, Y., Tosha, T., Pislakov, A. V., Hino, T., Sugimoto, H., Nagano, S., Sugita, Y., and Shiro, Y. (2012) Crystal structure of quinol-dependent nitric oxide reductase from *Geobacillus stearothermophilus*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 238-245
- Meilhoc, E., Cam, Y., Skapski, A., and Bruand, C. (2010) The response to nitric oxide of the nitrogen-fixing symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **23**, 748-759
- Mesa, S., Bedmar, E. J., Chanfon, A., Hennecke, H., and Fischer, H. M. (2003) *Bradyrhizobium japonicum* NnrR, a denitrification regulator, expands the FixLJ-FixK₂ regulatory cascade. *J. Bacteriol.* **185**, 3978-3982
- Mesa, S., Hauser, F., Friberg, M., Malaguti, E., Fischer, H. M., and Hennecke, H. (2008) Comprehensive assessment of the regulons controlled by the FixLJ-FixK₂-FixK₁ cascade in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* **190**, 6568-6579
- Mesa, S., Hennecke, H., and Fischer, H. M. (2006) A multitude of CRP/FNR-like transcription proteins in *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 156-159
- Mesa, S., Reutimann, L., Fischer, H. M., and Hennecke, H. (2009) Posttranslational control of transcription factor FixK₂, a key regulator for the *Bradyrhizobium japonicum*-soybean symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 21860-21865
- Mesa, S., Ucurum, Z., Hennecke, H., and Fischer, H. M. (2005) Transcription activation *in vitro* by the *Bradyrhizobium japonicum* regulatory protein FixK₂. *J. Bacteriol.* **187**, 3329-3338
- Mesa, S., Velasco, L., Manzanera, M. E., Delgado, M. J., and Bedmar, E. J. (2002) Characterization of the *norCBQD* genes, encoding nitric oxide reductase, in the nitrogen fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Microbiology* **148**, 3553-3560
- Miller, J. H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Minchin, F., James, E., and Becana, M. (2008) Oxygen diffusion, production of reactive oxygen and nitrogen species, and antioxidants in legume nodules. in *Nitrogen-fixing leguminous symbioses*, Springer. pp 321-362

- Miyahara, M., Kim, S.-W., Fushinobu, S., Takaki, K., Yamada, T., Watanabe, A., Miyauchi, K., Endo, G., Wakagi, T., and Shoun, H. (2010) Potential of aerobic denitrification by *Pseudomonas stutzeri* TR2 to reduce nitrous oxide emissions from wastewater treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 4619-4625
- Moreno-Vivián, C., Cabello, P., Martínez-Luque, M., Blasco, R., and Castillo, F. (1999) Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. *J. Bacteriol.* **181**, 6573-6584
- Moreno-Vivián, C., and Flores, E. (2007) Chapter 17. Nitrate Assimilation in Bacteria. pp 263-282
- Mus, F., Colman, D. R., Peters, J. W., and Boyd, E. S. (2019) Geobiological feedbacks, oxygen, and the evolution of nitrogenase. *Free Radic. Biol. Med.*
- Nakano, M. M., Geng, H., Nakano, S., and Kobayashi, K. (2006) The nitric oxide-responsive regulator NsrR controls ResDE-dependent gene expression. *J. Bacteriol.* **188**, 5878-5887
- Nellen-Anthamatten, D., Rossi, P., Preisig, O., Kullik, I., Babst, M., Fischer, H. M., and Hennecke, H. (1998) *Bradyrhizobium japonicum* FixK₂, a crucial distributor in the FixLJ-dependent regulatory cascade for control of genes inducible by low oxygen levels. *J. Bacteriol.* **180**, 5251-5255
- Neupane, D. P., Jacquez, B., Sundararajan, A., Ramaraj, T., Schilkey, F. D., and Yukl, E. T. (2017) Zinc-dependent transcriptional regulation in *Paracoccus denitrificans*. *Front. Microbiol.* **8**, 569
- Newton, E., William. (2007) Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of Nitrogen Fixation. pp 109-129
- Nojiri, M. (2017) CHAPTER 5 Structure and function of copper nitrite reductase. in *Metalloenzymes in Denitrification: Applications and Environmental Impacts*, The Royal Society of Chemistry. pp 91-113
- Opperman, D. J., Murgida, D. H., Dalosto, S. D., Brondino, C. D., and Ferroni, F. M. (2019) A three-domain copper-nitrite reductase with a unique sensing loop. *IUCrJ* **6**, 248-258
- Pauleta, S. R., Carreira, C., and Moura, I. (2017) CHAPTER 7 Insights into nitrous oxide reductase. in *Metalloenzymes in Denitrification: Applications and Environmental Impacts*, The Royal Society of Chemistry. pp 141-169
- Pessi, G., Ahrens, C. H., Rehrauer, H., Lindemann, A., Hauser, F., Fischer, H. M., and Hennecke, H. (2007) Genome-wide transcript analysis of *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids in soybean root nodules. *Mol. Plant Microbe Interact.* **20**, 1353-1363
- Philippot, L., Clays-Josserand, A., Lensi, R., Trinsoutreau, I., Normand, P., and Potier, P. (1997) Purification of the dissimilative nitrate reductase of *Pseudomonas fluorescens* and the cloning and sequencing of its corresponding genes. *Biochim. Biophys. Acta* **1350**, 272-276
- Philippot, L., and Højberg, O. (1999) *Dissimilatory nitrate reductases in Bacteria*,
- Philippot, L., Mirleau, P., Mazurier, S., Siblot, S., Hartmann, A., Lemanceau, P., and Germon, J. C. (2001) Characterization and transcriptional analysis of *Pseudomonas fluorescens* denitrifying clusters containing the *nar*, *nir*, *nor* and *nos* genes. *Biochim. Biophys. Acta* **1517**, 436-440
- Pinchbeck, B. J., Soriano-Laguna, M. J., Sullivan, M. J., Luque-Almagro, V. M., Rowley, G., Ferguson, S. J., Roldan, M. D., Richardson, D. J., and Gates, A. J. (2019) A dual functional redox enzyme maturation protein for respiratory and assimilatory nitrate reductases in bacteria. *Mol. Microbiol.*

- Pisliakov, A. V., Hino, T., Shiro, Y., and Sugita, Y. (2012) Molecular dynamics simulations reveal proton transfer pathways in cytochrome *C*-dependent nitric oxide reductase. *PLoS Comput. Biol.* **8**, e1002674
- Pohlmann, A., Cramm, R., Schmelz, K., and Friedrich, B. (2000) A novel NO-responding regulator controls the reduction of nitric oxide in *Ralstonia eutropha*. *Mol. Microbiol.* **38**, 626-638
- Poole, P., Ramachandran, V., and Terpolilli, J. (2018) Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 291-303
- Potter, L., Angove, H., Richardson, D., and Cole, J. (2001) Nitrate reduction in the periplasm of gram-negative bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **45**, 51-112
- Prendergast-Miller, M. T., Baggs, E. M., and Johnson, D. (2011) Nitrous oxide production by the ectomycorrhizal fungi *Paxillus involutus* and *Tylospora fibrillosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **316**, 31-35
- Qu, Z., Bakken, L. R., Molstad, L., Frostegard, A., and Bergaust, L. L. (2016) Transcriptional and metabolic regulation of denitrification in *Paracoccus denitrificans* allows low but significant activity of nitrous oxide reductase under oxic conditions. *Environ. Microbiol.* **18**, 2951-2963
- Quelas, J. I., Mongiardini, E. J., Perez-Gimenez, J., Parisi, G., and Lodeiro, A. R. (2013) Analysis of two polyhydroxyalkanoate synthases in *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. *J. Bacteriol.* **195**, 3145-3155
- Ramirez-Arcos, S., Fernandez-Herrero, L. A., and Berenguer, J. (1998) A thermophilic nitrate reductase is responsible for the strain specific anaerobic growth of *Thermus thermophilus* HB8. *Biochim. Biophys. Acta* **1396**, 215-227
- Ramirez, S., Moreno, R., Zafra, O., Castan, P., Valles, C., and Berenguer, J. (2000) Two nitrate/nitrite transporters are encoded within the mobilizable plasmid for nitrate respiration of *Thermus thermophilus* HB8. *J. Bacteriol.* **182**, 2179-2183
- Rasmussen, T., Berks, B. C., Sanders-Loehr, J., Dooley, D. M., Zumft, W. G., and Thomson, A. J. (2000) The catalytic center in nitrous oxide reductase, Cu₂, is a copper-sulfide cluster. *Biochemistry* **39**, 12753-12756
- Regensburger, B., and Hennecke, H. (1983) RNA polymerase from *Rhizobium japonicum*. *Arch. Microbiol.* **135**, 103-109
- Reutimann, L., Mesa, S., and Hennecke, H. (2010) Autoregulation of *fixK₂* gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Genet. Genomics* **284**, 25-32
- Richardson, D. (2011) Redox complexes of the nitrogen cycle. in *Nitrogen cycling in bacteria*. pp 23-39
- Richardson, D., Felgate, H., Watmough, N., Thomson, A., and Baggs, E. (2009) Mitigating release of the potent greenhouse gas N₂O from the nitrogen cycle - could enzymic regulation hold the key? *Trends Biotechnol.* **27**, 388-397
- Richardson, D. J., Bell, L. C., McEwan, A. G., Jackson, J. B., and Ferguson, S. J. (1991) Cytochrome *c₂* is essential for electron transfer to nitrous oxide reductase from physiological substrates in *Rhodobacter capsulatus* and can act as an electron donor to the reductase *in vitro*. Correlation with photoinhibition studies. *Eur. J. Biochem.* **199**, 677-683
- Richardson, D. J., van Spanning, R. J. M., and Ferguson, S. J. (2007) Chapter 2 - The Prokaryotic Nitrate Reductases. in *Biology of the Nitrogen Cycle*, Elsevier, Amsterdam. pp 21-35

- Richardson, D. J., and Watmough, N. J. (1999) Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 207-219
- Rinaldo, S., Castiglione, N., Giardina, G., Caruso, M., Arcovito, A., Longa, S. D., D'Angelo, P., and Cutruzzola, F. (2012) Unusual heme binding properties of the dissimilative nitrate respiration regulator, a bacterial nitric oxide sensor. *Antioxid. Redox Signal* **17**, 1178-1189
- Rinaldo, S., Giardina, G., Mantoni, F., Paiardini, A., Paone, A., and Cutruzzolà, F. (2017) Discovering Selective Diguanylate Cyclase Inhibitors: From PleD to Discrimination of the Active Site of Cyclic-di-GMP Phosphodiesterases. in *c-di-GMP Signaling: Methods and Protocols* (Sauer, K. ed.), Springer New York, New York, NY. pp 431-453
- Robles, E. F., Sánchez, C., Bonnard, N., Delgado, M. J., and Bedmar, E. J. (2006) The *Bradyrhizobium japonicum* *napEDABC* genes are controlled by the FixLJ-FixK₂-NnrR regulatory cascade. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 108-110
- Rodionov, D. A., Dubchak, I. L., Arkin, A. P., Alm, E. J., and Gelfand, M. S. (2005) Dissimilatory metabolism of nitrogen oxides in bacteria: Comparative reconstruction of transcriptional networks. *PLoS Comput. Biol.* **1**, 415-431
- Rodriguez, R. L., and Tait, R. C. (1983) *Recombinant DNA Techniques: An Introduction*, Addison-Wesley
- Sabaty, M., Schwintner, C., Cahors, S., Richaud, P., and Vermeglio, A. (1999) Nitrite and nitrous oxide reductase regulation by nitrogen oxides in *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans* IL106. *J. Bacteriol.* **181**, 6028-6032
- Sambrook, J., and Russell, D. (2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Sameshima-Saito, R., Chiba, K., Hirayama, J., Itakura, M., Mitsui, H., Eda, S., and Minamisawa, K. (2006) Symbiotic *Bradyrhizobium japonicum* reduces N₂O surrounding the soybean root system via nitrous oxide reductase. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 2526-2532
- Sanchez, C., Itakura, M., Mitsui, H., and Minamisawa, K. (2013) Linked expressions of *nap* and *nos* genes in a *Bradyrhizobium japonicum* mutant with increased N₂O reductase activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 4178-4180
- Sanchez, C., Itakura, M., Okubo, T., Matsumoto, T., Yoshikawa, H., Gotoh, A., Hidaka, M., Uchida, T., and Minamisawa, K. (2014) The nitrate-sensing NasST system regulates nitrous oxide reductase and periplasmic nitrate reductase in *Bradyrhizobium japonicum*. *Environ. Microbiol.* **16**, 3263-3274
- Sánchez, C., Itakura, M., Okubo, T., Matsumoto, T., Yoshikawa, H., Gotoh, A., Hidaka, M., Uchida, T., and Minamisawa, K. (2014) The nitrate-sensing NasST system regulates nitrous oxide reductase and periplasmic nitrate reductase in *Bradyrhizobium japonicum*. *Environ. Microbiol.* **16**, 3263-3274
- Sanchez, C., and Minamisawa, K. (2018) Redundant roles of *Bradyrhizobium oligotrophicum* Cu-type (NirK) and *cd*₁-type (NirS) nitrite reductase genes under denitrifying conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* **365**
- Sanchez, C., Mitsui, H., and Minamisawa, K. (2017) Regulation of nitrous oxide reductase genes by NasT-mediated transcription antitermination in *Bradyrhizobium diazoefficiens*. *Environ. Microbiol. Rep.* **9**, 389-396
- Sander, R. (1999) *Compilation of Henry's Law Constants for Inorganic and Organic Species of Potential Importance in Environmental Chemistry*, Max-Planck Institute of Chemistry, Air Chemistry Department

- Sanford, R. A., Wagner, D. D., Wu, Q., Chee-Sanford, J. C., Thomas, S. H., Cruz-Garcia, C., Rodriguez, G., Massol-Deya, A., Krishnani, K. K., Ritalahti, K. M., Nissen, S., Konstantinidis, K. T., and Löffler, F. E. (2012) Unexpected nondenitrifier nitrous oxide reductase gene diversity and abundance in soils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 19709-19714
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., and Puhler, A. (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**, 69-73
- Schreiber, K., Krieger, R., Benkert, B., Eschbach, M., Arai, H., Schobert, M., and Jahn, D. (2007) The anaerobic regulatory network required for *Pseudomonas aeruginosa* nitrate respiration. *J. Bacteriol.* **189**, 4310-4314
- Sciotti, M. A., Chanfon, A., Hennecke, H., and Fischer, H. M. (2003) Disparate oxygen responsiveness of two regulatory cascades that control expression of symbiotic genes in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* **185**, 5639-5642
- Shapleigh, J. P. (2006) The denitrifying prokaryotes. in *Springer Science +Business Media. New York*. pp p. 769-792
- Shapleigh, James P. (2011) Oxygen control of nitrogen oxide respiration, focusing on α -proteobacteria. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 179-183
- Shiro, Y., Sugimoto, H., Toshi, T., Nagano, S., and Hino, T. (2012) Structural basis for nitrous oxide generation by bacterial nitric oxide reductases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **367**, 1195-1203
- Simon, J., Einsle, O., Kroneck, P. M. H., and Zumft, W. G. (2004) The unprecedented nos gene cluster of *Wolinella succinogenes* encodes a novel respiratory electron transfer pathway to cytochrome *c* nitrous oxide reductase. *FEBS Lett.* **569**, 7-12
- Simon, J., and Klotz, M. G. (2013) Diversity and evolution of bioenergetic systems involved in microbial nitrogen compound transformations. *Biochim. Biophys. Acta* **1827**, 114-135
- Simon, R., Priefer, U., and Pühler, A. (1983) Vector plasmids for *in-vivo* and *in-vitro* manipulations of gram-negative bacteria. pp 98-106
- Spiro, S. (2011) Nitric oxide metabolism: physiology and regulatory mechanisms. in *Nitrogen cycling in bacteria: molecular analysis* (Moir, J. W. B. ed.), Caister Academic Press, Norfolk. pp 177-196
- Spiro, S. (2012) Nitrous oxide production and consumption: regulation of gene expression by gas-sensitive transcription factors. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **367**, 1213-1225
- Spiro, S. (2017) CHAPTER 13 Regulation of denitrification. in *Metalloenzymes in Denitrification: Applications and Environmental Impacts*, The Royal Society of Chemistry. pp 312-330
- Spiro, S., and Guest, J. R. (1990) FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* **6**, 399-428
- Stevanin, T. M., Read, R. C., and Poole, R. K. (2007) The *hmp* gene encoding the NO-inducible flavohaemoglobin in *Escherichia coli* confers a protective advantage in resisting killing within macrophages, but not *in vitro*: links with swarming motility. *Gene* **398**, 62-68
- Stewart, V. (2003) Nitrate- and nitrite-responsive sensors NarX and NarQ of proteobacteria. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 1-10

- Stewart, V., and Bledsoe, P. J. (2005) Fnr-, NarP- and NarL-dependent regulation of transcription initiation from the *Haemophilus influenzae* Rd *napF* (periplasmic nitrate reductase) promoter in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **187**, 6928-6935
- Stewart, V., and Chen, L. L. (2010) The S helix mediates signal transmission as a HAMP domain coiled-coil extension in the NarX nitrate sensor from *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **192**, 734-745
- Strous, M., Kuenen, J. G., and Jetten, M. S. (1999) Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3248-3250
- Suharti de Vries, S., and Pouvreau, L. A. M. (2007) Chapter 4 - Nitric Oxide Reductase: Structural Variations and Catalytic Mechanism A2 - Bothe, Hermann. in *Biology of the Nitrogen Cycle* (Ferguson, S. J., and Newton, W. E. eds.), Elsevier, Amsterdam. pp 57-66
- Suliman, S., and Tran, L.-S. P. (2014) Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules: metabolism and regulatory mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 19389-19393
- Sullivan, M. J., Gates, A. J., Appia-Ayme, C., Rowley, G., and Richardson, D. J. (2013) Copper control of bacterial nitrous oxide emission and its impact on vitamin B₁₂-dependent metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 19926-19931
- Sutton, V. R., Mettert, E. L., Beinert, H., and Kiley, P. J. (2004) Kinetic analysis of the oxidative conversion of the [4Fe-4S]²⁺ cluster of FNR to a [2Fe-2S]²⁺ Cluster. *J. Bacteriol.* **186**, 8018-8025
- Takaya, N. (2002) Dissimilatory nitrate reduction metabolisms and their control in fungi. *J. Biosci. Bioeng.* **94**, 506-510
- Thomson, A. J., Giannopoulos, G., Pretty, J., Baggs, E. M., and Richardson, D. J. (2012) Biological sources and sinks of nitrous oxide and strategies to mitigate emissions. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **367**, 1157-1168
- Toledo, J. C., Jr., and Augusto, O. (2012) Connecting the chemical and biological properties of nitric oxide. *Chem. Res. Toxicol.* **25**, 975-989
- Torres, M. J., Argandona, M., Vargas, C., Bedmar, E. J., Fischer, H. M., Mesa, S., and Delgado, M. J. (2014) The global response regulator RegR controls expression of denitrification genes in *Bradyrhizobium japonicum*. *PLoS One* **9**, e99011
- Torres, M. J., Avila, S., Bedmar, E. J., and Delgado, M. J. (2018) Overexpression of the periplasmic nitrate reductase supports anaerobic growth by *Ensifer meliloti*. *FEMS Microbiol. Lett.* **365**
- Torres, M. J., Bueno, E., Jimenez-Leiva, A., Cabrera, J. J., Bedmar, E. J., Mesa, S., and Delgado, M. J. (2017) FixK₂ is the main transcriptional activator of *Bradyrhizobium diazoefficiens* *nosRZDYFLX* genes in response to low oxygen. *Front. Microbiol.* **8**, 1621
- Torres, M. J., Bueno, E., Mesa, S., Bedmar, E. J., and Delgado, M. J. (2011) Emerging complexity in the denitrification regulatory network of *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 284-288
- Torres, M. J., Rubia, M. I., Bedmar, E. J., and Delgado, M. J. (2011) Denitrification in *Sinorhizobium meliloti*. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 1886-1889
- Torres, M. J., Rubia, M. I., de la Peña, T. C., Pueyo, J. J., Bedmar, E. J., and Delgado, M. J. (2014) Genetic basis for denitrification in *Ensifer meliloti*. *BMC Microbiol.* **14**, 142
- Torres, M. J., Simon, J., Rowley, G., Bedmar, E. J., Richardson, D. J., Gates, A. J., and Delgado, M. J. (2016) Nitrous oxide metabolism in nitrate-reducing bacteria: Physiology and regulatory mechanisms. *Adv. Microb. Physiol.* **68**, 353-432

- Tortosa, G., Hidalgo, A., Salas, A., Bedmar, E. J., Mesa, S., and Delgado, M. J. (2015) Nitrate and flooding induce N₂O emissions from soybean nodules. *Symbiosis* **67**, 125-133
- Tosha, T., and Shiro, Y. (2017) CHAPTER 6 Structure and Function of Nitric Oxide Reductases. in *Metalloenzymes in Denitrification: Applications and Environmental Impacts*, The Royal Society of Chemistry. pp 114-140
- Tosques, I. E., Shi, J., and Shapleigh, J. P. (1996) Cloning and characterization of *nnrR*, whose product is required for the expression of proteins involved in nitric oxide metabolism in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3. *J. Bacteriol.* **178**, 4958-4964
- Treusch, A. H., Leininger, S., Kletzin, A., Schuster, S. C., Klenk, H. P., and Schleper, C. (2005) Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environ. Microbiol.* **7**, 1985-1995
- Trunk, K., Benkert, B., Quack, N., Munch, R., Scheer, M., Garbe, J., Jansch, L., Trost, M., Wehland, J., Buer, J., Jahn, M., Schobert, M., and Jahn, D. (2010) Anaerobic adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: definition of the Anr and Dnr regulons. *Environ. Microbiol.* **12**, 1719-1733
- Tucker, N. P., D'Autreaux, B., Yousafzai, F. K., Fairhurst, S. A., Spiro, S., and Dixon, R. (2008) Analysis of the nitric oxide-sensing non-heme iron center in the NorR regulatory protein. *J. Biol. Chem.* **283**, 908-918
- Udvardi, M., and Poole, P. S. (2013) Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annu. Rev. Plant Biol.* **64**, 781-805
- Van Spanning, R. J. (2011) *Structure, function, regulation and evolution of the nitrite and nitrous oxide reductase: Denitrification enzymes with a b-propeller fold*, Caister Academic Press, Norfolk UK
- Van Spanning, R. J., De Boer, A. P., Reijnders, W. N., Spiro, S., Westerhoff, H. V., Stouthamer, A. H., and Van der Oost, J. (1995) Nitrite and nitric oxide reduction in *Paracoccus denitrificans* is under the control of NNR, a regulatory protein that belongs to the FNR family of transcriptional activators. *FEBS Lett.* **360**, 151-154
- Van Spanning, R. J., Houben, E., Reijnders, W. N., Spiro, S., Westerhoff, H. V., and Saunders, N. (1999) Nitric oxide is a signal for NNR-mediated transcription activation in *Paracoccus denitrificans*. *J. Bacteriol.* **181**, 4129-4132
- van Spanning, R. J. M. (2011) Structure, function, regulation and evolution of the nitrite and nitrous oxide reductases: Denitrification enzymes with a beta-propeller fold. in *Nitrogen Cycling in Bacteria*. pp 135-161
- van Spanning, R. J. M., Richardson, D. J., and Ferguson, S. J. (2007) Chapter 1 - Introduction to the Biochemistry and Molecular Biology of Denitrification. in *Biology of the Nitrogen Cycle* (Bothe, H., Ferguson, S. J., and Newton, W. E. eds.), Elsevier, Amsterdam. pp 3-20
- Vargas C, M. A., Downie JA. (1993) Detection of c-type cytochromes using enhanced chemiluminescence. *Anal. Biochem.* **209(2)**, 323-326
- Velasco, L., Mesa, S., Delgado, M. J., and Bedmar, E. J. (2001) Characterization of the *nirK* gene encoding the respiratory, Cu-containing nitrite reductase of *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochim. Biophys. Acta* **1521**, 130-134
- Velasco, L., Mesa, S., Xu, C. A., Delgado, M. J., and Bedmar, E. J. (2004) Molecular characterization of *nosRZDFYLX* genes coding for denitrifying nitrous oxide reductase of *Bradyrhizobium japonicum*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **85**, 229-235

- Volbeda, A., Dodd, E. L., Darnault, C., Crack, J. C., Renoux, O., Hutchings, M. I., Le Brun, N. E., and Fontecilla-Camps, J. C. (2017) Crystal structures of the NO sensor NsrR reveal how its iron-sulfur cluster modulates DNA binding. *Nat. Commun.* **8**, 15052
- Vollack, K. U., Hartig, E., Korner, H., and Zumft, W. G. (1999) Multiple transcription factors of the FNR family in denitrifying *Pseudomonas stutzeri*: characterization of four *fnr*-like genes, regulatory responses and cognate metabolic processes. *Mol. Microbiol.* **31**, 1681-1694
- Vollack, K. U., and Zumft, W. G. (2001) Nitric oxide signaling and transcriptional control of denitrification genes in *Pseudomonas stutzeri*. *J. Bacteriol.* **183**, 2516-2526
- Wood, N. J., Alizadeh, T., Bennett, S., Pearce, J., Ferguson, S. J., Richardson, D. J., and Moir, J. W. B. (2001) Maximal expression of membrane-bound nitrate reductase in *Paracoccus* is induced by nitrate via a third FNR-Like regulator named NarR. *J. Bacteriol.* **183**, 3606-3613
- Wu, J., and Bauer, C. E. (2008) RegB/RegA, A Global Redox-Responding Two-Component System. in *Bacterial Signal Transduction: Networks and Drug Targets* (Utsumi, R. ed.), Springer New York, New York, NY. pp 131-148
- Wunsch, P., and Zumft, W. G. (2005) Functional domains of NosR, a novel transmembrane iron-sulfur flavoprotein necessary for nitrous oxide respiration. *J. Bacteriol.* **187**, 1992-2001
- Yukl, E. T., Elbaz, M. A., Nakano, M. M., and Moenne-Loccoz, P. (2008) Transcription factor NsrR from *Bacillus subtilis* senses nitric oxide with a 4Fe-4S cluster. *Biochemistry* **47**, 13084-13092
- Zamorano-Sanchez, D., Reyes-Gonzalez, A., Gomez-Hernandez, N., Rivera, P., Georgellis, D., and Girard, L. (2012) FxkR provides the missing link in the *fixL*-*fixK* signal transduction cascade in *Rhizobium etli* CFN42. *Mol. Plant Microbe Interact.* **25**, 1506-1517
- Zumft, W. G. (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 533-616
- Zumft, W. G. (2005) Biogenesis of the bacterial respiratory Cu_A, Cu-S enzyme nitrous oxide reductase. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 154-166
- Zumft, W. G., and Kroneck, P. M. (2007) Respiratory transformation of nitrous oxide (N₂O) to dinitrogen by *Bacteria* and *Archaea*. *Adv. Microb. Physiol.* **52**, 107-227

9

ANEXOS

9.ANEXOS

9.1. Supplementary material Chapter 5.1

Supplementary Table S1. List of the 175 genes induced under anoxic denitrifying conditions in the WT and at the same time, their expression is downregulated in the *nmrR* mutant in comparison to the WT, both cultivated in anoxic denitrifying conditions.

Query ^a	FC (<i>DnnrR</i> anoxia vs. WT anoxia) ^b	FC (WT anoxia vs. oxa) ^c	Locus_tag ^d	Gene name ^e	Product ^f
bll0225	-2,7	3,1	Bdiaspc4_00775	<i>phbB</i>	acetoacetyl-CoA reductase
blr0314	-4,8	23,1	Bdiaspc4_01230	<i>nosR</i>	regulatory protein NosR
blr0315	-6,4	25,7	Bdiaspc4_01235	<i>nosZ</i>	TAT-dependent nitrous-oxide reductase
blr0316	-6,4	15,4	Bdiaspc4_01240	<i>nosD</i>	nitrous oxide reductase family maturation protein NosD
blr0317	-7,5	13,7	Bdiaspc4_01245	<i>nosF</i>	ABC transporter ATP-binding protein
blr0318	-9,3	23,1	Bdiaspc4_01250	<i>nosY</i>	ABC transporter permease
blr0319	-6,2	10,2	Bdiaspc4_01255	<i>nosL</i>	copper resistance protein CopZ
blr0320	-6,0	13,1	Bdiaspc4_01260	<i>nosX</i>	FAD:protein FMN transferase
blr0328	-4,2	2,7	Bdiaspc4_01305		hypothetical protein
blr0329	-5,7	2,3	Bdiaspc4_01310		response regulator
bll0389	-5,5	2,4	Bdiaspc4_01620		PilZ domain-containing protein
bsr0398	-3,9	4,8	Bdiaspc4_01665		hypothetical protein
bll0888	-2,1	2,7	Bdiaspc4_04280		acyl CoA:acetate/3-ketoacid CoA transferase
bll0913	-4,1	2,5	Bdiaspc4_04400		branched-chain amino acid ABC transporter substrate-binding protein
blr0964	-4,3	2,0	Bdiaspc4_04660		NAD(P)/FAD-dependent oxidoreductase
bll0979	-7,3	4,6	Bdiaspc4_04745		branched-chain amino acid ABC transporter substrate-binding protein
bll0980	-6,5	4,1	Bdiaspc4_04750		long-chain-fatty-acid--CoA ligase

blr0984	-5,6	2,4	Bdiaspc4_04770		AraC family transcriptional regulator
bll1047	-12,8	2,5	Bdiaspc4_05090		MarR family transcriptional regulator
blr1309	-2,4	3,5	Bdiaspc4_06495		propionyl-CoA synthetase
blr1311	-7,6	52,2	Bdiaspc4_06505		OmpW family protein
bsl1442	-2,8	2,3	Bdiaspc4_07255		Flp family type IVb pilin
blr1564	-3,2	2,4	Bdiaspc4_07905		hypothetical protein
bll1636	-4,2	2,3	Bdiaspc4_08255		hypothetical protein
bll1718	-2,8	2,1	Bdiaspc4_08720		C4-dicarboxylate transporter 1
blr1743	-13,8	23,7	Bdiaspc4_08825	<i>nifD</i>	nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain
blr1744	-11,9	22,4	Bdiaspc4_08830	<i>nifK</i>	nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta
blr1745	-15,1	9,3	Bdiaspc4_08835	<i>nifE</i>	nitrogenase iron-molybdenum cofactor biosynthesis protein NifE
blr1747	-4,8	3,9	Bdiaspc4_08845	<i>nifX</i>	nitrogen fixation protein NifX
blr1748	-4,9	6,0	Bdiaspc4_08850		NifX-associated nitrogen fixation protein
bsr1749	-5,7	4,7	Bdiaspc4_08855		hypothetical protein
bsr1750	-6,1	7,7	Bdiaspc4_08860	<i>fdxB</i>	ferredoxin III, nif-specific
blr1755	-9,1	18,9	Bdiaspc4_08885		iron-sulfur cluster assembly accessory protein
blr1756	-11,8	7,7	Bdiaspc4_08890	<i>nifS</i>	cysteine desulfurase NifS
bsr1757	-5,2	9,0	Bdiaspc4_08895	<i>nifT</i>	putative nitrogen fixation protein NifT
blr1759	-7,8	4,2	Bdiaspc4_08905	<i>nifB</i>	nitrogenase cofactor biosynthesis protein NifB
bsr1760	-8,9	5,6	Bdiaspc4_08910		ferredoxin-like protein in nif region
blr1761	-4,2	2,6	Bdiaspc4_08915		nitrogen fixation protein NifZ
bll1766	-7,1	19,6	Bdiaspc4_08945		OmpW family protein
blr1770	-3,7	5,0	Bdiaspc4_08965		nitrogen fixation protein NifQ
blr1771	-3,2	6,6	Bdiaspc4_08975	<i>nifW</i>	nitrogenase stabilizing/protective protein NifW
blr1773	-3,1	2,3	Bdiaspc4_08985		protein FixB
blr1774	-4,1	2,4	Bdiaspc4_08990		protein FixC

bll1872	-4,0	4,3	Bdiaspc4_09500		omptin family outer membrane protease
bll1875	-8,8	4,1	Bdiaspc4_09515		SET domain-containing protein-lysine N-methyltransferase
blr1880	-2,9	2,1	Bdiaspc4_09540		LuxR family transcriptional regulator
blr1883	-2,6	9,5	Bdiaspc4_09550	<i>rpoN₁</i>	RNA polymerase sigma-54 factor
bll1906	-22,2	46,9	Bdiaspc4_09680		GNAT family N-acetyltransferase
blr1912	-5,6	4,5	Bdiaspc4_09710		hypothetical protein
bll1944	-3,7	8,5	Bdiaspc4_09875		porin family protein
bll1981	-2,6	4,7	Bdiaspc4_10055		Nif11 family protein
blr2006	-2,3	2,1	Bdiaspc4_10180	<i>id676</i>	hypothetical protein
bll2007	-8,3	56,9	Bdiaspc4_10185	<i>hemN₁</i>	oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase
blr2106	-45,0	40,5	Bdiaspc4_10735		L-ectoine synthase
blr2133	-16,4	15,1	Bdiaspc4_10880		phytanoyl-CoA dioxygenase family protein
blr2134	-9,4	8,3	Bdiaspc4_10885		cupin domain-containing protein
blr2135	-7,6	5,3	Bdiaspc4_10890		hypothetical protein
blr2136	-7,7	4,2	Bdiaspc4_10895		PLP-dependent aminotransferase family protein
blr2146	-4,0	11,2	Bdiaspc4_10950		short-chain type dehydrogenase/reductase
blr2169	-3,1	2,0	Bdiaspc4_11095		transketolase family protein
bsl2328	-3,5	6,6	Bdiaspc4_11920		DUF2783 domain-containing protein
bll2329	-3,7	7,2	Bdiaspc4_11925		FAD-dependent oxidoreductase
bll2330	-4,2	21,6	Bdiaspc4_11930		VOC family protein
bll2388	-11,3	15,2	Bdiaspc4_12230		cytochrome c family protein
blr2485	-3,5	2,7	Bdiaspc4_12760	<i>petA</i>	ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit
blr2486	-4,9	2,2	Bdiaspc4_12765		cytochrome <i>b/c₁</i>
bsl2560	-4,4	2,3	Bdiaspc4_13165		hypothetical protein
blr2589	-8,3	3,2	Bdiaspc4_13340		EAL domain-containing protein
bll2664	-2,3	3,9	Bdiaspc4_13755		DUF1254 domain-containing protein

blr2668	-10,6	10,4	Bdiaspc4_13780		phenol degradation protein meta
blr2763	-2,1	58,7	Bdiaspc4_14290	<i>ccoN/fixN</i>	cytochrome- <i>c</i> oxidase, <i>cbb</i> ₃ -type subunit I
blr2764	-2,9	55,5	Bdiaspc4_14295	<i>ccoO/fixO</i>	cytochrome- <i>c</i> oxidase, <i>cbb</i> ₃ -type subunit II
blr2809	-2,3	2,8	Bdiaspc4_14525		nitrate reductase
bsr2847	-3,7	23,2	Bdiaspc4_14720		hypothetical protein
bll2905	-2,7	2,8	Bdiaspc4_15020		cytochrome P450
blr2932	-7,6	7,3	Bdiaspc4_15155		methyl-accepting chemotaxis protein
blr2933	-6,2	2,8	Bdiaspc4_15160		PAS domain S-box protein
bsr3073	-3,8	4,2	Bdiaspc4_15875		hypothetical protein
bsl3211	-35,6	36,5	Bdiaspc4_16610		hypothetical protein
blr3212	-105,4	53,8	Bdiaspc4_16615	<i>norE</i>	cytochrome <i>c</i> oxidase subunit 3 family protein
bsr3213	-14,6	7,5	Bdiaspc4_16620		hypothetical protein
blr3214	-70,4	81,2	Bdiaspc4_16625	<i>norC</i>	cytochrome <i>c</i>
blr3215	-159,2	71,2	Bdiaspc4_16630	<i>norB</i>	nitric oxide reductase subunit B
blr3216	-69,9	56,3	Bdiaspc4_16635	<i>norQ</i>	CbbQ/NirQ/NorQ/GpvN family protein
blr3217	-16,8	17,6	Bdiaspc4_16640	<i>norD</i>	VWA domain-containing protein
blr3218	-3,0	15,8	Bdiaspc4_16645		HAD family hydrolase
blr3221	-4,4	67,0	Bdiaspc4_16655		sugar ABC transporter substrate-binding protein
blr3222	-7,7	56,8	Bdiaspc4_16660		sugar ABC transporter permease
blr3223	-10,0	41,7	Bdiaspc4_16665		carbohydrate ABC transporter permease
blr3224	-10,8	75,9	Bdiaspc4_16670		ABC transporter ATP-binding protein
blr3225	-19,7	51,3	Bdiaspc4_16675		SDR family oxidoreductase
blr3226	-4,4	7,1	Bdiaspc4_16680		ribulokinase
blr3227	-7,8	8,5	Bdiaspc4_16685		carbohydrate kinase
blr3350	-4,5	2,4	Bdiaspc4_17315		xanthine dehydrogenase family protein molybdopterin-binding subunit
blr3500	-6,1	2,5	Bdiaspc4_18085		type II and III secretion system protein family protein

blr3501	-6,9	2,8	Bdiaspc4_18090		hypothetical protein
blr3502	-8,8	3,3	Bdiaspc4_18095		tetratricopeptide repeat protein
bll3611	-4,3	2,3	Bdiaspc4_18640		caspase family protein
blr3679	-5,8	2,6	Bdiaspc4_18985		toluene hydroxylase
blr3680	-2,0	2,4	Bdiaspc4_18990		monooxygenase
bll3835	-6,0	31,6	Bdiaspc4_19825		PepSY domain-containing protein
blr4116	-3,6	15,8	Bdiaspc4_21305		CBS domain-containing protein
blr4117	-5,5	11,0	Bdiaspc4_21310		3'-5' exonuclease
blr4191	-6,7	6,0	Bdiaspc4_21720		histidine kinase
blr4352	-7,5	3,2	Bdiaspc4_22595		porin family protein
bll4354	-2,1	2,4	Bdiaspc4_22610		porin family protein
bsl4407	-2,9	3,0	Bdiaspc4_22935		hypothetical protein
bsl4623	-3,4	4,9	Bdiaspc4_24190		hypothetical protein
blr4629	-2,1	4,4	Bdiaspc4_24230		hypothetical protein
blr4770	-2,8	2,3	Bdiaspc4_25015		lytic transglycosylase domain-containing protein
blr4934	-4,5	2,2	Bdiaspc4_25905		hypothetical protein
bll5026	-7,0	2,3	Bdiaspc4_26405	<i>hppa</i>	K ⁺ -insensitive pyrophosphate-energized proton pump
bll5085	-8,8	2,5	Bdiaspc4_26730		hypothetical protein
bsr5172	-3,0	2,2	Bdiaspc4_27195		hypothetical protein
blr5174	-4,2	2,1	Bdiaspc4_27205		porin family protein
blr5406	-2,0	2,0	Bdiaspc4_28495		FAD-dependent monooxygenase
bll5471	-2,3	2,1	Bdiaspc4_28845		hypothetical protein
bll5555	-2,4	4,8	Bdiaspc4_29330		phasin
bll5770	-2,4	5,1	Bdiaspc4_30475		carboxymuconolactone decarboxylase family protein
blr5774	-2,7	11,7	Bdiaspc4_30495		NAD(P)/FAD-dependent oxidoreductase
blr5775	-4,1	10,8	Bdiaspc4_30500	<i>trxC</i>	thioredoxin TrxC

bsr5776	-2,7	26,2	Bdiaspc4_30505		DUF2892 domain-containing protein
blr5777	-2,0	7,0	Bdiaspc4_30510		DUF302 domain-containing protein
bll5842	-3,3	2,3	Bdiaspc4_30840	<i>flaF</i>	flagellar biosynthesis regulatory protein FlaF
bll5846	-4,9	2,3	Bdiaspc4_30860		DUF1522 domain-containing protein
bll6183	-15,1	3,1	Bdiaspc4_32615		TonB-dependent receptor
blr6185	-4,7	2,1	Bdiaspc4_32625		DNA-binding response regulator
bll6212	-3,7	2,1	Bdiaspc4_32770		helix-turn-helix domain-containing protein
bll6222	-17,1	17,8	Bdiaspc4_32820		group III truncated hemoglobin
bll6402	-4,1	2,7	Bdiaspc4_33760		carbon-nitrogen hydrolase family protein
bll6403	-10,9	3,2	Bdiaspc4_33765		branched-chain amino acid ABC transporter permease
bll6405	-4,0	2,9	Bdiaspc4_33775		ABC transporter ATP-binding protein
blr6437	-5,7	2,1	Bdiaspc4_33940		SMP-30/gluconolactonase/LRE family protein
bll6469	-4,1	2,4	Bdiaspc4_34110		NAD-dependent malic enzyme
bll6496	-4,0	2,1	Bdiaspc4_34245		EAL domain-containing protein
bll6524	-4,5	6,7	Bdiaspc4_34390		hypothetical protein
blr6718	-3,9	4,7	Bdiaspc4_35425		cupin domain-containing protein
blr6743	-5,2	2,6	Bdiaspc4_35565		2-oxoacid:acceptor oxidoreductase subunit alpha
blr6744	-4,4	2,4	Bdiaspc4_35570		2-oxoacid:ferredoxin oxidoreductase subunit beta
bsl6929	-3,6	2,3	Bdiaspc4_36540	<i>hypC</i>	HypC/HybG/HupF family hydrogenase formation chaperone
blr6951	-3,6	9,9	Bdiaspc4_36650	<i>modA</i>	molybdate ABC transporter substrate-binding protein
blr7040	-4,3	96,5	Bdiaspc4_37140	<i>napC</i>	cytochrome C
blr7084	-4,1	4,4	Bdiaspc4_37380	<i>nnrR</i>	Crp/Fnr family transcriptional regulator
bsl7085	-29,2	133,8	Bdiaspc4_37385		DUF1858 domain-containing protein
bll7086	-4,3	43,8	Bdiaspc4_37390	<i>hemN₂</i>	oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase
blr7088	-4,3	17,5	Bdiaspc4_37400		copper chaperone PCu(A)C
blr7089	-21,0	161,4	Bdiaspc4_37405	<i>nirK</i>	nitrite reductase, copper-containing

blr7090	-7,1	13,2	Bdiaspc4_37410		formylglycine-generating enzyme family protein
blr7321	-9,3	8,7	Bdiaspc4_38610		DUF1269 domain-containing protein
blr7544	-5,3	2,2	Bdiaspc4_39800	<i>cycA</i>	cytochrome <i>c</i> family protein
bll7626	-46,1	121,7	Bdiaspc4_40245		U32 family peptidase
bll7627	-15,0	75,3	Bdiaspc4_40250		U32 family peptidase
bll7628	-10,3	10,1	Bdiaspc4_40255		sterol-binding protein
blr7629	-13,9	33,9	Bdiaspc4_40260		UbiD family decarboxylase
blr7631	-7,9	5,5	Bdiaspc4_40270		NUDIX domain-containing protein
bll7642	-2,6	2,4	Bdiaspc4_40340		DUF1236 domain-containing protein
bll7648	-2,9	5,0	Bdiaspc4_40390		ferritin-like domain-containing protein
blr7684	-4,0	2,7	Bdiaspc4_40605		hypothetical protein
blr7685	-3,4	2,4	Bdiaspc4_40610		PilZ domain-containing protein
bsr7720	-4,1	2,6	Bdiaspc4_40840		hypothetical protein
bll7787	-3,1	23,0	Bdiaspc4_41200		hypothetical protein
bll7799	-2,6	2,8	Bdiaspc4_41265		acyl-CoA dehydrogenase
bll7802	-3,8	2,5	Bdiaspc4_41280		acyl-CoA synthetase
bll7803	-5,1	2,2	Bdiaspc4_41285		enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein
bll7804	-5,9	3,8	Bdiaspc4_41290		SDR family NAD(P)-dependent oxidoreductase
blr7806	-4,6	5,8	Bdiaspc4_41300		acetyl-CoA C-acyltransferase
blr7807	-4,1	3,3	Bdiaspc4_41305		acyl-CoA synthetase
blr7815	-3,2	2,9	Bdiaspc4_41345		flagellar biosynthesis protein FlgA
blr7816	-9,8	4,5	Bdiaspc4_41350		ABC transporter substrate-binding protein branched-chain amino acid ABC transporter substrate-binding protein
blr7829	-6,8	4,3	Bdiaspc4_41415		
bll7929	-10,1	2,8	Bdiaspc4_41945		ABC transporter ATP-binding protein
blr7961	-3,3	43,7	Bdiaspc4_42105		Hsp20/alpha crystallin family protein
bll7981	-5,9	22,1	Bdiaspc4_42205		dehydrogenase

bll7982	-4,3	31,2	Bdiaspc4_42210	class I SAM-dependent methyltransferase
trnfM-CAU	-2,6	11,1	-	tRNA-fMet(CAT)

^a Best blast hit in the *B. diazoefficiens* USDA 110 genome (Kaneko et al., 2002; GenBank acc. # NC_004463.1; RefSeq annotation as from January 2016).

^b Fold change (FC) values of gene expression in the *nrrR* mutant in comparison to the WT, both cultured in anoxic denitrifying conditions.

^c FC values of gene expression in wild-type cells cultured anoxic denitrifying conditions in comparison to those in cells cultured oxically.

^d Nomenclature of *B. diazoefficiens* 110*spc4* genes according to the NCBI annotation (GenBank acc. # CP032617); Fernández et al., 2019.

^e Gene name according to the NCBI annotation with modifications marked in grey (GenBank acc. # CP032617); Fernández et al., 2019.

^f Protein/gene product according to the NCBI annotation (GenBank acc. # CP032617); Fernández et al., 2019.

9.2. Abreviaturas y símbolos

A	Adenina	C	Citosina
aa	Aminoácido	CBD	Chitin Binding Domain
ABC	ATP-binding cassette	CIT	Calorimetría isotérmica de titulación
ABS	Absorbancia	Cm	Cloranfenicol
ADN/DNA	Ácido desoxirribonucleico	CRP	Cyclic AMP receptor protein
ADNc/cDNA	ADN complementario	cPTIO	2-4-carboxyphenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin e-1-oxyl-3-oxide
ADP	Adenosin difosfato	C-terminal	Carboxi terminal
AEBSF	4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride	Cu	Cobre
AOA	Arqueas oxidantes de amonio	Cys	Cisteína
Ap	Ampicilina	DEPC	Dietil policarbonato
APS	Persulfato amónico	DMSO	Dimetilsulfóxido
ARN/RNA	Ácido ribonucleico	DNR	Dissimilative nitrate respiration regulator
ARNm/mRNA	ARN mensajero	DNRA	Dissimilatory nitrate reduction to ammonium
ARNP	ARN polimerasa	DO/OD	Densidad óptica
ATP	Adenosin trifosfato	DPM	Desintegraciones por minuto
b	Base nitrogenada	DTT	Ditiotreitol
bp	Par de bases	E	Glutamato
Biofenol	Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico	EBP	Enhancer-binding protein
Biot	Biotina	EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
BOA	Bacterias oxidantes de amonio	Fe-S	Grupo hierro-azufre
BON	Bacterias oxidantes de nitrito		

Anexos

FNR	Fumarate-nitrate reductase regulator	NAD ⁺ /NADH	Nicotin adenin dinucleótido
For	Forward	NADP ⁺ /NADPH	Nicotin adenin dinucleótido fosfato
FPLC	Fast protein liquid chromatography	NCBI	National center for biotechnology information
FSN	Fijación simbiótica de N ₂	NEB	New England Biolabs
G	Guanina	Nir/NiR	Nitrito reductasa
GAF	cGMP-specific phosphodiesterases, Adenylyl cyclases and FhlA	NNEDA	N-(1-Naftill) etilenodiamina
GEI	Gas de efecto invernadero	NnrR	Nitrite/nitric oxide reductase regulator
Gm	Gentamicina	Nor	Óxido nítrico reductasa
H2O _d	Agua desionizada	cNor	tipo c
IHF	Integration host factor	qCuANor	tipo qCuA
IMPACT	Intein-Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag	qNor	tipo q
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido	Nos	Óxido nitroso reductasa
IVT	Transcripción in vitro	NOX	Óxidos de nitrógeno
Ka	Constante de asociación	NR	Nitrato reductasa
Kd	Constante de disociación	Nap	Nitrato reductasa periplásmica
KD	Constante de equilibrio	Nar	Nitrato reductasa de membrana
Km	Kanamicina	Nas	Nitrato reductasa asimilativa
Lb	Leghemoglobina	NssR	Nitrosative stress-sensing regulator
MFS	Major Facilitator Superfamily	nt	Nucleótido
Mo-bis-MGD	Mo-bis-molibdeporin guanina dinucleotido	N-terminal	Amino terminal
		N2OR	Óxido nitroso reductasa

	ONPG Orto-nitrofenil- β -galactósido	Spc	Espectinomicina
		sRNAs	Small RNAs
ORF	Open reading frame	T	Timina
P/p	Promotor	Tat	Twin arginine translocation
pb	Pares de bases	Tc	Tetraciclina
pBS	Vector pBluescript	TCS	Two-component system
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	TEMED	Tetra-metiletilendiamina
qRT-PCR	PCR cuantitativa a tiempo real	TSS	Transcription start site
r	Resistencia	UM/MU	Unidades Millers
	RACE Rapid amplification of cDNA ends	UR	Unidades de respuesta
		UTP	Uridin trifosfato
Rev	Reverso	UV	Ultravioleta
	ROS Especies reactivas de oxígeno	v/v	Volumen/volumen
rpm	Revoluciones por minuto	w/v	Peso/volumen
	RPS Resonancia de plasmón de superficie		X-gal 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
rt	Transcrito de referencia	V	Volúmenes de columna
RT-PCR	PCR con transcripción inversa	Δ	Delta, delección
S	Serina	σ	Factor sigma
SA	Estreptavidina	χ^2	Chi cuadrado
SDS	Dodecilsulfato sódico		Unidades
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS	$^{\circ}\text{C}$	Grado centígrado
Sm	Estreptomycin	A	Amperio
		Da	Dalton
		g	Gramo

g	Fuerza gravitatoria	HNO ₃	Ácido nítrico
h	Hora	KCl	Cloruro potásico
l	Litro	KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotásico
m	Metro	MgCl ₂	Cloruro magnésico
M	Molar	MgSO ₄	Sulfato magnésico
min	Minuto	MnCl ₂	Cloruro de manganeso
Pa	Pascal	N ₂	Nitrógeno molecular
s	Segundo	N ₂ O	Óxido nitroso
V	Voltio	Na ₂ CO ₃	Carbonato sódico
Prefijos		Na ₂ MoO ₄	Molibdato de sodio
T	Tera	Na ₂ HPO ₄	Fosfato disódico
M	Mega	NaCl	Cloruro sódico
k	Kilo	NaH ₂ PO ₄	Fosfato monosódico
m	Mili	NaOH	Hidróxido sódico
μ	Micro	NH ₂ OH	Hidroxilamina
n	Nano	NH ₃	Amoníaco
p	Pico	NH ₄ ⁺	Amonio
Moléculas		(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato amónico
CO ₂	Dióxido de carbono	NO	Óxido nítrico
CuSO ₄	Sulfato cúprico	NO ₂	Dióxido de nitrógeno
FeCl ₃	Cloruro férrico	NO ₂ ⁻	Nitrito
FeSO ₄	Sulfato ferroso	NO ₃ ⁻	Nitrato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno	O ₂	Oxígeno molecular
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico	RbCl	Cloruro de rubidio
H ₃ BO ₃	Ácido bórico	ZnSO ₄	Sulfato de cinc
HCl	Ácido clorhídrico		

9.3. Abreviaturas de especies

<i>Achromobacter cycloclastes</i>	<i>A. cycloclastes</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>A. tumefaciens</i>
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	<i>A. eutrophus</i>
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>A. faecalis</i>
<i>Bacillus nitroreducens</i>	<i>B. nitroreducens</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	<i>B. diazoefficiens</i>
<i>Bradyrhizobium oligotrophicum</i>	<i>B. oligotrophicum</i>
<i>Brucella abortus</i>	<i>B. abortus</i>
<i>Brucella melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
<i>Brucella suis</i>	<i>B. suis</i>
<i>Dinoroseobacter shibae</i>	<i>D. shibae</i>
<i>Ensifer meliloti</i>	<i>E. meliloti</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i>
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	<i>G. stearothermophilus</i>
<i>Haemophilus influenza</i>	<i>H. influenzae</i>
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	<i>M. hydrocarbonoclasticus</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i>
<i>Paracoccus denitrificans</i>	<i>P. denitrificans</i>
<i>Paracoccus pantotrophus</i>	<i>P. pantotrophus</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i>
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>P. stutzeri</i>
<i>Ralstonia eutropha</i>	<i>R. eutropha</i>
<i>Rhizobium etli</i>	<i>R. etli</i>
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	<i>R. capsulatus</i>
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	<i>R. sphaeroides</i>
<i>Rhodovulum sulfidophilum</i>	<i>R. sulfidophilum</i>
<i>Roseobacter denitrificans</i>	<i>R. denitrificans</i>
<i>Staphylococcus carnosus</i>	<i>S. carnosus</i>
<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>S. coelicolor</i>
<i>Sulfurimonas denitrificans</i>	<i>S. denitrificans</i>
<i>Thermus thermophilus</i>	<i>T. thermophilus</i>
<i>Vibrio cholerae</i>	<i>V. cholerae</i>
<i>Wolinella succinogenes</i>	<i>W. succinogenes</i>

9.4. Índice de figuras

Figura 2.1. Ilustración esquemática del ciclo biogeoquímico del nitrógeno.....	24
Figura 2.2. Secuencia de etapas enzimáticas que constituyen el proceso de desnitrificación.....	29
Figura 2. 3. Comparación de la organización de nitrato reductasas bacterianas....	32
Figura 2. 4. Comparación de las óxido nítrico reductasas bacterianas	34
Figura 2.5. Representación de los factores medioambientales y reguladores transcripcionales que participan en la regulación del proceso de desnitrificación	45
Figura 2. 6. Representación gráfica de los dominios presentes en las proteínas tipo CRP/FNR.	46
Figura 2. 7. Estructura de la proteína reguladora FixK ₂ unida a ADN	47
Figura 2. 8. Cascadas reguladoras en <i>E. meliloti</i> , <i>R. etli</i> y <i>B. diazoefficiens</i>	53
Figura 2.9. Representación esquemática del proceso de desnitrificación en <i>B. diazoefficiens</i>	56
Figure 5.1.1. Venn diagram representing the group of differentially expressed genes in the <i>nnrR</i> mutant in comparison to the WT	147
Figure 5.1.2. Expression data of selected genes determined by microarray (black bars) and qRT-PCR (grey bars)	149
Figure 5.1.3. The regulatory proteins FixK ₂ and NnrR are involved in the control of <i>cycA</i> expression	154
Figure 5.1.4. IVT activation of <i>nnrR</i> , <i>nnrS</i> and <i>cycA</i> genes by FixK ₂	156
Figure 5.1.5. <i>CycA</i> is involved in nitrous oxide reductase activity	157
Figure 5.1.6. Nitrous oxide reductase (N ₂ OR) activity in the absence and in the presence of succinate as electron donor determined in the WT and <i>cy2</i> , and <i>cycS</i> mutants	158
Figure 5.2.1. Transcriptional organization of the <i>B. diazoefficiens nosRZDFYLX</i> genes	164

Figure 5.2.2. Structure of the <i>B. diazoefficiens</i> <i>nosR</i> promoter.....	166
Figure 5.2.3. Low-oxygen is the main inducer of <i>nosRZDFYLX</i> expression.....	168
Figure 5.2.4. Control of <i>nosRZDFYLX</i> expression by the regulatory proteins FixK ₂ and NnrR.....	172
Figure 5.2.5. FixK ₂ -mediated IVT activation from the <i>nosRZDFYLX</i> promoter.....	174
Figura 5.3.1. Secuencia aminoacídica y predicción de estructura secundaria de NnrR.....	178
Figura 5.3.2. Predicción bioinformática de la estructura cuaternaria de la proteína NnrR de <i>B. diazoefficiens</i> , basada en la estructura resuelta de la proteína DNR de <i>P. aeruginosa</i> (Giardina et al., 2008)	180
Figura 5.3.3. Actividad β-galactosidasa de la fusión <i>norC-lacZ</i> en las cepas de <i>B. diazoefficiens</i> parental y mutantes <i>nnrR</i> y <i>fixK₂</i>	181
Figura 5.3.4. Mapa del plásmido pMB1407	183
Figura 5.3.5. Actividad β-galactosidasa de la fusión <i>norC-lacZ</i> en las cepas de <i>B. diazoefficiens</i> parental (2499), mutantes <i>nnrR</i> (2499R) y <i>fixK₂</i> (2499K2) y en ambas cepas mutantes complementadas con el gen <i>nnrR</i> (2499R- <i>nnrR</i> y 2499K2- <i>nnrR</i>)	184
Figura 5.3.6. Actividad nitrato (NR) (A) y nitrito reductasa (NiR) (B) en la cepa parental y GRN307 (mutante <i>hemN₂</i>) de <i>B. diazoefficiens</i>	186
Figura 5.3.7. Actividad β-galactosidasa (UM/mg de proteína × min) de la fusión <i>norC-lacZ</i> en las cepas de <i>B. diazoefficiens</i> parental y GRN307 (mutante <i>hemN₂</i>), en presencia y ausencia de NO	187
Figura 5.3.8. Construcción del plásmido pMB1122 que expresa NnrR- <i>Mxe</i> -Inteína-CBD.....	189
Figura 5.3.9. Sobre-expresión y purificación de la proteína NnrR- <i>Mxe</i> -Inteína-CBD.....	190

Figura 5.3.10. Representación gráfica de los valores de absorbancia de cada uno de los espectros obtenidos en la titulación para cada una de las concentraciones de hemina..... 192

Figura 5.3.11. Cambios espectrales obtenidos en la titulación de proteína NnrR (20 μ M monómero) con cantidades crecientes de hemina desde 0 hasta 40 μ M..... 192

Figura 5.3.12. Propiedades espectrales de NnrR como apo y holoproteína 194

Figura 5.4.1. Comparación de las secuencias nucleotídicas de la caja consenso de FixK₂ (Bonnet et al., 2013), la caja FixK₂ presente en el promotor de los genes *fixNOQP*, la caja NnrR presente en el promotor de los genes *norCBQD* y los derivados de cada una de ellas construidos en este trabajo 200

Figura 5.4.2. Interacción de la proteína FixK₂ con las cajas FixK₂ y NnrR presentes en los promotores de los genes *fixNOQP* y *norCBQD*, respectivamente y con derivados mutantes de dichas cajas 203

Figura 5.4.3. Estrategia de mutación de la caja FixK₂ del promotor de *fixNOQP* y la caja NnrR del promotor de *norCBQD* 205

Figura 5.4.4. Activación de la transcripción *in vitro* por la proteína FixK₂ de derivados del promotor del operón *fixNOQP*..... 208

Figura 5.4.5. Ensayos de IVT en presencia de proteína FixK₂ de derivados del promotor de los genes *norCBQD*..... 209

Figura 5.4.6. Efecto de las mutaciones en las cajas FixK₂ y NnrR de *fixNOQP* y *norCBQD*, respectivamente, en la expresión de las fusiones *fixN-lacZ* y *norC-lacZ*...212

9.5. Índice de tablas

Tabla 4.1. Cepas bacterianas.....67

Tabla 4.2. Plásmidos.....70

Tabla 4.3. Oligonucleótidos76

Tabla 4.4. Composición, uso y referencia de los medios de cultivos usados en esta tesis81

Tabla 4.5. Antibióticos.....82

Tabla 4.6. Composición y uso de las soluciones usadas en esta Tesis doctoral	85
Tabla 4.7. Endonucleasas de restricción	103
Tabla 4.8. Mezclas de reacción de PCR para Dream Taq y Phusion ADN polimerasas	104
Tabla 4.9. Programas de PCR adecuados para Dream Taq y Phusion ADN polimerasas	105
Tabla 4.10. Plásmidos para IVT con sus características más relevantes	128
Table 5.1.1. List of the 60 genes belonging to 42 putative FixK2 box-associated transcription units whose expression is downregulated in the nnrR mutant in comparison to the WT, both cultured under anoxic denitrifying conditions, and at the same time are induced in the WT in anoxic denitrifying conditions compared to oxic conditions	150
Tabla 5.4.1. Alineamiento de cajas tipo FixK ₂ de genes activados o no directamente por FixK ₂	198
Tabla 5.4.2. Derivados de las cajas FixK ₂ (<i>fixNOQP</i>) y NnrR (<i>norCBQD</i>) usados en este estudio	199
Table S1. List of the 175 genes induced under anoxic denitrifying conditions in the WT and at the same time, their expression is downregulated in the nnrR mutant in comparison to the WT, both cultivated in anoxic denitrifying conditions	255