



UNIVERSIDAD
DE GRANADA



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



UNIVERSIDAD DE GRANADA

**PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOLOGÍA
FUNDAMENTAL Y DE SISTEMAS**

**Regulación y mecanismo molecular de FixK₂,
un factor transcripcional clave
para la simbiosis
*Bradyrhizobium diazoefficiens-soja***

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



TESIS DOCTORAL

Sergio Parejo Treviño

Granada, 2022

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Sergio Parejo Treviño
ISBN: 978-84-1117-630-9
URI: <https://hdl.handle.net/10481/79155>



UNIVERSIDAD
DE GRANADA



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



UNIVERSIDAD DE GRANADA

**PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOLOGÍA FUNDAMENTAL
Y DE SISTEMAS**

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos

Estación Experimental del Zaidín, CSIC – Granada

**Regulación y mecanismo molecular de FixK₂, un factor trans-
cripcional clave para la simbiosis
Bradyrhizobium diazoefficiens-soja**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por el graduado en
Biología

Sergio Parejo Treviño para aspirar al Grado de Doctor

Fdo. Sergio Parejo Treviño

VºBº La Directora

Fdo. María Socorro Mesa Banqueri

Doctora en Farmacia

Científica Titular del CSIC

Granada, 2022

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

La publicación para la cual se muestran resultados obtenidos durante esta Tesis Doctoral es:

Fine-tuning modulation of oxidation-mediated posttranslational control of *Bradyrhizobium diazoefficiens* FixK₂ transcription factor. Parejo S., J. J. Cabrera J. J., A. Jiménez-Leiva, L. Tomás-Gallardo, E. J. Bedmar, A. J. Gates, S. Mesa (2022). International Journal of Molecular Sciences 23:5117. DOI: 10.3390/ijms23095117. (Impact Factor: 6.208, Q2).

A continuación, se citan las participaciones en publicaciones, capítulos de libro, simposios, congresos y eventos divulgativos en los que se ha participado durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral:

Molecular determinants of negative regulation of the *Bradyrhizobium diazoefficiens* transcription factor FixK₂. Fernández N., J. J. Cabrera, S. Salazar, S. Parejo, M. C. Rodríguez, A. Lindemann, M. Bonnet, H. Hennecke, E. J. Bedmar, S. Mesa (2016). In F. González-Andrés, and E. James (ed.), Biological Nitrogen Fixation and Beneficial Plant-Microbe Interactions. p. 57-72. Springer International Publishing Switzerland. DOI: 10.1007/978-3-319-32528-6_6. Book chapter.

Regulación y mecanismo molecular de FixK₂, un factor transcripcional clave para la simbiosis *Bradyrhizobium diazoefficiens*-soja. Parejo, S. & Mesa, S. Young Researchers's Science Symposium, organizado por la Estación Experimental del Zaidín (CSIC), 19 de diciembre de 2016 en Granada, España. Oral communication.

Control postraducciona por oxidación de la proteína FixK₂ de *Bradyrhizobium diazoefficiens*. Parejo, S., J. J. Cabrera, L. Tomás-Gallardo, B. Floriano, E. J. Bedmar & S. Mesa. II Jornadas de Investigadores en Formación: fomentando la interdisciplinariedad (JIFFI), organizadas por la Escuela Internacional de Posgrado y el Consejo de representantes de doctorandos de la Universidad de Granada, 17 de mayo de 2017 en Granada, España. Oral communication.

New insights into the oxidation-mediated posttranslational control of the *Bradyrhizobium diazoefficiens* FixK₂ regulatory protein. Parejo, S., J. J. Cabrera, A. Jiménez-Leiva, M. J. Torres, L. Tomás-Gallardo, M. J. Delgado, E. J. Bedmar & S. Mesa. 20th International Congress on Nitrogen Fixation, 3 de septiembre de 2017 en Granada, España. Póster communication.

Does exchange of Cys183 to aspartic acid in *Bradyrhizobium diazoefficiens* transcription factor FixK₂ mimic its oxidation-mediated posttranslational control?. Parejo, S., J. J. Cabrera, A. Jiménez-Leiva, M. J. Torres, L. Tomás-Gallardo, E. J. Bedmar & S. Mesa. 22nd European Nitrogen Cycle Meeting, 24 de septiembre de 2017 en Córdoba, España. Póster communication.

Control postraducciona por oxidación de FixK₂, un regulador clave en la bacteria endosimbiótica *Bradyrhizobium diazoefficiens*. Parejo, S. & S. Mesa. Young Researchers's Science Symposium, organizado por la Estación Experimental del Zaidín (CSIC), 1 de diciembre de 2017 en Granada, España. Oral communication.

La Fijación Biológica del Nitrógeno, una Alianza entre dos Reinos. Parejo, S. & S. Mesa. 4ª edición de Desgranando Ciencia, organizado por la Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología (FECYT) y la asociación Hablando de Ciencia, 14 de diciembre de 2017 en Granada, España. Póster communication.

Determinantes moleculares de la proteína FixK₂ de *Bradyrhizobium diazoefficiens*. Cabrera, J. J., A. Jiménez-Leiva, L. Tomás-Gallardo, S. Casado, **Parejo, S.**, M. J. Torres, M. J. Delgado, E. J. Bedmar & S. Mesa. XIV Reunión Nacional del Metabolismo del Nitrógeno, 16 de mayo de 2018 en Segovia, España. Oral communication.

New insights in the regulation mediated by the FixK₂ transcription factor of *Bradyrhizobium diazoefficiens*. Cabrera, J. J., A. Jiménez-Leiva, L. Tomás-Gallardo, S. Casado, **Parejo, S.**, M. J. Torres, M. J. Delgado, E. J. Bedmar & S. Mesa. 13th European Nitrogen Fixation Conference, 18 de agosto de 2018 en Estocolmo, Suecia. Oral communication.

Unravelling the controversial effects of the exchange of C183 to aspartic acid in *Bradyrhizobium diazoefficiens* FixK₂ transcription factor. **Parejo, S.**, J. J. Cabrera, A. Jiménez-Leiva, L. Tomás-Gallardo, M. J. Torres, E. J. Bedmar & S. Mesa. 23rd European Nitrogen Cycle Meeting, 19 de septiembre de 2018 en Alicante, España. Oral communication.

El diálogo molecular de las proteínas, ¿te atreves a estudiarlo?. Parejo, S. & S. Mesa. 5ª edición de Desgranando Ciencia, organizado por la Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología (FECYT) y la asociación Hablando de Ciencia, 13 de diciembre de 2018 en Granada, España. Póster communication.

En la búsqueda del cofactor de la proteína FixK₂ de *Bradyrhizobium diazoefficiens*. **Parejo, S.** & S. Mesa. JIFFI. II Congreso/IV Jornada de Investigadores en Formación, fomentando la Interdisciplinariedad, organizado por la Escuela Internacional de Posgrado y el Consejo de representantes de doctorandos de la Universidad de Granada, 26 de junio de 2019 en Granada, España. Oral communication.

Mimicking the oxidation-mediated post-translational control of the transcription factor FixK₂ of *Bradyrhizobium diazoefficiens*. **Parejo, S.**, J. J. Cabrera, A. Jiménez-Leiva, L.

Tomás-Gallardo, M. J. Torres, E. J. Bedmar & S. Mesa. XVII Reunión de la Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno y VI Portuguese-Spanish Congress on Nitrogen Fixation, organizado por la Universidad Autónoma de Madrid, CSIC y SEFIN, 10 de julio de 2019 en Madrid, España. Oral communication.

Estudios de simulación del control postraduccional por oxidación de la proteína FixK₂ de *Bradyrhizobium diazoefficiens*. Parejo, S., J. J. Cabrera, A. Jiménez-Leiva, L. Tomás-Gallardo, M. J. Torres, E. J. Bedmar & S. Mesa. XV Congreso Argentino de Microbiología (CAM 2019), organizado por la Asociación Argentina de Microbiología (AAM), 25 de septiembre de 2019 en Buenos Aires, Argentina. Póster communication.

Oxidative stress produced by paraquat reduces nitrogen fixation in soybean-*Bradyrhizobium diazoefficiens* symbiosis by decreasing nodule functionality. G. Tortosa, S. Parejo, J. J. Cabrera, E. J. Bedmar, E.J., S. Mesa (2021). Nitrogen 2: 30-40. DOI: 10.3390/nitrogen2010003. Journal article.

Dissection of FixK₂ protein-DNA interaction unveils new insights into *Bradyrhizobium diazoefficiens* lifestyles control. Cabrera J. J., A. Jiménez-Leiva, L. Tomás-Gallardo, S. Parejo, S. Casado, M. J. Torres, E. J. Bedmar, M. J. Delgado, S. Mesa. Environmental Microbiology 23:6194-6209. DOI: 10.1111/1462-2920.15661. Journal article.

Fine-tuning modulation of oxidation-mediated posttranslational control of *Bradyrhizobium diazoefficiens* FixK₂ transcription factor. Parejo, S., J. J. Cabrera, A. Jiménez-Leiva, L. Tomás-Gallardo, A. J. Gates, E. J. Bedmar & S. Mesa. The 14th European Nitrogen Fixation Conference, 22 de septiembre de 2021 en Aarhus, Dinamarca. Póster communication.

Determinantes moleculares de la interacción FixK₂-ADN implicados en la adaptación de *Bradyrhizobium diazoefficiens* a sus diferentes modus vivendi. Cabrera, J. J., A. Jiménez-Leiva, L. Tomás-Gallardo, Parejo, S., R. A. Juárez, S. Casado, M. J. Torres, E. J. Bedmar, M. J. Delgado & S. Mesa. XV Reunión Nacional del Metabolismo del Nitrógeno, 2 febrero de 2022 en Córdoba, España. Póster communication.

Fine-tuning modulation of oxidation-mediated posttranslational control of *Bradyrhizobium diazoefficiens* FixK₂ transcription factor. Sergio Parejo, Juan J. Cabrera, Andrea Jiménez-Leiva, Laura Tomás-Gallardo, Andrew J. Gates, Eulogio J. Bedmar, Socorro Mesa. XVIII SEFIN Meeting and I Spanish-Portuguese Congress on Beneficial Plant-Microorganism Interactions (BeMiPlant), 17 de Octubre de 2022 en Oeiras, Portugal. Póster communication.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, la Dra. Socorro Mesa, por las incontables horas que hemos compartido, por haberme ofrecido la oportunidad de crecer profesionalmente y haber confiado en mí para hacer posible esta tesis.

A M^a Jesús y Eulogio por hacerme sentir parte del grupo, por vuestros consejos y sabiduría.

A los doctores Andrew Gates y Xavier Barril, por brindarme la oportunidad de aprender nuevas tecnologías en Norwich y Barcelona.

A mis compañeros en la EEZ, con quienes tanto he vivido. A mis compañeros de laboratorio en Granada y Norwich, Juan y Andrea, gracias por ser unas bellísimas personas, ha sido una suerte para mí haber formado equipo con vosotros durante tantos años. A Germán, por introducirme en el mundo de las plantas y la divulgación. A David, Antonio, Alba, Ana, Chudi y Pedro por hacer de los laboratorios 202 y 203 mi casa. A Vicente, Paqui y Anita, por todos esos cafés y momentos irremplazables. A Lola, por tu paciencia e indispensable ayuda en radioactividad. A Alex, por todas las experiencias vividas dentro y fuera del laboratorio. A todos, gracias por unos años inolvidables que siempre guardaré en el corazón.

A mi amigo Jordi, cuya amistad no tiene parangón, sin tus consejos todo hubiera sido muy diferente.

A mi familia, por haberme apoyado incondicionalmente durante tantos años. A mis padres, Manuel y M^a Ángeles, responsables de que haya llegado hasta aquí, gracias por enseñarme a no rendirme nunca. A mis hermanas Cristina e Irene, a quienes quiero con locura y siempre están cuando más lo necesito. A mi fiel compañero Flipy, que durante tantos años llenó de felicidad nuestro hogar. A mis abuelos, de quienes tanto he aprendido y a quienes tanto he añorado en la distancia. Sin el amor y la ayuda de todos vosotros esto no habría sido posible.

A todos vosotros y a quienes aunque no cito, bien recuerdo,
¡gracias por haber formado parte de esta etapa de mi vida!

1. RESUMEN/SUMMARY	27
2. INTRODUCCIÓN.....	47
2.1. El ciclo del Nitrógeno	49
2.1.1. Efectos antrópicos en el ciclo del N	53
2.2. Fijación Biológica de Nitrógeno	55
2.2.1. Simbiosis <i>Rhizobium</i>-leguminosa	57
2.2.2. Nitrogenasa.....	61
2.2.3. Baja tensión de oxígeno (microoxia) en el nódulo	63
2.2.4. Especies reactivas de oxígeno (ROS) en la interacción simbiótica.....	65
2.3. Regulación en respuesta a microoxia en rizobios.....	67
2.3.1. Redes de regulación.....	67
2.3.1.1. Sistemas de dos componentes	67
2.3.1.1.1. FixLJ	67
2.3.1.1.2. hFixL-FxkR	74
2.3.1.1.3. RegSR	77
2.3.1.2. Factores transcripcionales	79
2.3.1.3. Factores sigma	81
2.4. Factores transcripcionales de tipo CRP/FNR	85
2.4.1. Aspectos generales.....	85
2.4.2. CRP	89
2.4.3. FNR	94
2.4.4. CooA	96
2.4.5. Proteínas de tipo FixK/FnrN	98
2.5. Proteínas CRP/FNR en <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>..	101

2.5.1. <i>B. diazoefficiens</i>	103
2.5.2. FixK ₂ como proteína clave	105
2.5.2.1. Relación estructura-función	107
2.5.2.2. Control postraduccional por proteólisis.....	111
2.5.2.3. Control postraduccional por oxidación y sus implicaciones <i>in vivo</i>	113
3. OBJETIVOS	117
4. MATERIALES Y MÉTODOS	123
4.1. Materiales	125
4.1.1. Cepas bacterianas	125
4.1.2. Plásmidos	127
4.1.3. Oligonucleótidos.....	133
4.1.4. Medios de cultivo	142
4.1.5. Antibióticos	143
4.1.6. Soluciones químicas y bioquímicas	144
4.2. Métodos microbiológicos	152
4.2.1. Conservación de cepas bacterianas	152
4.2.2. Cultivos de cepas de <i>B. diazoefficiens</i>	153
4.2.2.1. Precultivos de rutina sólido y líquido	153
4.2.2.2. Cultivos óxicos	153
4.2.2.3. Cultivos microóxicos.....	153
4.2.2.4. Determinación del crecimiento en condiciones de anoxia en presencia de nitrato	154
4.2.2.5. Cultivos para extracción de ARN	154
4.2.2.6. Cultivos para inoculación de plantas de soja	155

4.2.2.7. Determinación del número de unidades formadoras de colonia (UFC/ml) para el aislamiento de bacteroides.....	155
4.2.3. Obtención de fracciones solubles (citosol) de <i>B. diazoefficiens</i>	156
4.2.4. Aislamiento de bacteroides	156
4.3. Métodos analíticos	157
4.3.1. Determinación de actividad β -galactosidasa	157
4.3.2. Determinación de proteína	159
4.3.3. Análisis de parámetros fisiológicos en plantas de soja	160
4.3.3.1. Determinación de nitrógeno en plantas de soja	160
4.3.3.2. Determinación de leg-hemoglobina.....	161
4.3.3.3. Determinación del peso seco de brotes de soja.....	162
4.3.3.4. Determinación del número y peso seco de nódulos	162
4.3.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS)	163
4.3.5. Transferencia a membrana de nitrocelulosa.....	164
4.3.6. Ensayo de inmunodetección (Western-Blot)	165
4.3.6.1. Inmunodetección en células crecidas en vida libre	165
4.3.6.2. Inmunodetección en bacteroides.....	166
4.3.7. Visualización de proteínas en geles de poliacrilamida con azul de Coomassie	167
4.3.8. Concentración de eluidos de proteína de columnas cromatográficas.....	167

4.3.9. Determinación del estado oligomérico de FixK₂ mediante cromatografía de exclusión molecular por tamaño (SEC) ...	168
4.3.9.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ..	168
4.3.9.2. Normalización de los perfiles de elución.....	169
4.4. Métodos de biología molecular	170
4.4.1. Obtención de ADN total de <i>B. diazoefficiens</i>	170
4.4.1.1. Lisado por calor	170
4.4.1.2. Método comercial	171
4.4.2. Obtención de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>.....	172
4.4.2.1. Método TENS.....	172
4.4.2.2. Métodos comerciales	173
4.4.2.2.1. Minipreps	173
4.4.2.2.2. Midipreps	174
4.4.3. Obtención de ADN plasmídico de <i>B. diazoefficiens</i> ...	175
4.4.4. Aislamiento de ARN total de células de <i>B. diazoefficiens</i>	176
4.4.5. Determinación de la concentración de ADN y ARN....	178
4.4.6. Digestión de ADN.....	179
4.4.6.1. Digestión con endonucleasas de restricción	179
4.4.6.2. Digestión de ADN metilado	181
4.4.7. Amplificación de ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	181
4.4.8. Mutación puntual dirigida (QuikChange).....	183
4.4.9. Electroforesis de ADN y ARN en geles de agarosa	184
4.4.10. Purificación de fragmentos de ADN de PCR o de restricción	185

4.4.10.1. A partir de la reacción de PCR	186
4.4.10.2. A partir de geles de agarosa.....	186
4.4.11. Secuenciación de ADN.....	188
4.4.12. Ligación de fragmentos de restricción en vectores de clonación.....	189
4.4.12.1. Ligación a vectores de clonación	189
4.4.12.2. Defosforilación de vectores de clonación	189
4.4.13. Transferencia de ADN en células de <i>E. coli</i>	190
4.4.13.1. Preparación de células competentes con RbCl.....	190
4.4.13.2. Preparación de células competentes con CaCl ₂	191
4.4.13.3. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	191
4.4.14. Transferencia de ADN a células de <i>B. diazoefficiens</i> mediante conjugación.....	192
4.4.15. Generación de cepas mutantes por delección en fase sin marcador	194
4.4.16. Tratamiento con <i>ADNasa</i> de muestras de ARN	196
4.4.17. Reverso transcripción.....	198
4.4.18. Experimentos con microarrays	199
4.5. Sobre-expresión y purificación de proteínas.....	202
4.5.1. Sobre-expresión y purificación de la proteína FixK₂ mediante el empleo del sistema IMPACT (Intein-Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag)	202
4.5.1.1. Inducción de las células para la purificación a escala media	203
4.5.1.2. Fraccionamiento celular	204
4.5.1.3. Cromatografía de afinidad (Sistema IMPACT).....	204

4.5.1.4. Regeneración de la columna	206
4.5.2. Filtración en gel (Columnas PD-10).....	207
4.6. Ensayos de transcripción e interacción Proteína-ADN .	208
4.6.1. Ensayo de transcripción <i>in vitro</i> específico de ronda múltiple (IVT).....	208
4.6.1.1. Preparación de ADN molde.....	208
4.6.1.2. Reacción de transcripción	210
4.6.1.3. Marcadores de ARN.....	211
4.6.1.4. Electroforesis en gel de secuenciación urea/acrilamida	212
4.6.2. Resonancia de plasmón de superficie (Biacore)	214
4.6.3. Ensayo de cambio en la corrida electroforética (EMSA)	217
4.7. Caracterización molecular <i>in silico</i> de la proteína FixK₂	218
4.7.1. Análisis de las relaciones intra-intermoleculares en la proteína FixK ₂	218
4.7.2. Modelización molecular proteína-ligando	221
4.7.2.1. Puesta a punto de la estructura cristalina de FixK ₂ .	221
4.7.2.2. Obtención de puntos farmacofóricos mediante pyMDMix	222
4.7.2.3. Acoplamiento de alto rendimiento y detección virtual con rDock®	224
4.7.2.3.1. Definición del sistema	224
4.7.2.3.2. Generación de la cavidad	224
4.7.2.3.3. Acoplamiento dinámico o <i>Docking</i> y procesado bioinformático de ligandos	225

4.7.2.4. Desacoplamiento dinámico, <i>Dynamic Undocking</i> o <i>Duck</i>	226
4.8. Pruebas de infección de plantas de soja y análisis fisiológicos.....	227
4.8.1. Acondicionamiento y germinación de semillas.....	227
4.8.2. Cultivos de <i>B. diazoefficiens</i>	228
4.8.3. Inoculación de plantas de soja.....	229
4.8.4. Condiciones de cultivo y cosechado de plantas de soja	229
4.9. Métodos bioinformáticos	230
5. RESULTADOS	237
5.1. Fine-tuning modulation of oxidation-mediated posttranslational control of <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> FixK ₂ transcription factor	239
5.1.1. Abstract	241
5.1.2. Strains and plasmids construction.....	241
5.1.3. Assessing the impact of C183D exchange in FixK ₂ on <i>in vitro</i> transcription activation activity and protein-DNA interaction ability.....	243
5.1.4. <i>In vivo</i> effects of C183 to aspartic acid replacement in FixK ₂	249
5.1.5. Appraisal of the impact of the C183D mutation on a wider FixK ₂ -mediated control landscape.....	252
5.2. Caracterización del dominio de dimerización de la proteína FixK ₂	263
5.2.1. Introducción	265
5.2.2. Análisis <i>in silico</i> del dominio de dimerización de la proteína FixK ₂	265

5.2.3. Mutagénesis funcional del dominio de dimerización de FixK₂	269
5.2.3.1. Construcción de derivados de FixK₂ con intercambio a alanina de residuos relevantes	271
5.2.3.1.1. Construcción de plásmidos que expresan derivados FixK ₂ -Mxe-Inteína-CBD	272
5.2.3.1.2. Construcción de plásmidos para complementación <i>in trans</i> de una cepa Δ fixK ₂ de <i>B. diazoefficiens</i>	274
5.2.3.1.3. Construcción de cepas de <i>B. diazoefficiens</i> con mutaciones puntuales en el gen <i>fixK₂</i>	276
5.2.4. Caracterización <i>in vitro</i> de derivados de FixK₂	280
5.2.4.1. Expresión y purificación de derivados FixK ₂ -Mxe-Inteína-CBD	280
5.2.4.2. Determinación del estado oligomérico de los derivados de FixK ₂	283
5.2.4.3. Efecto de las mutaciones en la hélice de dimerización en la capacidad de interaccionar con ADN de FixK ₂	286
5.2.4.4. Ensayos de IVT de derivados de FixK ₂ sobre la transcripción del promotor <i>fixNOQP</i>	289
5.2.5. Caracterización <i>in vivo</i>	291
5.2.5.1. Ensayos con derivados de la cepa Δ fixK ₂ complementados <i>in trans</i>	291
5.2.5.1.1. Efecto de las mutaciones en la hélice de dimerización de FixK ₂ sobre la expresión de los genes <i>fixNOQP</i>	291
5.2.5.1.2. Efecto de las mutaciones en la hélice de dimerización de FixK ₂ sobre la capacidad de crecer en condiciones desnitrificantes de células de <i>B. diazoefficiens</i>	292
5.2.5.2. Ensayos con cepas de <i>B. diazoefficiens</i> con mutaciones puntuales en <i>fixK₂</i>	294

5.2.5.2.1. Efecto de las mutaciones en la hélice de dimerización de FixK ₂ sobre la expresión de los genes <i>fixNOQP</i>	294
5.2.5.2.2. Efecto de las mutaciones en la hélice de dimerización de FixK ₂ sobre la capacidad de crecer en condiciones desnitrificantes de células de <i>B. diazoefficiens</i>	296
5.2.5.2.3. Análisis de los niveles de derivados de FixK ₂ en células de <i>B. diazoefficiens</i>	298
5.3. Modelización molecular proteína-ligando para la identificación del cofactor de FixK₂	301
5.3.1. Introducción	303
5.3.2. Procesamiento de la estructura cristalina de FixK₂ ...	305
5.3.3. Identificación de puntos farmacofóricos	306
5.3.4. Generación de la cavidad	310
5.3.5. Acoplamiento dinámico (<i>docking</i>) y procesado bioinformático de ligandos (<i>clustering</i>)	315
5.3.6. Desacoplamiento dinámico (<i>dynamic undocking</i> o <i>duck</i>)	317
5.3.7. Análisis del papel del residuo H100 de FixK₂ en la función de la proteína en células de <i>B. diazoefficiens</i>	323
5.3.7.1. Construcción de una cepa de <i>B. diazoefficiens</i> que codifica un derivado H100A FixK₂	323
5.3.7.2. Efecto del intercambio H100A en FixK₂ en la capacidad de crecer en condiciones desnitrificantes de <i>B. diazoefficiens</i>	324
6. DISCUSIÓN	327
7. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	357
8. BIBLIOGRAFÍA	363
9. ANEXOS	397

9.1. Material suplementario	399
9.2. Abreviaturas y símbolos	456
9.3. Abreviaturas de especies.....	463
9.4. Índice de figuras	464
9.5. Índice de tablas	470

1



RESUMEN/SUMMARY

1. RESUMEN

El nitrógeno (N) es un nutriente esencial para todos los seres vivos. Aunque aproximadamente el 78% de la atmósfera es nitrógeno molecular (N₂), esta forma de N es inaccesible para la mayoría de los organismos y, por tanto, la disponibilidad del mismo es un factor limitante tanto para su crecimiento como para la producción de biomasa. En el ciclo biogeoquímico del N, los microorganismos diazotróficos son únicos por su capacidad de fijar N₂, convirtiéndolo así en formas biodisponibles y contribuyendo al equilibrio entre las moléculas de N orgánico y el retorno del N inorgánico a la atmósfera (revisado en Galloway et al., 2008, 2013; Martínez-Espinosa et al., 2011). Dentro de este ciclo, la fijación biológica de N₂ (FBN) y la desnitrificación representan dos procesos cruciales, implicados en la ganancia y pérdida de N combinado, respectivamente.

Los rizobios realizan una importante contribución a la FBN, la cual es relevante, tanto para la agronomía como para el medio ambiente en términos de sostenibilidad y seguridad alimentaria, ya que mantiene la productividad de los cultivos agrícolas, sin necesidad de recurrir al empleo de fertilizantes químicos. Los rizobios son bacterias del suelo que pertenecen a las α y β proteobacterias y pueden establecer asociaciones simbióticas con plantas leguminosas (revisado en Sprent et al., 2017). La fijación de N₂ la lleva a cabo la nitrogenasa, una metaloenzima compleja que cataliza la reducción de N₂ a amonio dentro de unas estructuras especializadas (nódulos) ubicadas en las raíces y, con menos frecuencia, en los tallos de la planta huésped (revisado en Dixon y Kahn, 2004; Terpolilli et al., 2012). Durante la interacción simbiótica, los rizobios tienen que responder a un amplio espectro de señales como el estrés oxidativo generado por el sistema de defensa de la

planta, o la baja tensión de oxígeno (O_2) dentro de los nódulos (microoxia) (revisado en Chang et al., 2009; Terpolilli et al., 2012; Damiani et al., 2016; Poole et al., 2018). La microoxia es una señal clave tanto para la expresión y funcionalidad de la nitrogenasa, como para la oxidasa terminal de alta afinidad *cbb₃*, esencial para la respiración bacteriana dentro de los nódulos (revisado en Dixon y Kahn, 2004; Torres et al., 2016; Poole et al., 2018; Rutten y Poole, 2019). Por tanto, teniendo en cuenta todos estos aspectos, los rizobios han tenido que desarrollar mecanismos de regulación para responder a estas señales y, en consecuencia, adaptar su fisiología al estado simbiótico.

Las especies de *Bradyrhizobium* son los diazótrofos más utilizados como inoculantes para cultivos de soja en la agricultura (Santos et al., 2019). *B. diazoefficiens*, el microorganismo modelo empleado en esta Tesis Doctoral, además de ser un fijador de N_2 eficiente (Delamuta et al., 2013), es la única especie, conocida hasta la fecha, capaz de llevar a cabo el proceso de desnitrificación de forma completa, tanto en condiciones de vida libre como en simbiosis (revisado en Mesa et al., 2004; Bedmar et al., 2005, 2014).

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 esenciales para el metabolismo microóxico, desnitrificante y simbiótico de esta bacteria (Sciotti et al., 2003; revisado en Fernández et al., 2016). La cascada FixLJ-FixK₂-NnrR se activa a una concentración de O_2 de aproximadamente $\leq 5\%$, donde el regulador de respuesta FixJ fosforilado induce la expresión de varios genes, incluido *fixK₂*. La proteína FixK₂ juega un papel crucial en esta red reguladora, ya que actúa como enlace con la cascada RegSR-NifA, y también está involucrada en la activación de un grupo numeroso de genes (más

de 300) (Mesa et al., 2008). Entre ellos, se encuentra el operón *fixNOQP*, que codifica la oxidasa terminal de alta afinidad por oxígeno *cbb₃*, genes implicados en la desnitrificación o genes reguladores (p. ej., *rpoN₁*, *fixK₁* y *nnrR*).

FixK₂ es un factor transcripcional bacteriano de tipo CRP/FNR (del inglés *cyclic AMP receptor protein/fumarate-nitrate reductase regulator*), proteínas capaces de reconocer y responder a una amplia variedad de señales ambientales e intracelulares (Körner et al., 2003; Dufour et al., 2010; revisado en Matsui et al., 2013). Este tipo de reguladores controlan funciones tan diversas como la fotosíntesis, la virulencia, la utilización de diferentes fuentes de carbono, la fijación de N₂ y diferentes rutas de transporte de electrones. A pesar de la baja similitud entre las proteínas de tipo CRP/FNR, sus dominios estructurales y funcionales están bien conservados. En particular, presentan un dominio amino-terminal para la detección de señales, una hélice α central requerida para la dimerización del homodímero activo y un dominio de unión a ADN con un motivo de tipo hélice-vuelta-hélice (HVH) en el extremo carboxilo. Este motivo es capaz de reconocer una secuencia de ADN palindrómica ubicada en distintas posiciones dentro de la región promotora de los genes regulados (revisado en Matsui et al., 2013). En particular, para FixK₂, la secuencia de reconocimiento de ADN consenso es un palíndromo imperfecto de 14 pares de bases (TTGA/C-N₆-T/GCAA, caja FixK₂) (Bonnet et al., 2013a; Cabrera et al., 2021).

Además de la inducción por el sistema FixLJ en respuesta a microoxia, la expresión del gen *fixK₂* esta auto-regulada negativamente a través de un mecanismo aún no identificado (Nellen-Anthamatten et al., 1998; Reutimann et al., 2010). Los niveles y actividad de FixK₂ también están controlados a nivel

postraduccional por oxidación (Mesa et al., 2009) y por proteólisis, tanto por escisión específica como por degradación general mediada por el sistema chaperona-proteasa ClpAP₁ (Bonnet et al., 2013b). Además, resultados recientes en nuestro grupo de investigación mostraron que *fixK₂* se encuentra dentro de un grupo de aproximadamente 90 genes regulados a nivel postranscripcional en respuesta a microoxia (Fernández et al., 2019).

La regulación postraduccional de FixK₂ por oxidación ocurre a nivel de su único residuo de cisteína (C183), próximo al dominio de unión a ADN (Mesa et al., 2009; Bonnet et al., 2013a). La oxidación de esta cisteína desencadena la inactivación de la proteína ya sea por la formación de dímeros a través de un enlace disulfuro intermolecular, o por la oxidación de la C183 a ácido sulfénico, sulfínico o sulfónico, lo cual inactiva la proteína por impedimento estérico y también por repulsión electrostática con sus promotores diana (Mesa et al., 2009; Bonnet et al., 2013a). En células de *B. diazoefficiens*, la oxidación de FixK₂ serviría para la inactivación de la proteína en respuesta a especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas, p. ej., en distintas etapas de la interacción simbiótica con plantas de soja (en el proceso de infección de los pelos radiculares, durante la respiración bacteriana y en la senescencia del nódulo) (revisado en Matamoros et al., 2003; Chang et al., 2009; Damiani et al., 2016).

En el primer capítulo de esta Tesis Doctoral, se ha avanzado en el conocimiento del mecanismo del control postraduccional por oxidación de FixK₂, tanto *in vitro* como *in vivo* (Parejo et al., 2022). Nuestra hipótesis de partida consistía en que, el intercambio del residuo C183 de FixK₂ por ácido aspártico, debido a su tamaño como a su carga, imitaría de forma permanente la sobreoxidación de la proteína (es decir, daría lugar a derivados de ácido sulfénico

y sulfínico de la cisteína). Esta modificación estable podría ayudar a comprender mejor las consecuencias de la oxidación de FixK₂ *in vivo*, especialmente la regulación asociada a la exposición a ROS durante la simbiosis.

Nuestros resultados indicaron que proteína C183D FixK₂ recombinante resultó tener una baja capacidad de unión a ADN y de activar la transcripción *in vitro* del promotor del operón *fixNOQP*, modelo de diana directa de FixK₂. Sin embargo, en una cepa de *B. diazoefficiens* que codifica el derivado C183D FixK₂, la expresión de una fusión *fixNOQP'*-*lacZ* en condiciones microóxicas fue similar a la que se detectó en la cepa parental. Tampoco se encontraron diferencias en el fenotipo simbiótico de ambas cepas. Curiosamente, tanto la expresión del gen *fixK₂* y como los niveles de proteína FixK₂ fueron mayores en la cepa que codifica el derivado C183D FixK₂. Este hecho, conjuntamente con los resultados del perfil transcripcional de la cepa que codifica la variante C183D FixK₂ cultivada microóxicamente, sugieren la existencia de una modulación que compensa la inactivación de FixK₂ por oxidación, lo cual se publicó recientemente por Parejo y colaboradores (2022).

La segunda parte de la sección Resultados de esta Tesis Doctoral, se ha centrado en la caracterización del dominio de dimerización de FixK₂. De acuerdo con la estructura del complejo FixK₂-ADN (Bonnet et al., 2013a), los residuos 128-154 de la proteína constituyen una hélice posiblemente involucrada en la interacción hidrofóbica entre los monómeros en las posiciones *a* y *d* de una espiral heptamérica (Bonnet et al., 2013a). De hecho, el alineamiento de la secuencia de la hélice de dimerización de FixK₂ con la de sus proteínas ortólogas CooA de *Rhodospirillum rubrum*, CRP y FNR, ambas de *Escherichia coli* (Passner et al., 2000; Moore y Kiley, 2001; Kerby et al., 2003), reveló que las posiciones *a* y *d*

estaban conservadas y comprendían 8 residuos que constituyen dicha interfaz hidrofóbica. En particular, en FixK₂, 7 de estos 8 residuos, con la excepción de T138, son aminoácidos hidrófobos, es decir, V128, A131, W135, L142, A145, M149 y L152. Además, un análisis *in silico* reveló que otros dos residuos, E141 y E146, ubicados en los planos axiales *g* y *e*, respectivamente, contribuyen potencialmente a las interacciones intermoleculares negativas, que también podrían tener una función en la dimerización de FixK₂.

Para identificar los residuos clave implicados en la dimerización de FixK₂, se construyeron una serie de plásmidos de expresión de derivados con sustituciones a alanina en los residuos W135, T138, E141, L142, E146 y M149. Para evitar la formación de dímeros por formación de puentes disulfuro que podrían interferir con nuestros resultados, todos estos derivados proteicos proceden de la proteína C183S FixK₂, la cual es insensible a la oxidación. Los ensayos de cromatografía de exclusión molecular indicaron que las mutaciones W135A, L142A, E146A y M149A aumentaron la proporción de monómero, mientras que la mutación E141A favoreció la formación de la forma dimérica. El comportamiento del derivado T138A fue similar al de la proteína de referencia C183S FixK₂.

También se analizó si estas mutaciones y los cambios en el estado oligomérico de FixK₂ que originan, podrían afectar la capacidad de unión a ADN y la actividad *in vitro* de la proteína. En general, se encontró una correlación entre una mayor proporción de monómero, una menor capacidad para interactuar con la caja FixK₂ genuina del promotor *fixNOQP*, y una menor capacidad para activar la transcripción en colaboración con la ARN polimerasa de *B. diazoefficiens* en ensayos de transcripción *in vitro* (IVT). Este argumento es válido para los derivados W135A, L142A y M149A,

pero no a la variante E146A, que resultó ser más competente tanto en la interacción proteína-ADN como en la activación de la transcripción. Sorprendentemente, la proteína E141A, a pesar de que es predominantemente dimérica, mostró una capacidad reducida para formar un complejo proteína-ADN estable y para activar la transcripción del promotor de *fixNOQP*.

En contraste con los resultados *in vitro*, las mutaciones W135A, E141, L142A y M149A en FixK₂ no afectaron la expresión de una fusión *fixNOQP'-lacZ* en células de *B. diazoefficiens* cultivadas en condiciones microóxicas, así como la capacidad de crecer en condiciones desnitrificantes. Esto indica la existencia de mecanismos compensatorios *in vivo* que dan lugar al fenotipo parental, similar a lo observado para la variante C183D FixK₂ (Parejo et al., 2022). Esta hipótesis se pudo confirmar para la variante M149A FixK₂, en la que los niveles de proteína FixK₂ estaban incrementados con respecto a la cepa parental.

El objetivo del último capítulo de esta Tesis Doctoral fue la identificación del posible cofactor de FixK₂. Dentro de la familia de proteínas tipo CRP/FNR, la respuesta a los estímulos ambientales e intracelulares resulta de la interacción entre una molécula de señalización y el dominio sensor. Esto induce un cambio conformacional necesario para la unión del dímero activo a la secuencia de reconocimiento ubicada en los promotores de los genes regulados (revisado en Browning y Busby, 2004). La percepción de la señal puede ser a través de una respuesta directa por una modificación de la proteína o mediante la unión a un grupo prostético o a una molécula efectora (revisado en Matsui et al., 2013).

A diferencia de otros miembros de la familia CRP/FNR de factores transcripcionales, no se ha identificado el cofactor

implicado en la modulación de la actividad de FixK₂ y además, parece ser que no es necesario, de acuerdo a una serie de evidencias (revisado en Fernández et al., 2016): (i) la secuencia de FixK₂ carece de un sitio conservado de unión de cofactor; (ii) proteína FixK₂ recombinante purificada de células de *E. coli* cultivadas en condiciones óxicas es activa *in vitro* sin la necesidad de una molécula efectora conocida. Si bien, para para activar la transcripción, requiere de concentraciones superiores a las empleadas en ensayos realizados con otros miembros de la familia (Mesa et al., 2005); (iii) la estructura del complejo FixK₂-ADN (Bonnet et al., 2013a) reveló la presencia de una cavidad cargada negativamente en cada monómero.

La modelización proteína-ligando basada en la estructura de FixK₂-ADN (Bonnet et al., 2013a) que se realizó en el último capítulo de esta Tesis Doctoral, ha permitido identificar posibles cofactores involucrados en la modulación de la actividad de FixK₂, así como el residuo de la proteína mayormente implicado en dicha interacción. Para ello se empleó como modelo la proteína CRP de *E. coli* con su cofactor AMPc. Las herramientas computacionales aplicadas revelaron al residuo H100 de FixK₂ como candidato para interactuar con el cofactor; sin embargo, su papel no se ha podido confirmar *in vivo* hasta la fecha. Finalmente, se aplicó la combinación de acoplamiento dinámico, agrupamiento basado en similitudes estructurales y desacoplamiento dinámico, para seleccionar entre 51000 moléculas de soja y rizobios disponibles en las bases de datos. Este proceso secuencial, junto con un ajuste manual basado en diferentes criterios (mejor acoplamiento en la cavidad, similitud con los cofactores de otros ortólogos y disponibilidad comercial), nos permitió seleccionar un grupo de 27 metabolitos como posibles ligandos de FixK₂ para futuros ensayos *in vitro*.

En resumen, los resultados de esta Tesis Doctoral contribuyen a una mejor comprensión del mecanismo molecular de FixK₂ de *B. diazoefficiens*, una proteína reguladora clave para el metabolismo microóxico, simbiótico y desnitrificante en esta bacteria. En concreto, se ha podido contribuir al avance en el conocimiento de su control postraducciona l por oxidación, la caracterización de su dominio de dimerización y la implementación de un enfoque *in silico* para identificar el cofactor de FixK₂.

1. SUMMARY

Nitrogen (N) is an essential nutrient for all living organisms on Earth. Although approximately 78% of the atmosphere is molecular nitrogen (N₂), this reservoir is inaccessible to most organisms, and consequently, N availability is a limiting factor for both growth and biomass production. In the biogeochemical N cycle, diazotrophic microorganisms are unique for their capacity to fix N₂, thus converting it in bioavailable forms and contributing in the balance between organic N molecules and the return of inorganic N to the atmosphere (reviewed in Galloway et al., 2008, 2013; Martínez-Espinosa et al., 2011). Within this cycle, biological nitrogen fixation (BNF) and denitrification represent two crucial pathways, involved in the gain and loss of combined N, respectively.

Rhizobia make an important contribution to the BNF, which is relevant both for agronomy and for the environment in terms of sustainability and food security, since it reduces the need for chemical fertilizers to maintain the productivity of agricultural crops. These soil bacteria belong to the α - and β -proteobacteria, and they can establish symbiotic associations with leguminous plants (reviewed in Sprent et al., 2017). N₂ fixation is carried out by the nitrogenase, a complex metalloenzyme which catalyzes the reduction of N₂ to ammonium within specialized structures (nodules) located in the roots and less frequently, in the stems of the host plant (reviewed in Dixon and Kahn, 2004; Terpolilli et al., 2012). During the symbiotic interaction, rhizobia must face and subsequently, adapt their physiology to a spectrum of signals, such as the oxidative stress generated by the plant defense system or the low free oxygen (O₂) tension within the nodules (microoxia) (reviewed in Chang et al., 2009; Terpolilli et al., 2012; Damiani et al., 2016; Poole et al., 2018). Microoxia has been recognized as a key signal for the expression

and functionality of nitrogenase and also of the high-affinity terminal oxidase *cbb₃*, essential for bacterial respiration inside root nodules (reviewed in Dixon and Kahn, 2004; Torres et al., 2016; Poole et al., 2018; Rutten and Poole, 2019). In this scenario, rhizobia must have developed regulatory mechanisms to cope with these signals.

Bradyrhizobium species are the most widely used diazotrophs as inoculants for soybean crops in agriculture (Santos et al., 2019). *B. diazoefficiens*, the model microorganism employed in this PhD Thesis, in addition to being an efficient nitrogen fixer (Delamuta et al., 2013), is the only rhizobial species known to date capable of carrying out a complete denitrification, both under free-living and symbiotic conditions (reviewed in Mesa et al., 2004; Bedmar et al., 2005, 2014).

In this bacterium, there is a complex regulatory network formed by two interlinked cascades (FixLJ-FixK₂-NnrR and RegSR-NifA) involved in the expression of essential genes for microoxic, denitrifying and symbiotic growth (Sciotti et al., 2003; reviewed in Fernández et al., 2016). The FixLJ-FixK₂-NnrR cascade is activated at a O₂ concentration at about ≤5%, where phosphorylated FixJ response regulator induces the expression of several genes, including *fixK₂*. The FixK₂ protein plays a crucial role in this regulatory network, since it acts as a link with the RegSR-NifA cascade, and is also involved in the activation of hundreds of genes (Mesa et al., 2008). Among them, it is the *fixNOQP* operon, which encodes the high-affinity terminal oxidase *cbb₃*, genes involved in denitrification or regulatory genes (such as *rpoN₁*, *fixK₁* and *nnrR*).

FixK₂ is a member of the cyclic AMP receptor protein (CRP)/fumarate-nitrate reductase regulator (FNR) superfamily of bacterial transcriptional factors that includes proteins that respond unevenly to a broad variety of environmental and intracellular

signals (Körner et al., 2003; Dufour et al., 2010; reviewed in Matsui et al., 2013). This class of proteins has been reported to control functions such as photosynthesis, virulence, utilization of different carbon sources, N₂ fixation, and various electron transport pathways. CRP/FNR-like regulators have a rather low similarity, but they preserve a typical, well-conserved, domain structure. This protein architecture is formed by an amino-terminal signal-sensing domain linked through an α -helix (required for dimerization of the active homodimer) to a helix-turn-helix (HTH) DNA-binding domain at the carboxy-terminus. This HTH motif recognizes a palindromic DNA sequence located at distinct positions within the promoter region of regulated genes (reviewed in Matsui et al., 2013). In particular, for FixK₂, the consensus DNA recognition sequence is a 14 base pair imperfect palindrome (TTGA/C-N₆-T/GCAA, FixK₂ box) (Bonnet et al., 2013a; Cabrera et al., 2021).

In addition to induction by the FixLJ system in response to microoxia, *fixK₂* gene expression is self-repressed by its own product through an as yet unidentified mechanism (Nellen-Anthamatten et al., 1998; Reutimann et al., 2010). FixK₂ is also controlled at the posttranslational level by oxidation (Mesa et al., 2009) and by proteolysis, both by specific cleavage and general degradation mediated by the ClpAP₁ chaperone-protease system (Bonnet et al., 2013b). Furthermore, recent results of our research group showed that *fixK₂* is within a group of approximately 90 genes regulated at the posttranscriptional level in response to microoxia (Fernández et al., 2019).

The oxidation-mediated posttranslational regulation of FixK₂ occurs at the level of its single cysteine residue (C183), located in the vicinity of the DNA-binding domain (Mesa et al., 2009; Bonnet et al., 2013a). Oxidation of this cysteine triggers inactivation of the

protein either by dimer formation through an intermolecular disulfide bond, or by modification of cysteine to sulfenic, sulfinic, or sulfonic acid variants, which inactivates the protein by steric hindrance and also by electrostatic repulsion with target promoters (Mesa et al., 2009; Bonnet et al., 2013a). *In vivo*, the posttranslational oxidation of FixK₂ could be relevant for the rapid cessation of transcriptional activity in response to reactive oxygen species (ROS) produced at various stages of symbiotic interaction with soybean plants (at the early stage of root hair infection, during endosymbiotic respiration and at late stage of nodule senescence) (reviewed in Matamoros et al., 2003; Chang et al., 2009; Damiani et al., 2016).

In the first chapter of this PhD Thesis, progress has been made to improve our understanding of the underneath mechanism of the oxidation-mediated posttranslational control of the FixK₂ transcription factor, both *in vitro* and *in vivo* (Parejo et al., 2022). The hypothesis was that if C183 in FixK₂ was exchanged to aspartic acid, this semi-conservative replacement (due to both its size and charge) would permanently mimic FixK₂ overoxidation (i.e., sulfenic/sulfinic acid cysteine derivatives). This stable modification might help to better unravel the consequences of FixK₂ oxidation *in vivo*, especially regulation associated with transient bursts of ROS during symbiosis.

We observed that purified C183D FixK₂ protein showed both low DNA binding and *in vitro* transcriptional activation from the promoter of the *fixNOQP* operon, the model FixK₂ target. However, in a *B. diazoefficiens* strain coding for C183D FixK₂, expression of a *fixNOQP'*-*lacZ* fusion was similar to that in the wild type, when both strains were grown microoxically. The C183D FixK₂ encoding strain also showed a wild-type phenotype in symbiosis with soybeans, and increased *fixK₂* gene expression levels and FixK₂ protein abundance

in cells. These two latter observations, together with the whole-genome transcriptional profile of the microoxically cultured C183D FixK₂ encoding strain, suggest the existence of a fine-tuning regulatory strategy to compensate for FixK₂ inactivation in response to cellular oxidizing conditions. Altogether, these results were recently published by Parejo and coworkers (2022).

In the second part of the Results section of this PhD Thesis, we focused on the characterization of the dimerization domain of FixK₂. According to the structure of FixK₂-DNA complex (Bonnet et al., 2013a), residues 128-154 of the protein constitute a helix possibly involved in the hydrophobic interaction between monomers at positions *a* and *d* of a coiled-coil heptad repeat (Bonnet et al., 2013a). In fact, the sequence alignment of the FixK₂ dimerization helix with those of its orthologous proteins CooA from *Rhodospirillum rubrum*, CRP and FNR, both from *Escherichia coli* (Passner et al., 2000; Moore and Kiley, 2001; Kerby et al., 2003), revealed that positions *a* and *d* were rather well-conserved, comprising 8 residues that constitute such an hydrophobic interface. In particular, in FixK₂, 7 out of these 8 residues, with the exception of T138, are hydrophobic amino acids, i.e., V128, A131, W135, L142, A145, M149 and L152. Furthermore, an *in silico* analysis revealed that two other residues, E141 and E146, located in the *g* and *e* axial planes, respectively, potentially contribute to negative intermolecular interactions, which might also affect FixK₂ dimerization.

To unveil the key residues involved in FixK₂ dimerization, we constructed a battery of plasmids to individually overexpress and purify derivatives with alanine substitutions at residues W135, T138, E141, L142, E146 and M149. All these protein variants derived from an oxidation-insensitive C183S FixK₂ protein, to avoid the formation of disulfide-bridged dimers which could interfere with our results.

Size exclusion chromatography assays showed that mutations W135A, L142A, E146A and M149A increased the proportion of the monomer, while mutation E141A favored the formation of the dimeric form. The behavior of the T138A derivative was similar to that of the reference C183S FixK₂ protein.

We also analyzed how these changes in the oligomeric state of FixK₂ might affect the DNA binding capacity and *in vitro* activity of the protein. In general, we found a correlation between an increased monomer population, reduced capacity to interact with the genuine FixK₂ box at the *fixNOQP* promoter and diminished ability to activate transcription in collaboration with *B. diazoefficiens* RNA polymerase in an *in vitro* transcription (IVT) activation assay. This argument applied for the W135A, L142A, and M149A derivatives, but not for the E146A variant which resulted to be more competent in both, protein-DNA interaction and transcription activation. Remarkably, the E141A protein, in despite of the fact that is predominantly a dimer, showed a reduced capacity to form a stable protein-DNA complex and to activate transcription from the *fixNOQP* promoter.

In contrast with the *in vitro* results, W135A, E141, L142A, and M149A mutations in FixK₂ led to wild-type values of β -galactosidase activity of a *fixNOQP'*-*lacZ* fusion in *B. diazoefficiens* cells cultured under microoxic conditions as well as the capacity to grow in denitrifying conditions. This is an indication of the existence of alternative compensatory mechanisms *in vivo* that resulted in the same phenotype of that of the parental protein. This hypothesis was confirmed for the M149A FixK₂ variant, since the protein abundance in *B. diazoefficiens* cells was higher than of that of the reference protein, similarly as observed for the C183D FixK₂ variant (Parejo et al., 2022).

In the last chapter of this PhD Thesis, we focused on the identification of a putative cofactor for FixK₂. Within the CRP/FNR-type proteins family, the response to environmental and intracellular stimuli results from the interaction between a signaling molecule and the sensing domain. This induces a conformational change required for binding of the active dimer to the recognition sequence located in the promoters of regulated genes (reviewed in Browning and Busby, 2004). Signal perception can be through a direct response via a chemical modification of the protein or by binding to a specific prosthetic group or effector molecule (reviewed in Matsui et al., 2013).

Unlike other members of the CRP/FNR superfamily, the existence of a cofactor in the modulation of FixK₂ transcriptional activation is unknown and apparently not needed according to several hints (reviewed in Fernández et al., 2016): (i) FixK₂ amino acid sequence lacks a predicted binding site for a cofactor; (ii) Purified protein from oxically grown FixK₂-overproducing *E. coli* cells is active as a homodimer in an IVT activation assay without a recognizable co-activator. However, it apparently needs higher concentrations for promoter activation in comparison to other family members (Mesa et al., 2005, 2009). Furthermore, the FixK₂-DNA complex structure (Bonnet et al., 2013a) unveiled the presence of one negatively charged cavity per monomer.

A protein-ligand modeling based on FixK₂-DNA structure (Bonnet et al., 2013a) performed in the last chapter of this PhD Thesis, allowed us to predict both, putative protein ligands and cofactors involved in the modulation of FixK₂ activity, employing as a model the interaction of *E. coli* CRP with its cofactor, cAMP. In this regard, a series of computational tools unveiled residue H100 of FixK₂ as candidate to interact with the putative cofactor; however, its

role could not be confirmed *in vivo* so far. Finally, the combination of docking, clustering based on structural similarities and dynamic undocking was applied to screen 51,000 molecules from soybean and rhizobia. This sequential process together with a manual refining based on different criteria (better fitting to the cavity, cofactors similarity with other orthologs, and commercial availability) allowed us to select a reduced group of 27 metabolites as potential FixK₂ ligands for future *in vitro* assays.

In summary, the results of this PhD Thesis contribute to the better understanding of the molecular mechanism of FixK₂ from *B. diazoefficiens*, a key regulatory protein for the microoxic, symbiotic, and denitrifying lifestyles of this bacterium. Specifically, progress was made on its post-translational control by oxidation, the characterization of its dimerization domain and the implementation of an *in silico* approach to identify the putative cofactor for FixK₂.

2

INTRODUCCIÓN

2. Introducción

2.1. El ciclo del Nitrógeno

El nitrógeno (N), además de ser el elemento predominante de la atmósfera terrestre, se considera un bioelemento fundamental para la vida, ya que constituye el 6% en masa de la materia orgánica y forma parte de biomoléculas como cofactores, bases nitrogenadas y aminoácidos, esenciales para la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas. La biodisponibilidad del N representa un factor limitante para el desarrollo de la biomasa, dado que puede estar presente en el medio ambiente en numerosos compuestos químicos y diferentes estados de oxidación, tales como nitrógeno molecular (N_2), óxido nitroso (N_2O), óxido nítrico (NO), nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-), hidroxilamida (NH_2OH) o amonio (NH_4^+) (Richardson y Watmough, 1999).

El mayor reservorio de N en la Tierra se encuentra en la atmósfera en forma de N_2 , representando el 78% de la misma. El N_2 se caracteriza por presentar un triple enlace covalente, lo cual lo convierte en una molécula prácticamente inerte al no poder ser asimilado por la mayoría de los seres vivos. La energía de disociación del N_2 es extremadamente alta, $945,41 \text{ KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, por lo que su transformación en compuestos asimilables de forma artificial resulta poco sostenible al requerir el empleo de sofisticados catalizadores y altas temperaturas (Earnshaw y Greenwood, 1997).

El aporte principal de N de la atmósfera a la biosfera se produce mediante la fijación biológica del N_2 a NH_4^+ (FBN) (Figura 2.1.1), en condiciones simbióticas o en vida libre (Newton, 2007), lo cual representa el 60% del aporte total, y sólo algunos microorganismos, llamados diazotrofos (eubacterias y arqueas), son capaces de llevarlo a cabo y, en consecuencia, hacerlo bioasimilable para el

resto de los seres vivos. Los microorganismos también participan en otros procesos del ciclo del N, es decir en la interconversión de las especies de N en sus estados oxidados y reducidos (Figura 2.1.1) (Martínez-Espinosa et al., 2011; Stein y Klotz, 2016).



Figura 2.1.1. Representación ilustrativa del ciclo biogeoquímico del N. Adaptación de Daims et al., 2016. asim., asimilativa, desam., desasimilativa.

El NH₄⁺ que se incorpora al ciclo del N mediante la FBN puede seguir diferentes vías. Por un lado, está la vía asimilativa y, por otro, están las rutas respiratorias óxicas (nitrificación) o anóxicas (anam-mox).

La asimilación del NH_4^+ consiste en la integración del N en macromoléculas carbonadas mediante dos vías posibles, en menor medida por la glutamato deshidrogenasa (GDH) y la alanina deshidrogenasa, y en mayor medida por la glutamina sintetasa-glutamato sintasa (GS-GOGAT) (Moreno-Vivián et al., 2011). Otra vía asimilativa de compuestos nitrogenados es la asimilación del NO_3^- (la reducción de NO_3^- a NO_2^- , y de NO_2^- a NH_4^+) (Moreno-Vivián y Flores, 2007, Tischner y Kaiser, 2007). De hecho, ésta es la que mayormente se utiliza para la asimilación de N por los organismos.

Como se ha mencionado, el NH_4^+ puede incorporarse a rutas metabólicas respiratorias. La nitrificación (Figura 2.1.1) es un proceso de respiración en condiciones óxicas que tiene lugar en dos etapas. En la primera, el NH_4^+ se oxida a NO_2^- por la enzima amonio monooxigenasa, y a continuación, en una segunda etapa, el NO_2^- se oxida a NO_3^- por la nitrito oxido-reductasa (Ferguson et al., 2007). Hasta hace poco, se pensaba que la oxidación de NH_4^+ y NO_2^- se llevaba a cabo de forma independiente por bacterias o arqueas oxidantes de NH_4^+ (BOA y AOA), y por bacterias oxidantes de NO_2^- (BON). Recientemente, se ha demostrado la existencia de oxidaciones directas de NH_4^+ a NO_3^- (nitrificación commamox, Figura 2.1.1) para el género *Nitrospira* (Kits et al., 2017). Otra vía metabólica respiratoria posible para el NH_4^+ resultante de la FBN es la conocida como anammox (Figura 2.1.1), en la cual se lleva a cabo una oxidación del mismo en condiciones anóxicas utilizando al NO_2^- como agente oxidante y produciendo N_2 (Strous et al., 1999; Jetten et al., 2009).

Además de las vías mencionadas anteriormente, los compuestos oxidados del N pueden ser utilizados como aceptores terminales de electrones en cadenas respiratorias cuando el oxígeno (O_2) es un factor limitante. Esta ruta se conoce como desnitrificación (Figura

2.1.1), en la que el NO_3^- se reduce de forma secuencial a NO_2^- , NO , N_2O y por último a N_2 , retornando éste a la atmósfera y cerrando el ciclo del N junto con el proceso anammox (Van Spanning et al., 2007; Stein y Klotz, 2016).

Alternativamente, en condiciones de anoxia, las bacterias y los hongos pueden reducir el NO_3^- , a NH_4^+ , vía NO_2^- en el proceso que se conoce como reducción desasimilativa del nitrato (DNRA) ó amonificación del nitrato/nitrito (Figura 2.1.1; Pandey et al., 2020).

Finalmente, otra vía a considerar es la amonificación, en la que, a diferencia de la asimilación, recicla los productos de desecho de los animales o la materia orgánica en descomposición, siendo de nuevo transformados en NH_4^+ por bacterias y hongos descomponedores.

Según lo expuesto, el equilibrio en el ciclo del N está basado en la FBN y la DNRA que aportan N bioasimilable y las rutas de desnitrificación y anammox, como vías de retorno de N_2 a la atmósfera. No obstante, existen otras vías no biológicas de entrada, como son los volcanes, rayos y afloramientos geológicos, así como aportes en forma antrópica, esencialmente NO_3^- , como consecuencia del uso indiscriminado de fertilizantes químicos que doblan prácticamente la capacidad natural de la FBN (Canfield et al., 2010). Estudios recientes han revelado que el incremento de compuestos nitrogenados de origen antrópico, altera el equilibrio en hasta 130 millones de toneladas de N anuales, imposibles de eliminar biológicamente vía desnitrificación y anammox, incrementado la concentración de NO_3^- en aguas, suelos y sedimentos, convirtiendo dichos compuestos en agentes contaminantes, dando lugar a un serio problema medioambiental (Galloway et al., 2008).

2.1.1. Efectos antrópicos en el ciclo del N

El incremento de la población mundial y el desarrollo tecnológico ha tenido un impacto sin precedentes sobre el medio ambiente. De hecho, el consumo de combustibles fósiles, y el uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados sintéticos en suelos agrícolas (Galloway et al., 2013), han ocasionado un efecto negativo sobre el ciclo del N. Esta alteración ha dado lugar a efectos negativos sobre el clima, los ecosistemas y la salud pública, a expensas de poder proveer alimentos para la población humana.

Los impactos sobre el cambio climático son debidos principalmente a la acumulación de NO_3^- en la superficie terrestre. Estos compuestos pueden regresar a la atmósfera como NO y N_2O . Este último junto al dióxido de carbono (CO_2) y el metano (CH_4), son los principales gases de efecto invernadero (GEIs), los cuales se incrementan en un 0,25% cada año. Además, el N_2O con una capacidad de calentamiento global casi 300 veces superior al CO_2 , es el tercer GEI más importante, y contribuye al calentamiento global agotando sustancialmente el ozono (O_3) estratosférico (Ravishankara et al., 2009; Thompson et al., 2019). Así mismo, los compuestos nitrogenados y la quema de biomasa representan un factor clave en la formación de O_3 troposférico, el cual origina multitud de efectos negativos sobre los seres vivos (Haagen-Smit et al., 1953; Galloway et al., 2013). Además, debemos considerar que el NO puede ser oxidado a dióxido de nitrógeno (NO_2), el cual puede formar ácido nitroso (HNO_2) y ácido nítrico (HNO_3), precipitando como constituyentes de la lluvia ácida (Zumft, 1997). Otra molécula capaz de precipitar con el agua de lluvia es el amoníaco (NH_3), que se ha triplicado en la atmósfera en los últimos años disminuyendo la calidad del agua (Harper et al., 2010).

En relación a los efectos negativos sobre ecosistemas terrestres y acuáticos, el aumento de las concentraciones de N en los suelos agrícolas promueve los procesos de eutrofización y a la consecuente proliferación excesiva de algas y reducción de la biodiversidad en medios acuáticos, dando lugar a las conocidas “zonas muertas” (Howarth, 2004; Selman et al., 2008). Esto es debido a un incremento de la fotosíntesis, ocasionando alteraciones en el funcionamiento de los ecosistemas, así como en su estructura y composición.

Con respecto a los efectos causados sobre la salud pública, el principal desencadenante de afecciones en humanos es la acumulación y contaminación de aguas superficiales y subterráneas por compuestos nitrogenados, especialmente NO_3^- de origen agrario. El consumo de estas aguas puede dar lugar a afecciones respiratorias agudas predominantemente en niños, y tumores gástricos (Renaissance et al., 2007) asociados a la formación endógena de compuestos tóxicos *N*-nitrosados potencialmente mutagénicos (Moriya et al., 2002; Lijima et al., 2003; Van Grinsven et al., 2010). También se ha asociado al desarrollo de metahemoglobinemia, que causa el síndrome “blue baby” especialmente en niños y adultos de más de 45 años (Gupta et al., 2002). Estos efectos negativos también se han descrito en animales. Mientras que en los rumiantes se desarrolla metahemoglobinemia, los animales monogástricos presentan gastritis severa (Bruning-Fann y Kaneene, 1993).

Por todas estas razones, es imprescindible asumir estrategias interdisciplinarias que conduzcan a la reducción del uso de compuestos nitrogenados sintéticos y las emisiones de N_2O a la atmósfera, con objeto de mitigar los impactos sobre el ciclo del N, y en consecuencia sobre el cambio climático, la salud pública, la ganadería y la seguridad alimentaria.

2.2. Fijación Biológica de Nitrógeno

La FBN representa el proceso biológico más relevante para la recuperación de N biodisponible para los seres vivos, ya que incorpora al ciclo del N en torno a 122 millones de toneladas cada año, de los cuales, entre 50 y 70 millones de toneladas corresponden a entornos agrícolas (Herridge et al., 2008). Además, el N proporcionado mediante FBN es menos propenso a la lixiviación y la volatilización, ya que se utiliza *in situ*. Por ello, este proceso compensa las pérdidas asociadas a otros procesos como la desnitrificación y reduce la necesidad de aporte de fertilizantes nitrogenados de origen antrópico a los cultivos, favoreciendo tanto un equilibrio en el ciclo del N como un desarrollo en la agricultura sostenible. La FBN también tiene un papel importante en el ciclo del N marino y puede influir en la capacidad de la biota oceánica para secuestrar el CO₂ atmosférico.

Los organismos que realizan la reducción N₂ a NH₄⁺ se denominan diazótrofos y comprenden arqueas (principalmente metanógenos) y grupos filogenéticos bacterianos como bacterias verdes del azufre, firmibacterias, actinomicetos, cianobacterias y todas las subdivisiones de proteobacterias. La capacidad de fijar N₂ es compatible con una amplia gama de fisiologías que incluyen: heterótrofos aeróbicos (por ejemplo, *Azotobacter*), anaerobios facultativos (p. ej., *Klebsiella*) o anaeróbicos (p. ej., *Clostridium*); fotótrofos anoxigénicos (p. ej., *Rhodobacter*) u oxigénicos (p. ej., *Anabaena*); y quimolitotrofos (p. ej., *Leptospirillum ferrooxidans*). Los diazótrofos se encuentran en una amplia variedad de hábitats, incluyendo formas de vida libre en suelo y agua, simbiosis asociativas con pastos, asociaciones simbióticas en intestinos de termitas, asociaciones con plantas actinorrícicas leñosas, simbiosis de cianobacterias con

plantas y simbiosis en nódulos de raíces de leguminosas (Dixon y Kahn, 2004).

La familia *Leguminosae* ó *Fabaceae* es la tercera familia de plantas con flores más grande, contiene 19.400 especies y representa más del 8% de las plantas con flores del mundo (a fecha de 27 de octubre de 2022). La familia de las leguminosas tiene 730 géneros y actualmente se divide en tres subfamilias: *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* y *Papilionoideae*. Incluye lentejas, guisantes, frijoles, maní y soja, y es muy importante como fuente de alimento debido a su alto contenido en proteínas. Solo es superado por las gramíneas (cereales) en importancia agrícola, y muchas especies también se utilizan para forraje, ensilaje y abono verde, y constituye un componente importante para la alimentación animal forrajera.

Las especies de leguminosas se encuentran en todo el mundo en una amplia variedad de hábitats que incluyen ambientes áridos y selvas tropicales, y varían en tamaño desde pequeñas hierbas hasta enormes árboles de bosques tropicales (Carpena et al., 2006; Rodiño et al., 2011).

La soja (*Glycine max*), se caracteriza entre el resto de legumbres por contener un 40% de proteína y 21% de aceite, además de isoflavonas. Por lo tanto, la soja es el cultivo proteínico/oleaginoso más cultivado en el mundo, con más de 200 millones de toneladas producidas al año. Los principales países productores son EE. UU., Brasil, Argentina, China, India, Paraguay y Canadá, con Brasil como líder mundial (Figura 2.2.1). Los países importantes para la importación de soja son China, la UE, Japón, México, Taiwán, Tailandia, Indonesia, Egipto, Turquía y Corea del Sur.

La soja procesada se utiliza en una amplia variedad de productos, como por ejemplo el aceite de soja, utilizado en productos

alimenticios y en productos industriales como plásticos y biodiesel, o lecitina, un emulsionante y lubricante natural utilizado para productos farmacéuticos y como aditivo alimentario (www.soystats.com). Además, tras la extracción del aceite de soja, se procesan muchos productos comestibles con alto contenido proteico, como sustitutos de carne o alimentos para animales.

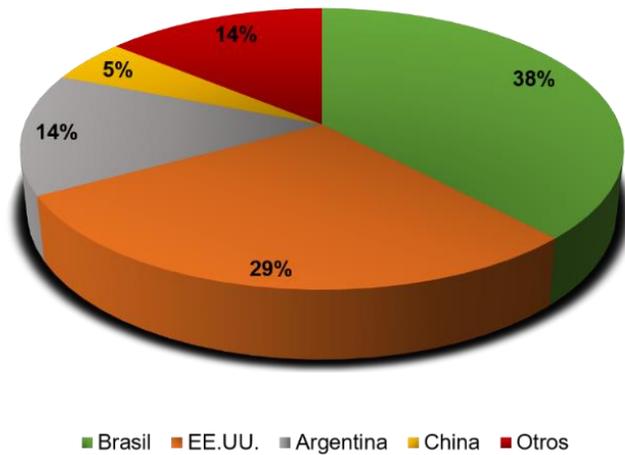


Figura 2.2.1. Representación gráfica de la producción de soja a nivel mundial. Se indican los cuatro países del mundo más importantes en la producción y exportación de soja. Fuente: www.soystats.com. Año 2019-2020.

2.2.1. Simbiosis *Rhizobium*-leguminosa

El género *Rhizobium*, pertenece a un grupo de α -proteobacterias dentro de la familia *Rhizobiaceae* que tienen la capacidad única de infectar y establecer simbiosis con plantas leguminosas.

La interacción simbiótica *Rhizobium*-leguminosa se inicia cuando la bacteria infecta el pelo radicular y el huésped forma nódulos en la raíz donde se producirá la fijación de N₂ (Denarie y Cullimore, 1993). Para que esto suceda, el huésped primero debe identificar a los rizobios como beneficiosos (Figura 2.2.2, A). Las plantas secretan isoflavonoides que son reconocidos por bacterias compatibles. Se unen y activan las proteínas bacterianas NodD, que son miembros de la familia LysR de reguladores transcripcionales, lo que da como resultado la inducción de los genes de nodulación *nod* (Peck et al., 2006). Los genes *nod* codifican proteínas que sintetizan y exportan lipo-quitto-oligosacáridos específicos llamados factores Nod (NF). Los NF provocan tanto la organogénesis de los nódulos como la deformación del pelo de la raíz en la planta (revisado en Oldroyd et al., 2011), activando el proceso de infección e iniciando la división celular en la corteza de la raíz (Figura 2.2.2, A).

Las bacterias infectan las raíces de las plantas a través de los pelos radiculares o por grietas (Sprent, 2009); sin embargo, el mecanismo más común y mejor estudiado es el primero, el cual es el que tiene lugar en leguminosas como la soja, el guisante y la habichuela. Los NF no son las únicas señales bacterianas necesarias para la simbiosis, los rizobios también deben producir polisacáridos superficiales, como exopolisacáridos (EPS), lipopolisacáridos (LPS) o polisacáridos capsulares (KPS) (Gonzalez et al., 1996; Pellock et al., 2000; D'Haese et al., 2004), y al menos, en el caso de EPS y LPS, parece que su papel en la infección es suprimir las reacciones de defensa del huésped, como la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los hilos de infección (Frayse et al., 2003; Scheidle et al., 2005; Jones et al., 2008; Terpolilli et al., 2012).

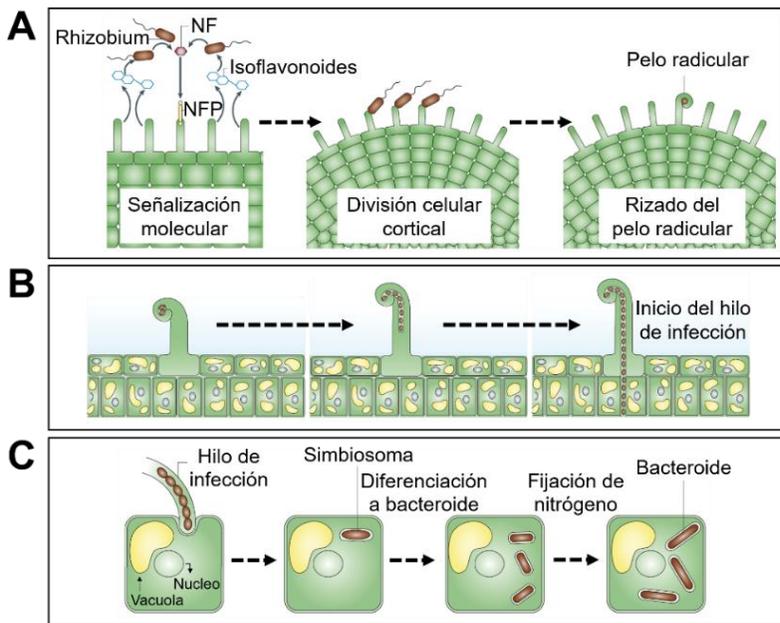


Figura 2.2.2. Representación esquemática del proceso de nodulación y formación de bacteroides. Diálogo de señalización inicial entre *Rhizobium*-leguminosa (A). Invasión de pelos radiculares (B). Endocitosis de bacterias y diferenciación de bacteroides (C). NFP: Percepción de factores Nod. Adaptado de Jones et al., 2007.

El reconocimiento de los NF por parte del huésped conduce a un aumento de los niveles de calcio y una alteración del citoesqueleto de los pelos radiculares (Sieberer et al., 2005). Los pelos radiculares de la planta se curvan y atrapan a los rizobios, y la inducción de la división celular cortical de la raíz establece un meristemo y un primordio nodular (Figura 2.2.2, B). Las bacterias inducen la formación de canales de infección dentro de este pelo radicular y el crecimiento de la membrana celular (Figura 2.2.2, C). En la corteza interna de la planta, las bacterias salen de los canales de infección y se liberan en las células del primordio nodular por endocitosis. Cada

célula bacteriana sufre endocitosis en un compartimento unido a una membrana (Brewin, 2004). Esta estructura, similar a un orgánulo, que incluye la membrana derivada de la planta y el bacteroide (la bacteria diferenciada), se denomina simbiosoma. Una célula vegetal infectada puede contener miles de simbiosomas (Chang et al., 2009; Damiani et al., 2016). En el interior del nódulo, existe una limitación de O_2 (microoxia) (véase apartado 2.2.3) que permite la expresión y funcionalidad de proteínas del complejo nitrogenasa y, por lo tanto, la fijación de N_2 (Fischer, 1994).

La diferenciación a bacteroide es concomitante a una disminución en la mayoría de los procesos metabólicos y a un aumento en los productos génicos involucrados en la fijación de N_2 y la respiración. La actividad respiratoria proporciona a la nitrogenasa la energía suficiente para llevar a cabo la reducción de una molécula de N_2 a dos de NH_4^+ (Jones et al., 2007). El NH_4^+ es secretado por el bacteroide y asimilado por la planta principalmente mediante la glutamina y asparagina sintetasas. La planta suministra carbono en forma de ácidos dicarboxílicos como el malato, y proporciona metabolitos y energía para la diferenciación del bacteroide y la fijación de N_2 (Jones et al., 2007; Chang et al., 2009; Damiani et al., 2016).

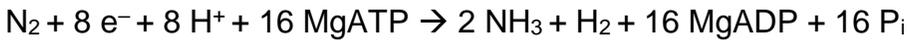
Existen dos tipos morfológicos de nódulos en función de la planta huésped. El primer tipo se denomina indeterminado, como los del guisante (*Pisum sativum*), la alfalfa (*Medicago sativa*) y el haba (*Vicia faba*). Tienen un meristemo persistente y, en sección longitudinal, se pueden dividir en cuatro zonas: (I) el meristemo en la punta del nódulo, (II) la zona de invasión inmediatamente detrás del meristemo con células invadidas por canales de infección que contienen rizobios, (III) la zona de fijación de N_2 , donde las células contienen bacteroides completamente diferenciados, y (IV) la zona

de senescencia. El segundo tipo, denominado nódulos determinados, se forman en plantas como la soja (*Glycine max*) y la habichuela (*Phaseolus vulgaris*) con una estructura globular. Los nódulos determinados típicos de leguminosas poseen una zona central formada por bacteroides que contienen células infectadas y células no infectadas, una corteza interna que contiene células pequeñas con grandes espacios intercelulares y una capa límite de células densamente empaquetadas, y una corteza externa que contiene células grandes empaquetadas laxamente con grandes espacios intercelulares, a veces rodeados por tejido peridérmico. Además de su morfología, los nódulos determinados e indeterminados también difieren en el proceso de desarrollo mediante el cual los rizobios se desarrollan en bacteroides fijadores de N_2 (Terpolilli et al., 2012).

2.2.2. Nitrogenasa

La nitrogenasa, que cataliza la reducción biológica de N_2 a NH_4^+ , es una metaloenzima compleja con características estructurales y mecanismos conservados entre las distintas variantes que existen (Dixon y Kahn., 2004).

Los genes comunes involucrados en la fijación de N_2 , tanto en diazótrofos de vida libre como en rizobios simbióticos se denominan genes *nif*. No obstante, existen genes exclusivos para la fijación simbiótica de N_2 denominados genes *fix*. En los rizobios, durante la diferenciación de bacteria a bacteroide, el inicio de la fijación de N_2 requiere la activación de toda una gama de genes *nif* y *fix*. La actividad respiratoria, con O_2 como aceptor final de electrones, proporciona a la nitrogenasa 16 moléculas de ATP y ocho electrones requeridos para la reducción de una molécula de N_2 a dos de NH_4^+ (revisado en Chang et al., 2009), de modo que el complejo cataliza la reducción de N_2 según la siguiente estequiometría:



Los rizobios poseen la nitrogenasa mejor caracterizada (Eady et al., 2016), compuesta por dos unidades, el homodímero NifH y el heterotetrámero NifDK. Este último recibe electrones de la unidad NifH. NifDK contiene el cofactor esencial hierro-molibdeno (FeMoco, MoFe₇S₉:homocitrato) y un grupo [8 Fe-7S] (proteína MoFe) mientras que NifH contiene un grupo [4Fe-S] y sitios para la unión e hidrólisis de MgATP (proteína Fe) (Rubio y Ludden, 2008). Otro gen esencial es NifA, el regulador central de la fijación de N₂ en rizobios. Además, los genes *fixABCX* son esenciales para la fijación de N₂ en *B. diazoefficiens* (Fischer, 1994) y aunque su papel no está claro aún, se ha postulado que el complejo FixABCX podría facilitar la transferencia de electrones desde la piruvato deshidrogenasa a la nitrogenasa (Scott y Ludwig, 2004).

Debido a la presencia de grupos Fe-S (Dixon y Kahn., 2004), la nitrogenasa es muy sensible a O₂ (Figura 2.2.3), pudiéndose inactivar a concentraciones tan bajas como 57 nM, según los estudios realizados en nódulos de soja (Kuzma et al., 1993), reduciendo su actividad, por lo que deben existir mecanismos que permitan a la proteína protegerse de él en el interior del nódulo (para más información consúltese la sección 2.2.3). De hecho, los nódulos de leguminosas mantienen la tensión de O₂ en un nivel extremadamente bajo, de 5 a 30 nM, en comparación con condiciones de crecimiento óxico (250 mM). La necesidad de una tensión de O₂ baja para la actividad de la nitrogenasa debe equilibrarse con el requerimiento de O₂ para la síntesis de ATP necesaria para su actividad, la cual la provee la respiración del bacteroide (Terpolilli et al., 2012).

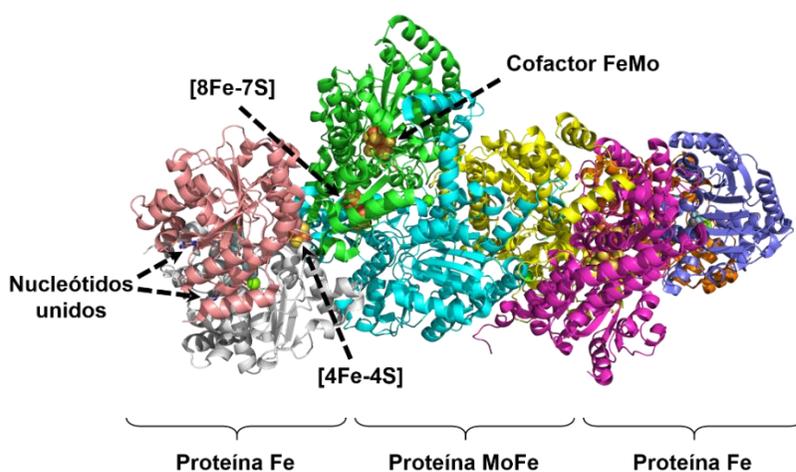


Figura 2.2.3. Estructura del complejo proteico Fe y MoFe de la nitrogenasa de *Azotobacter vinelandii*. Las subunidades de los dos dímeros de proteína Fe flanquean ambos lados de las subunidades α y β de la proteína MoFe. Los grupos sensibles a O_2 y los nucleótidos unidos se indican mediante flechas. Para simplificar, las flechas que indican estas características solo se muestran en la mitad del complejo simétrico. Referencia proteína: <https://www.rcsb.org/3d-view/1M34/1>. Adaptado de Dixon y Kahn., 2004.

2.2.3. Baja tensión de oxígeno (microoxia) en el nódulo

El nódulo es un entorno microóxico, rico en N y pobre en O_2 , lo que explica que éste último sea el principal factor para la inducción de los genes *nif* durante la simbiosis (Dixon y Kahn., 2004).

Así mismo, dado que la nitrogenasa, a pesar de su alta demanda energética, se inactiva rápidamente en presencia de O_2 , es necesario que la tensión de O_2 dentro de los nódulos se mantenga a concentraciones extremadamente bajas, en el rango nanomolar. Estas necesidades antagonistas son satisfechas mediante (Figura

2.2.4): i) la barrera de difusión de O_2 en el nódulo, que se compone de una estructura implicada en la oclusión del espacio intracelular en la corteza media, limitando la permeabilidad al O_2 (revisado en Minchin et al., 2008); ii) la presencia de leghemoglobina, un transportador de alta afinidad por O_2 con una tasa de asociación de O_2 extremadamente rápida y una tasa de disociación de O_2 relativamente lenta, lo cual permite amortiguar el O_2 libre en torno a 7-11 nM, suficiente para mantener la respiración del bacteroide (Downie, 2005); iii) la oxidasa terminal cbb_3 de alta afinidad por el O_2 codificada por los genes *fixNOQP*, que permite la respiración del bacteroide en el ambiente microóxico del nódulo durante la fijación de N_2 (revisado por Terpolilli et al., 2012).

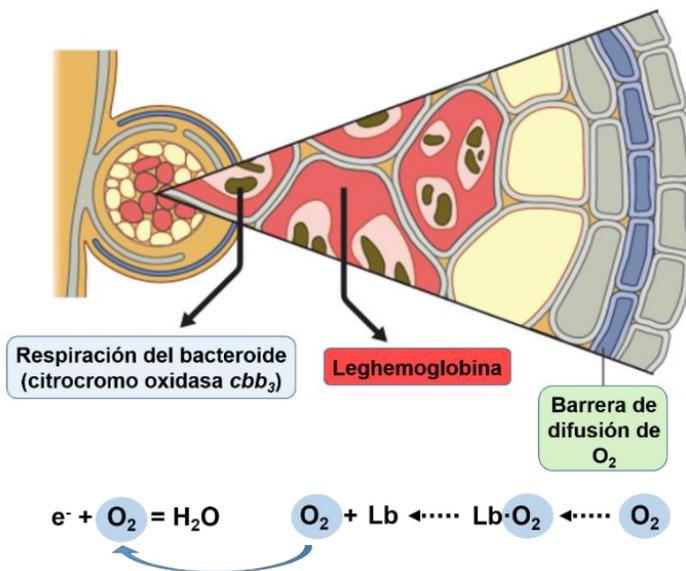


Figura 2.2.4. Representación esquemática de los mecanismos involucrados en la protección de la nitrogenasa contra el O_2 en nódulos de raíces de leguminosas. Adaptado de Sharon et al., 2015.

2.2.4. Especies reactivas de oxígeno (ROS) en la interacción simbiótica

Las plantas producen especies reactivas de oxígeno (ROS) como consecuencia del metabolismo aeróbico durante su desarrollo o en respuesta a estrés abiótico y/o biótico, que incluyen el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estas moléculas son altamente tóxicas, ya que son capaces de modificar todos los constituyentes primarios de la célula como lípidos, ADN, carbohidratos y proteínas (Moller et al., 2007). Su toxicidad conduce a la senescencia y muerte celular (Overmyer et al., 2003; Rivero et al., 2007). Las ROS también juegan un papel en la regulación del metabolismo de la planta como mensajeros secundarios en muchas vías asociadas con su desarrollo y respuesta a estreses (Apel y Hirt, 2004; Carol y Dolan, 2006; Gechev et al., 2006). Tal producción de ROS puede ser regulada, lo cual permite que las plantas se adapten mejor al medio ambiente (Pitzschke et al., 2006; Chang et al., 2009).

En los nódulos se ha detectado una alta producción de ROS procedente de diversos procesos. Cabe mencionar que, el entorno altamente reductor necesario para la fijación de N_2 , conduce a la formación de ROS, ya que donadores de electrones, como la ferredoxina, la uricasa y la hidrogenasa, son susceptibles a la auto-oxidación, lo que da como resultado la formación de superóxido (Dalton et al., 1991). Otra fuente de producción de ROS es la leghemoglobina, presente a altas concentraciones en los nódulos, la cual también puede producir superóxido (Puppo et al., 1991). Además, el alto nivel de metales de transición en el nódulo puede dar lugar a la generación de ROS (Becana y Klucas, 1992). En este contexto, una fuerte defensa antioxidante puede ser crucial para permitir un metabolismo eficiente en los nódulos.

El papel de los ROS en la simbiosis es controvertido y, de hecho, el patrón de acumulación espacio-temporal de los mismos es crítico para la especificidad de su función a lo largo de las distintas etapas de la simbiosis. Varias revisiones destacan las diferentes funciones que desempeñan estas moléculas en la simbiosis fijadora de N₂, según su origen bacteriano o vegetal (Boscari et al., 2013; Puppo et al., 2013; Hichri et al., 2015; Meilhoc et al., 2015). Las ROS tienen un papel fundamental en los procesos de reconocimiento, señalización e inmunidad durante los primeros pasos de la asociación simbiótica (Puppo et al., 2013). Se producen transitoriamente durante la infección por rizobios (Peleg-Grossman et al., 2009, 2012), y, es más, parece ser necesaria la presencia de ROS para el inicio de la infección, aunque niveles elevados y prolongados son perjudiciales para la nodulación (Toth y Stacey, 2015). También se ha sugerido que, los factores Nod pueden activar, en primer término, la producción de ROS necesaria para la expresión de genes vegetales y/o el estado redox de proteínas involucradas en la deformación del pelo radicular (Lohar et al., 2007), progresión del hilo de infección y formación de nódulos (Montiel et al., 2012; Puppo et al., 2013). Sin embargo, inhibirían la producción de ROS asociada al sistema de defensa de la planta en un segundo término. La participación de ROS es esencial en el éxito del proceso de infección, en particular por la represión de las respuestas defensivas de la planta que favorecen el establecimiento de la simbiosis (Damiani et al., 2016). Sin embargo, la alteración de la eficiencia de fijación de N₂ durante la senescencia se correlaciona con la detección de especies de ROS en la zona de senescencia del nódulo y una disminución general de los sistemas antioxidantes (Chang et al., 2009).

Por tanto, las ROS, tanto las producidas por la planta como aquellas generadas durante la respiración bacteriana o en el periodo de senescencia (Santos et al., 2001), constituyen otras de las

señales a la que los rizobios han tenido que desarrollar estrategias de protección y de adaptación de su fisiología.

2.3. Regulación en respuesta a microoxia en rizobios

2.3.1. Redes de regulación

La microoxia es un requisito necesario no sólo para la actividad nitrógenasa, sino también para la inducción de genes relacionados con la simbiosis (*nif* y *fix*) y aquellos requeridos para la síntesis de la oxidasa terminal *cbb₃* de alta afinidad por O₂ (*fixNOQP*) que provee energía al bacteroide. La percepción y la transducción de la señal de microoxia está mediada por proteínas reguladoras bien conservadas, que se integran en redes de regulación específicas en diferentes especies de rizobios (Fischer, 1994; Dixon y Kahn, 2004; Terpolilli et al., 2012). En α -proteobacterias, los genes *nif* y *fix* son dianas del regulador NifA que actúa en combinación con el factor sigma alternativo σ^{54} (ó RpoN) de la ARN polimerasa, codificado por el gen *rpoN* (Fischer, 1994; Dixon y Kahn, 2004). Así mismo, la transcripción de los genes *nifA* y *fix* en algunos rizobios está controlada por el sistema de dos componentes FixLJ sensible al O₂, otro regulador clave en el control de la fijación de N₂ (Green et al., 2009).

2.3.1.1. Sistemas de dos componentes

2.3.1.1.1. FixLJ

Los sistemas de dos componentes están compuestos por un tándem de una proteína que percibe la señal y otra reguladora, capaces de responder a una amplia variedad de señales en bacterias (revisado en Stock et al., 1995; West y Stock, 2001). En el caso de FixLJ, este sistema responde a baja tensión de O₂ en rizobios simbióticos (Sciotti et al., 2003), donde la proteína sensora FixL activa el regulador de respuesta FixJ, que, a su vez, induce la expresión

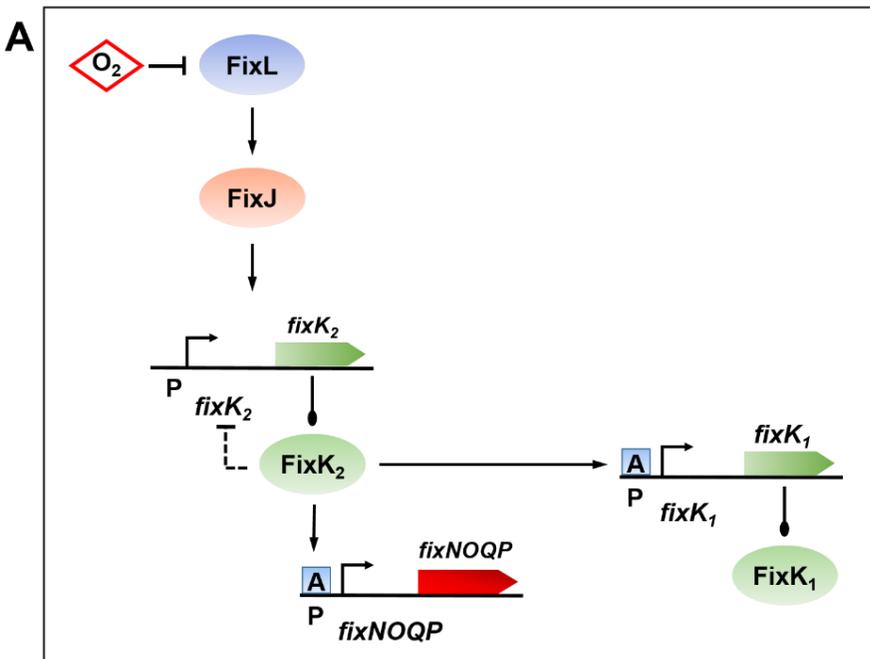
de otros genes bajo su control dentro de la cascada. FixLJ se describió por primera vez en *Sinorhizobium meliloti* (*Ensifer meliloti*), como el regulador de la expresión de los genes *fixNOQP* que codifican la oxidasa terminal de alta afinidad por O₂ *cbb₃* (David et al., 1988). Cabe destacar que no se ha encontrado ningún homólogo de este sistema en diazótrofos no simbióticos, lo que sugiere que su función está íntimamente ligada a la fijación simbiótica de N₂.

El sistema FixLJ controla de forma directa un pequeño número de genes, en los que se incluye *fixK*, y, en algunas especies, *nifA* (Dixon y Kahn, 2004). Sin embargo, si se consideran las dianas indirectas del sistema, su regulón es uno de los más grandes de todos los sistemas de dos componentes estudiados hasta la fecha (Hertig et al., 1989; Bobik et al., 2006; Mesa et al., 2008). Las dianas indirectas varían según la especie y cepa, pero normalmente incluyen los operones *fixNOQP* y *fixGHIS*, además de los controlados por proteínas FixK.

Existen dos formas de la proteína FixL, cada una de las cuales corresponde a un tipo de cascada diferente en rizobios. La primera se encuentra en especies que incluyen a *B. diazoefficiens* y *S. meliloti* (Figura 2.3.1 panel A y B respectivamente) (Foussard et al., 1997; revisado en Rutten y Poole, 2019). Estas proteínas tienen una similitud del 55%, su tamaño es de aproximadamente 55 kDa, y, además, interactúan con homólogos del regulador de respuesta FixJ.

Una segunda forma de FixL es la que se ha descrito en *Rhizobium leguminosarum* y *Rhizobium etli* (Figura 2.3.3 paneles A y B respectivamente; véase apartado 2.3.1.1.2) (Schlüter et al., 1997; Girard et al., 2000; revisado en Rutten y Poole, 2019). Esta variante de FixL tiene un tamaño mayor, de aproximadamente 70 kDa, con un 85% de similitud entre las variantes de estas especies, si bien

conserva una similitud inferior (del 40%) con las variantes FixL del primer grupo. La importancia de FixL se correlaciona directamente con el grupo al que pertenecen. En especies con la cascada canónica, FixLJ juega un papel crucial, mientras que en especies que poseen el segundo tipo de FixL, su función es prescindible.



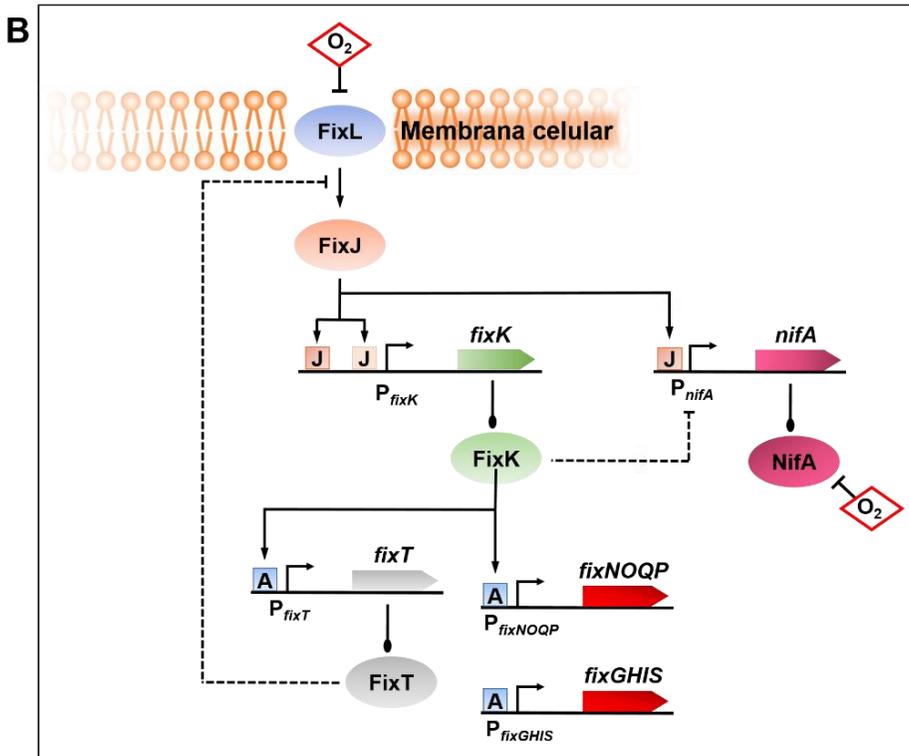


Figura 2.3.1. Redes de regulación en respuesta a microoxia que controlan genes esenciales para la fijación de N_2 y la respiración del bacteroide en *B. diazoefficiens* (A) y *S. meliloti* (B) (adaptado de Rutten y Poole, 2019). El O_2 se indica con un rombo rojo. Las líneas que terminan en flechas o barras indican activación y represión de la regulación, respectivamente. Las líneas discontinuas representan posibles conexiones o aquellas donde el mecanismo de acción no se ha estudiado en profundidad. Las cajas de microoxia se muestran en azul y están marcadas con una 'A'. El regulador de respuesta FixJ se muestra en naranja. Las flechas gruesas representan genes u operones. Las líneas que terminan en flechas romas indican traducción. Las proteínas se muestran como elipses.

FixL activa al factor de transcripción FixJ mediante fosforilación en respuesta a condiciones microóxicas. Las proteínas FixL del sistema canónico tienen dos dominios principales (Figura 2.3.2 panel A). En el extremo amino-terminal poseen un dominio sensorial Per-Arnt-Sim (PAS) que contiene un grupo hemo que se une a O_2 (Green et al., 2009).

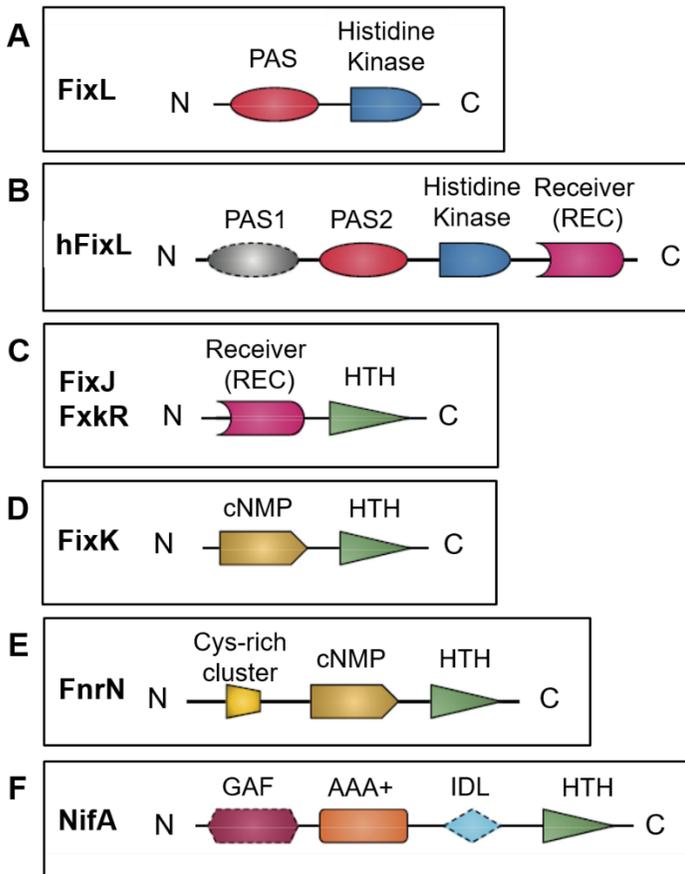


Figura 2.3.2. Componentes de las proteínas reguladoras implicadas en la respuesta a microoxia de rizobios. Las elipses son dominios Per-Arnt-Sim (PAS) que actúan como sensores moleculares de unión a otras moléculas. PAS y PAS2 (rojo) en FixL y hFixL respectivamente son sensores de O_2 , pero PAS1 (gris) en hFixL no lo es. Módulos de histidina

quinasa en color azul oscuro. Los dominios receptores (REC) se muestran en color rosa, los dominios de hélice-vuelta-hélice (H-V-H) como triángulos verdes. FixJ y FxkR tienen los mismos dominios, pero pertenecen a las familias NarL/FixJ y OmpR/PhoB, respectivamente. Los dominios cNMP se indican en marrón y el grupo rico en cisteína en el extremo amino-terminal de FnrN se muestra en amarillo. NifA contiene un dominio de unión a moléculas tipo GAF (púrpura), AAA+ (naranja) y HTH (H-V-H). Estos dos últimos dominios están unidos a través de una estructura intermedia (IDL, diamante azul claro). Los dominios de NifA con un contorno punteado no se encuentran en algunas especies. El tamaño de los distintos dominios no está dibujado a escala.

El extremo carboxilo-terminal contienen un dominio de histidina quinasa (HK) compuesto por un módulo de dimerización y fosfotransferencia asociado a un residuo de histidina, y un centro catalítico de unión a ATP. Este dominio es responsable de la transmisión de señales a FixJ por fosforilación (Yamada et al., 2009). En condiciones microóxicas, la liberación de O₂ del dominio PAS provoca la activación de la función quinasa de FixL. Dicha activación está mediada por señalización intramolecular a través de cambios conformacionales tanto en el dominio PAS como en la región que lo conecta al módulo HK (Hao et al., 2002). Una vez activada la función HK, FixL se auto-fosforila en un residuo de histidina conservado. Posteriormente, el fosfato se transfiere a un residuo de aspartato en el regulador de respuesta FixJ, dando lugar a su conformación activa (Rodgers y Lukat-Rodgers, 2005; Sousa et al., 2007). FixL unido al O₂ también tiene actividad fosfatasa en FixJ, lo que reduce la actividad de la cascada en condiciones óxicas (Lois et al., 1993). De este modo, FixL regula estrictamente la transcripción dependiente de FixJ en respuesta a microoxia.

FixJ es un factor transcripcional que, una vez fosforilado, funciona como activador de la expresión de genes dentro de la cascada FixLJ (Galinier et al., 1994). La proteína tiene aproximadamente 22 kDa y muestra un grado de similitud del 50% entre los ortólogos de *A. caulinodans*, *S. meliloti* y *B. diazoefficiens* (Fischer, 1994). FixJ posee características típicas de una proteína reguladora de sistemas de dos componentes, con un dominio receptor (REC) en la parte amino-terminal y un motivo de hélice-vuelta-hélice (H-V-H) situado en la parte carboxilo-terminal, implicado en la transcripción de sus dianas (Figura 2.3.2, panel C; Stock et al., 1995; Schumacher et al., 2000). En condiciones óxicas, el dominio receptor no fosforilado inhibe la función del dominio activador de la transcripción (Gouet et al., 1999). En condiciones microóxicas, FixL fosforila al dominio receptor, por lo que se elimina la represión.

La cascada FixLJ se activa a una concentración de O₂ relativamente alta (véase a continuación) y constituye uno de los primeros sistemas reguladores de O₂ necesarios para el establecimiento de la simbiosis. En condiciones de microoxia FixLJ activa la expresión de *fixK* en *S. meliloti*, *B. diazoefficiens* y *A. caulinodans* (David et al., 1988; Kaminski y Elmerich, 1991; Nellen-Anthamatten et al., 1998; Masson-Boivin et al., 2009; revisado en Rutten y Poole, 2019). En particular, en *B. diazoefficiens* se requiere una disminución moderada de la concentración de O₂ (5%) para inducir la autofosforilación de FixL y, en consecuencia, la fosforilación de FixJ (Sciotti et al., 2003; Terpolilli et al., 2012). A su vez, la proteína FixK₂ activa la expresión de más de 300 genes, incluidos aquellos que codifican otros reguladores (*nnrR*, *fixK₁*; véase apartado 2.5.2 y genes necesarios para el metabolismo de la bacteria en condiciones de microoxia, tanto en vida libre como en simbiosis (Mesa et al., 2008) (p. ej. operón *fixNOQP*) (Nellen-Anthamatten et al. 1998; Mesa et al. 2003; Mesa et al. 2008). De esta manera, FixK₂ amplifica

la señal de microoxia que se percibe al nivel del sistema FixLJ (Fernández et al., 2016).

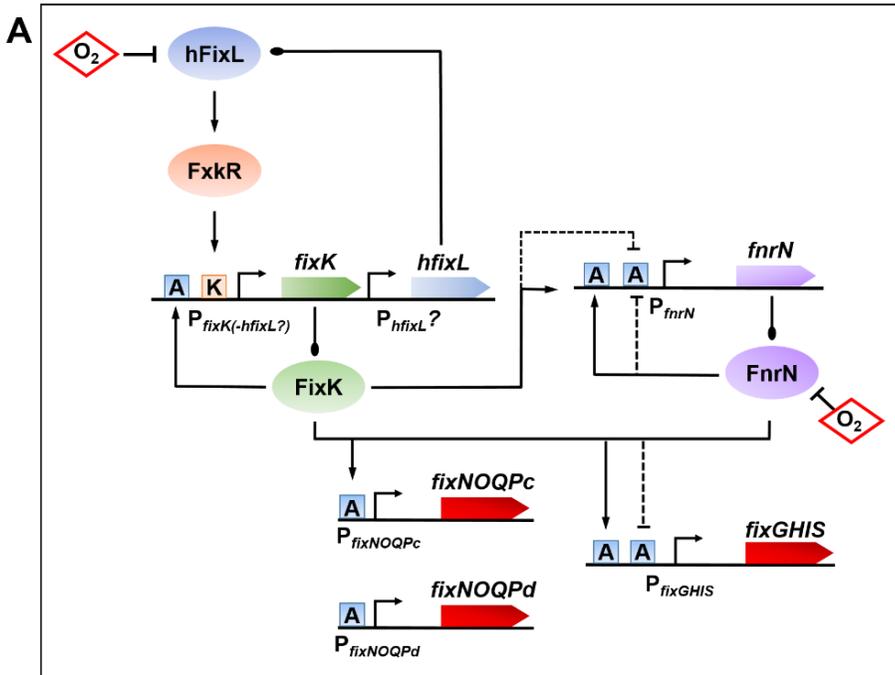
También se ha descrito que el sistema FixLJ funciona en rizobios fijadores de N₂ en vida libre (Li et al., 2010). En particular, en *A. caulinodans*, la activación de FixLJ ocurre en condiciones óxicas a concentraciones de O₂ atmosférico (Kaminski y Elmerich, 1991; Kaminski et al., 1991; Lorocho et al., 1995). Esto es posible debido al entorno interno microóxico dentro de la célula, consecuencia del funcionamiento de múltiples oxidasas terminales en esta bacteria (Kitts y Ludwig, 1994; revisado en Rutten y Poole, 2019).

2.3.1.1.2. hFixL-FxkR

Según se ha comentado en el apartado anterior, ciertas especies de rizobios, como *R. etli* y *R. leguminosarum*, poseen un sistema de regulación alternativo en respuesta a microoxia, que consiste en la proteína híbrida hFixL y el regulador FxkR (Figura 2.3.3). La proteína hFixL posee un dominio homólogo al dominio receptor de FixJ que está presente en el extremo carboxilo (Figura 2.3.2, panel B). Es por ello que no interactúa con ningún homólogo de FixJ y en su lugar lo hace con la proteína FxkR (Guimaraes et al., 2017). Este mecanismo regulador se ha estudiado principalmente en diferentes cepas de *R. etli* (Schlüter et al., 1997; Girard et al., 2000).

En general, los genes *fixL* y *fixJ* forman un operón ubicado cerca de otros genes implicados en la fijación de N₂, lo que sugiere que se adquirieron juntos en un evento de transferencia génica horizontal. Por el contrario, *fxkR* en *R. etli* no está próximo al gen *hfixL*, lo que sugiere que no se adquirió en el mismo evento de transferencia y puede derivar de un regulador preexistente. Por otra parte, S.

meliloti codifica homólogos de las proteínas FixL híbridas y canónicas, lo que demuestra que ambas vías no son excluyentes (Reyes-González et al., 2016).



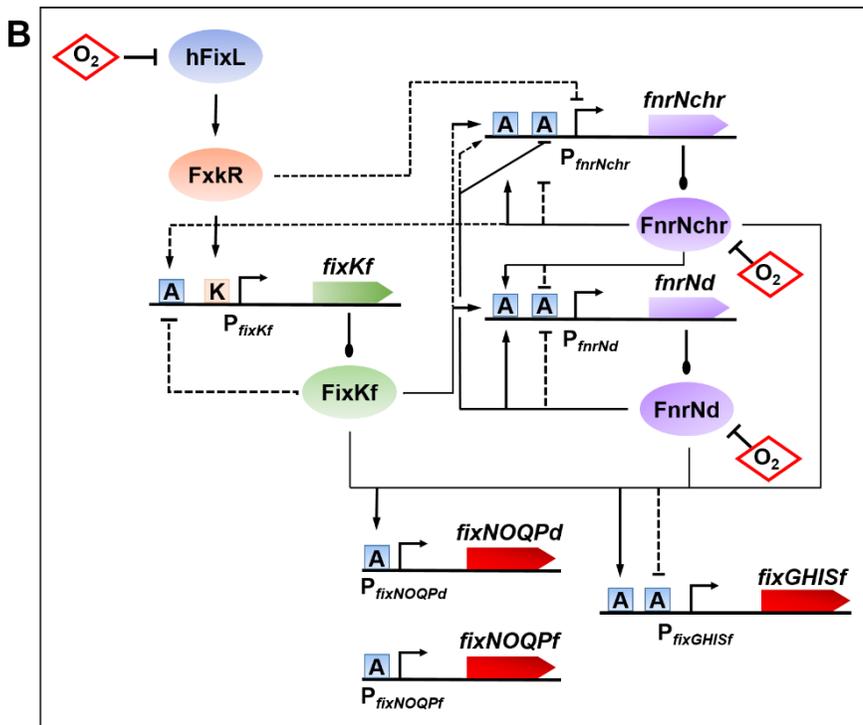


Figura 2.3.3. Redes de regulación en respuesta a microoxia que controlan genes implicados en la fijación de N_2 en *R. leguminosarum* (A) y *R. etli* (B) (adaptado de Rutten y Poole, 2019). El O_2 se indica con un rombo rojo. Las líneas que terminan en flechas o barras indican activación y represión de la regulación, respectivamente. Las líneas discontinuas representan posibles conexiones o aquellas donde el mecanismo de acción no se ha estudiado en profundidad. Las cajas de microoxia se muestran en azul y están marcadas con una 'A'. El regulador de respuesta FixJ se muestra en naranja. Las flechas gruesas representan genes u operones. Las líneas que terminan en círculos indican traducción. Las proteínas se muestran como elipses.

A diferencia del sistema FixLJ, generalmente esencial para la actividad fijadora de N_2 , la regulación hFixL-FxkR tiene un efecto

limitado en dicha actividad, de hecho, en *R. etli* CFN42, la vía parece ser totalmente prescindible (Zamorano-Sánchez et al., 2012).

Sin embargo, al igual de lo descrito para la cascada FixLJ tradicional, hFixL regula FxkR mediante fosforilación en condiciones microóxicas (Zamorano-Sánchez et al., 2012), si bien la transcripción de *fxkR* parece ser constitutiva. FxkR tiene un tamaño molecular de 27 kDa y una estructura reguladora típica, con un dominio receptor amino-terminal y otro carboxilo-terminal de unión al ADN (H-V-H) (Figura 2.3.2, panel C). Estos dominios son análogos a los que se encuentran en FixJ, aunque ambas proteínas no estén relacionadas. Mientras que FxkR pertenece a la familia OmpR/PhoB, FixJ pertenece a la familia NarL/FixJ.

Según estudios en otras proteínas de la familia OmpR/PhoB, la fosforilación del dominio del receptor FxkR podría dar lugar a la inducción de un cambio conformacional que conduce a la dimerización de la proteína. El dímero FxkR contiene dos dominios H-V-H que se unen a una secuencia de ADN diana (Gao y Stock, 2009).

En resumen, la cascada hFixL-FxkR funciona de forma similar a la cascada canónica FixLJ, con la salvedad que no es esencial para la fijación de N₂. Se ha descrito que cuando ambos sistemas están presentes, hFixL-FxkR interactúa con FixLJ suprimiendo la activación de este último. El sistema hFixL-FxkR también se ha descrito en especies que no son rizobios, lo que sugiere que, a diferencia de FixLJ, podría actuar como sistema de detección de la concentración O₂ no exclusivamente restringido a la simbiosis (Zamorano-Sánchez et al., 2012; revisado en Rutten y Poole, 2019).

2.3.1.1.3. RegSR

Otro sistema de dos componentes fundamental para la fijación de N₂ en algunos rizobios, como es el caso de *B. diazoefficiens*, es

RegSR, donde RegS es la proteína que percibe la señal, mientras que RegR es el regulador de respuesta (Fernández et al., 2016). Este sistema controla la expresión de genes necesarios para el metabolismo microóxico y simbiótico, como *nifA*, que codifica el regulador por excelencia de la fijación de N₂ (Lindemann et al., 2007).

En *B. diazoefficiens*, *nifA* auto-regula su propia expresión, pero también se activa por RegR. El gen *nifA* forma parte del operón *fixR-nifA*, al que le preceden dos promotores superpuestos, el promotor *fixRp1* dependiente de RpoN y activado por NifA, y el promotor *fixRp2* activado por RegS, que se sitúa en la posición más próxima a la región 5' de *fixR* (Barrios et al., 1995; Bauer et al., 1998). La mutación en *regR* afecta seriamente tanto la fijación de N₂ (Bauer et al., 1998), como la expresión del operón *fixR-nifA* en condiciones óxicas como anóxicas (Lindemann et al., 2007). Sin embargo, en condiciones óxicas, NifA no es activo y se degrada (Morett et al., 1991). Es probable que la detección de O₂ por parte de NifA se lleve a cabo a través de la coordinación de un cofactor metálico. Bajo condiciones microóxicas, NifA es activo y la expresión máxima del operón *fixR-nifA* se produce a través de la activación del promotor *fixRp1* dependiente de RpoN-NifA (Terpolilli et al., 2012) a una concentración inferior al 0,5 % en la fase gaseosa. Sin embargo, se desconoce la señal exacta que conduce a la activación mediada por el sensor RegS (Sciotti et al., 2003; Rutten y Poole, 2019).

Además, el análisis del transcriptómico de una cepa mutante en el gen *regR* conjuntamente con experimentos de interacción proteína-ADN indicaron que esta proteína reguladora controla genes constitutivos de la desnitrificación (*nor* y *nos*) como otros adicionales que codifican citocromos solubles (*CycA*, *Cy2*), siendo el pri-

mero relevante en la transferencia de electrones vinculada a diferentes etapas de la desnitrificación en *B. diazoefficiens* (Torres et al., 2014; Jiménez-Leiva et al., 2019).

2.3.1.2. Factores transcripcionales

Un factor de transcripción es una proteína que se une a secuencias específicas de ADN, controlando así la transcripción (Karin, 1990; Latchman, 1997). Los factores de transcripción realizan su función de forma individual o en colaboración con otros complejos proteicos, promoviendo (como activador) o bloqueando (como represor) el reclutamiento de la ARN polimerasa y, en consecuencia, la transcripción de genes específicos (Roeder, 1996; Nikolov y Burley, 1997; Lee y Young, 2000). Para ello, contienen uno o más dominios de unión al ADN, los cuales se unen a secuencias específicas de ADN adyacentes a los genes que regulan (Mitchell y Tjian, 1989; Ptashne y Gann, 1997).

Los factores de transcripción más relevantes en rizobios, implicados en la respuesta a microoxia son NifA, FixK y FnrN (Figura 2.3.2, paneles D-F). Hasta la fecha, todos los rizobios simbióticos poseen, al menos, uno de estos reguladores y es común que coexistan tal y como se ha descrito en *R. leguminosarum*, *S. meliloti* y *R. etli* (Rutten et al. 2021).

NifA es el activador central y esencial de la fijación de N₂ en la mayoría de los diazótrofos simbióticos y no simbióticos estudiados (Dixon y Kahn, 2004). A diferencia de sistemas reguladores como FixLJ ó hFixL-FxkR que generalmente se cree que actúan en las primeras fases de la asociación simbiótica, NifA está principalmente involucrado en la etapa final de diferenciación de los bacteroides (Hirsch y Smith, 1987), y es activo una vez que los nódulos están formados para activar la maquinaria central de la fijación de N₂

(Rutten et al. 2021). Las dianas clave de NifA incluyen los genes de la nitrogenasa (*nif*), y genes específicos de diazótrofos simbióticos (Schetgens et al., 1985; Earl et al., 1987; Edgren y Nordlund, 2004; Martínez et al., 2004). El mecanismo molecular de esta proteína se ha estudiado principalmente en diazótrofos no simbióticos, y en particular en *Klebsiella pneumoniae* (Postgate, 1982). En esta especie, la regulación de NifA a nivel transcripcional y postranscripcional integra múltiples señales que incluyen la concentración de O₂, el estado energético de la célula y la disponibilidad de N (Kaminski y Elmerich, 1998; Dixon y Kahn, 2004; Martínez-Argudo et al., 2005). En diazótrofos simbióticos, el O₂ es la señal principal, a menudo la única que regula a *nifA*, tanto a nivel transcripcional como proteico (Fischer, 1994).

NifA es un activador, que generalmente, depende del factor sigma alternativo RpoN (Studholme y Dixon, 2003). En la región central de la proteína hay un dominio ATPasa (Figura 2.3.2, panel F) flanqueado por una región amino-terminal de señalización y una región carboxilo-terminal de unión a ADN con un motivo H-V-H (Bush y Dixon, 2012). El dominio central parece ser el único esencial para la activación de la transcripción mediada por NifA (Berger et al., 1995; Arsene et al., 1996, 1999). Está implicado en la interacción de NifA, como proteína hexamérica, con el complejo ARN polimerasa-RpoN unido en la región -12/-24 de la región promotora de las dianas bajo su control. La hidrólisis de ATP da lugar un cambio conformacional de dicho complejo que permite la transcripción (Dixon y Kahn, 2004).

Los rizobios normalmente regulan la transcripción de *nifA* en respuesta a microoxia, a diferencia de los diazótrofos de vida libre donde la expresión responde a los niveles de N (Dixon y Kahn,

2004; Martínez et al., 2004). En condiciones microóxicas, la inducción se logra a través de varios mecanismos combinados. La autorregulación positiva de NifA da como resultado un circuito de retroalimentación muy común en rizobios, lo que permite una producción rápida de la proteína durante la fijación de N₂ en los nódulos. Varias especies también emplean un segundo mecanismo de regulación de O₂ a nivel transcripcional, incluso a través de la cascada FixLJ. De hecho, una cepa mutante *nifA* de *S. meliloti*, pareció mostrar una mayor expresión de *fixLJ* (Tian et al., 2006). Por lo tanto, NifA puede suprimir indirectamente las dianas de FixLJ durante la etapa final de la simbiosis. El control de mecanismos reguladores permite que la proteína influya indirectamente en una gran cantidad de genes, más allá de sus dianas directas (Rutten y Poole, 2019).

Otros factores de transcripción de gran interés para la fijación de N₂ son los reguladores de tipo FixK, que actúan como intermediarios en la regulación en respuesta a microoxia por las proteínas FixL y hFixL, y FnrN, los cuales detectan directamente la concentración de O₂ e inducen la expresión de los genes *fixNOQP* y *fixGHIS* (para más detalles sobre FixK y FnrN consultar sección 2.4.5).

2.3.1.3. Factores sigma

Los factores sigma (σ) son proteínas esenciales bacterianas que forman parte del complejo hetero-multimérico de la ARN polimerasa ($\alpha_2\beta\beta'\sigma$). Tanto los factores σ , como la ARN polimerasa no son capaces de unirse por sí solos a las regiones promotoras de los genes (Figura 2.3.4) (Gruber y Gross, 2003; Shen, 2019). Por tanto, son necesarios para que la ARN polimerasa pueda reconocer secuencias de ADN específicas para iniciar la transcripción, y por consiguiente, son moduladores de la expresión génica (revisado en Lodish et al., 2005).

Todas las bacterias tienen al menos un factor σ que sirve para transcribir genes esenciales, el llamado *house-keeping*, que pertenece a la familia σ^{70} . La mayoría de ellas también poseen factores σ alternativos que transcriben genes en respuesta a estímulos específicos (Campbell *et al.*, 2008). Estos factores sigma alternativos, en su mayoría, pertenecen al grupo σ^{70} y comparten sus características funcionales.

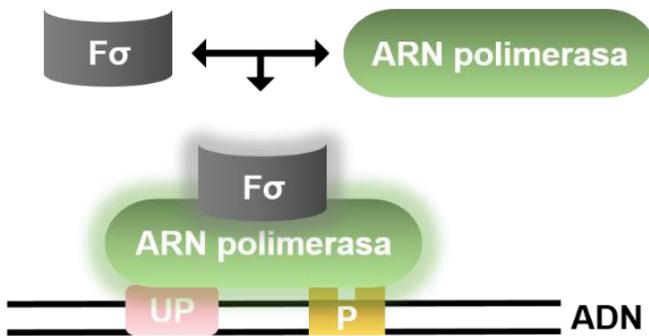


Figura 2.3.4. Interacción de la holoenzima de la ARN polimerasa bacteriana con la región promotora de ADN. La subunidad sigma ($F\sigma$) permite la unión de la ARN polimerasa a una secuencia promotora específica (P, en amarillo) del ADN. Factores transcripcionales específicos pueden unirse en la región 5' del promotor (UP, en rosa) para interactuar con la holoenzima de la ARN polimerasa y modular su función. Tras el comienzo de la transcripción, el factor σ se disocia y puede asociarse nuevamente con otra molécula de ARN polimerasa para iniciar nuevamente la transcripción. Adaptado de Shen, 2019.

Los factores σ de la familia σ^{70} se dividen en cuatro grupos (Figura 2.3.5), y se ha propuesto un quinto grupo que incluye regu-

ladores positivos de genes de toxinas y bacteriocinas, cuya estructura difiere de los cuatro primeros (Helmann, 2002). Estos cuatro primeros grupos comparten dos dominios funcionales, el 2 y 4. El dominio 2 es importante para unirse a la región -10 del promotor, mientras que el dominio 4 se une a la región -35 y asegura la formación de un complejo abierto (Gruber y Gross, 2003).

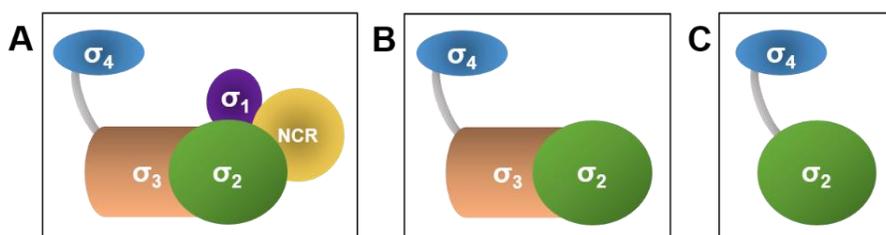


Figura 2.3.5. Diferentes clases de proteínas pertenecientes a la familia σ^{70} . Adaptado de Gruber y Gross, 2003. A: grupo 1 y 2, que incluye los factores σ esenciales y una región no conservada (NCR). B: grupo 3. C: grupo 4. Se indican los dominios 1-4.

El grupo 1 contiene los factores σ primarios esenciales. Además de los dominios 2 y 4, presentan dos dominios conservados, el 1 y el 3, y una región no conservada (NCR) junto al dominio 2 (Gruber y Gross, 2003). Los miembros del grupo 2 son muy similares a los del grupo 1, pero no son esenciales. Contienen los cuatro dominios σ^{70} , además del dominio NCR. El grupo 3 carece tanto de la región NCR como del dominio 1. Incluyen factores σ flagelares, de choque térmico y de esporulación. El grupo 4 es la subfamilia más grande y diversa de σ^{70} . Los miembros de este grupo también se conocen como factores σ ECF (del inglés *extracytoplasmic function*) (Helmann, 2002; Lonetto et al., 1994), y fueron descritos por primera

vez en el estudio de proteínas involucradas en la regulación de funciones extracitoplasmáticas (Lonetto et al., 1994). Se caracterizan por: i) controlar funciones asociadas con algún aspecto de la superficie celular o el transporte (Helmann, 2002); ii) reconocer elementos promotores con un motivo 'AAC' en la región -35, y ejercer una retroalimentación positiva sobre su propio promotor (Helmann, 2002); iii) su regulación a través de interacción proteína-proteína, en la que se unen a un factor inhibidor, el llamado factor anti- σ (ASD). Dicho factor anti- σ se define por la capacidad de evitar que su factor σ asociado compita por la ARN polimerasa (Brown y Hughes, 1995; Hughes y Mathee, 1998). Los complejos de factores anti- σ / σ son, en muchos aspectos, análogos a los sistemas reguladores de dos componentes, aunque difieren en la forma en que se transmite la señal. Ambos acoplan una señal, a menudo extracelular, percibida por un dominio con una respuesta transcripcional citoplasmática ejercida por el segundo dominio. Se conocen ejemplos en los que se combinan sistemas de dos componentes con factores σ ECF, como en el sistema general de respuesta al estrés NepR-PhyR de α -proteobacterias (Francez-Charlot et al., 2009; Gourion et al., 2009; Bastiat et al., 2010). En este sistema, el estrés es detectado por una histidina quinasa y el regulador de respuesta PhyR es activado por fosforilación. A diferencia de otros reguladores de respuesta, el dominio efector de PhyR consta de un dominio similar al factor σ . Actúa como un factor anti-anti- σ uniéndose al factor anti- σ NepR y liberando así el factor σ EcfG. En *B. diazoefficiens*, este sistema está implicado en la respuesta a estreses abióticos (calor, desecación, hambre de carbono), así como en la interacción simbiótica con soja o judía mungo (Gourion et al., 2009).

Existen otros factores sigma alternativos que no pertenecen a la familia σ^{70} ni tampoco conservan sus dominios estructurales. En rizobios, el ejemplo más característico es RpoN que pertenece al

tipo σ^{54} . Estas proteínas conservan una región amino-terminal implicada en la interacción con factores transcripcionales específicos, seguida de un dominio que se une a la ARN polimerasa y de dos dominios que interaccionan con las regiones -12 y -24 de la región promotora de sus dianas (Buck et al., 2000). En el caso de *B. diazoefficiens*, la proteína RpoN₁ representa uno de los nexos de unión entre las cascadas reguladoras FixLJ y RegSR, esenciales para el metabolismo microóxico de esta bacteria, tanto en vida libre como en simbiosis. En *R. leguminosarum* VF39, la expresión microóxica de *fnrN* depende de RpoN (Sciotti et al., 2003; Rutten y Poole 2019; Rutten et al. 2021).

2.4. Factores transcripcionales de tipo CRP/FNR

2.4.1. Aspectos generales

La superfamilia de factores de transcripción CRP/FNR (*cyclic AMP receptor protein/fumarate-nitrate reductase regulator*) está formada por un amplio grupo de reguladores bacterianos. Esta familia recibió su nombre de las dos primeras proteínas identificadas: proteína receptora de AMP cíclico (AMPc) (CRP) y regulador de las proteínas fumarato y nitrato reductasas (FNR). Los miembros de esta familia responden (de forma directa o indirecta) a una amplia gama de señales metabólicas y ambientales (Körner et al., 2003), por lo que regulan un gran espectro de funciones, como la utilización de fuentes de carbono, la virulencia, la fijación de N₂, la fotosíntesis y algunos tipos de respiración.

La mayoría de los miembros de esta familia son proteínas de tamaño similar, compuestas por 230-250 aminoácidos. Aunque la similitud entre ellos es bastante baja (< 25%), presentan una estructura similar a la de la proteína CRP con dominios funcionales conservados (Figura 2.4.1): (i) un dominio sensor en la parte amino-

terminal, que incluye una estructura en lámina β que interacciona con la ARN polimerasa, (ii) una hélice α central implicada en dimerización y, (iii) un dominio de unión a ADN con un motivo de hélice-vuelta-hélice (H-V-H) en la región carboxilo-terminal, que interacciona con una secuencia palindrómica que se localiza en distintas posiciones en la región promotora de los genes que regulan.

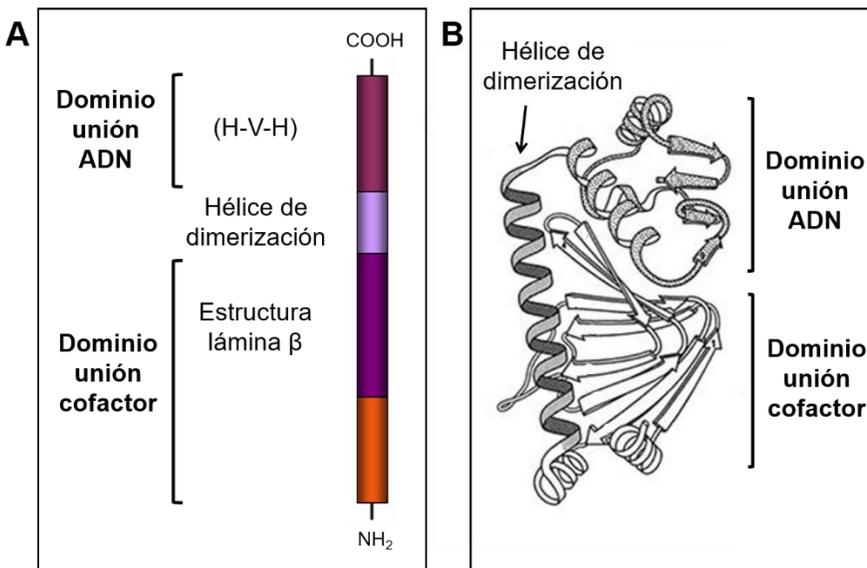


Figura 2.4.1. Dominios estructurales de las proteínas CRP/FNR. A. Se muestra una representación gráfica del dominio de unión a efector en la región amino-terminal que comprende un conjunto de láminas β que interaccionan con la ARN polimerasa, unido a través de un hélice α involucrada en la dimerización, al dominio carboxilo-terminal de unión a ADN con el motivo H-V-H. B. Representación gráfica de la estructura cristalina de la proteína CRP. Modificado de Kiley y Beinert, 1998; Körner et al., 2003.

Las proteínas de tipo CRP/FNR son mayoritariamente activadores que actúan como dímeros (Browning y Busby 2004). Dichos dímeros, se forman a partir de interacciones hidrofóbicas entre residuos específicos, dispuestos a ambos lados de la hélice de dimerización de ambos monómeros. La respuesta a los estímulos ambientales e intracelulares, surge de la interacción entre una molécula de señalización (Figura 2.4.3) y el dominio sensor, lo que conduce a un cambio en la conformación, produciéndose la unión del dímero activo a la región promotora de los genes que regulan. Los modos de percepción de señales descritas en estas proteínas son: (i) percepción directa de un factor de estrés; (ii) unión a un grupo prostético, p. ej.: $[4Fe-4S]^{2+}$; (iii) unión de una molécula efectora, p. ej.: AMPc.

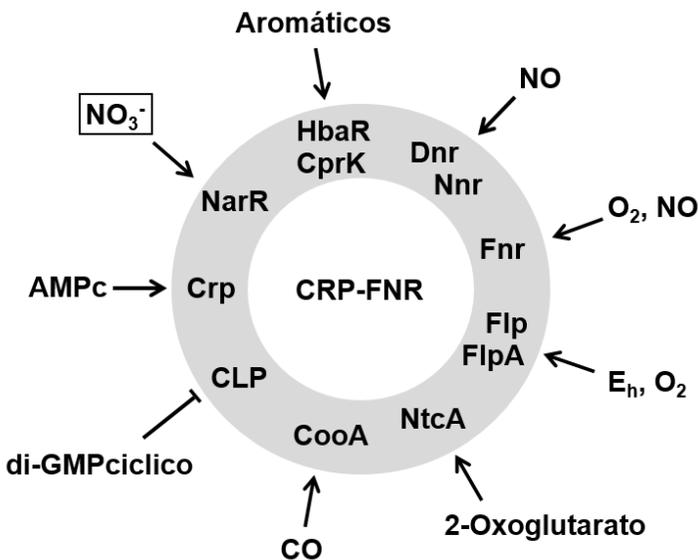


Figura 2.4.3. Cofactores de la familia CRP/FNR. No existen evidencias experimentales de la interacción de la interacción del NO_3^- con la proteína NarR. Modificado de Körner et al., 2003.

Los datos estructurales disponibles de estas proteínas en estado activo e inactivo, permitieron una mejor comprensión del mecanismo alostérico asociado a la unión de su cofactor correspondiente, y, reveló, que parece ser diferente para cada subgrupo.

En las siguientes secciones se describirán las características estructurales y el mecanismo de acción de aquellas proteínas de tipo CRP/FNR relevantes para este trabajo: CRP y FNR, ambas de *E. coli*, CooA (carbon monoxide oxidation protein A) de *Rhodospirillum rubrum* y los clados FixK y FnrN.

2.4.2. CRP

La proteína CRP fue el primer factor de transcripción de la familia CRP/FNR del que se conoce su estructura mediante difracción de rayos X (Zubay et al., 1970; Emmer et al., 1970; McKay y Steitz, 1981), por lo que se considera un referente para todos los miembros de esta súper-familia. Su mecanismo de acción se ha estudiado en profundidad mediante una serie de aproximaciones estructurales, biofísicas, bioquímicas y genéticas. La modulación alostérica de CRP inducida por la unión a AMPc constituye un modelo de estudio (Harman, 2001). Cuando el AMPc se une a CRP da lugar a un cambio conformacional en la proteína que permite su activación y unión a ADN (Fic et al., 2009), e interacción con la ARN polimerasa para activar la transcripción (Benoff et al., 2002). CRP participa en la regulación de numerosos genes en *E. coli*, bien activando o reprimiendo su expresión (Botsford y Harman, 1992).

CRP es un homodímero de 50 kDa con dos dominios principales independientes, unidos por una hélice α de dimerización (Figura 2.4.4). El dominio sensor amino-terminal presenta una estructura en lámina β rígida que no se ve afectada por la unión de AMPc. Por el

contrario, el dominio carboxilo-terminal de unión a ADN que contiene el motivo H-V-H es bastante flexible.

La unión del monómero de CRP a dos moléculas de AMPc es independiente de la concentración de este último. El sitio de unión primario se ubica en el dominio sensor, donde el AMPc se une con afinidad micromolar, quedando situado en una cavidad formada por el dominio de láminas β y la hélice α de dimerización. Interactúa con varios aminoácidos del dominio sensor (G71-A84) y dos residuos del extremo carboxilo-terminal de la hélice α de dimerización (T127 y S128 de la otra subunidad) (Passner et al., 2000). CRP puede unirse a una segunda molécula de AMPc a una concentración milimolar, debido a que posee otro sitio de unión ubicado en una interfaz entre los dos dominios de CRP e interactúa con el motivo H-V-H (Passner y Steitz, 1997). No obstante, la forma activa de CRP contiene una sola molécula de AMPc por monómero, y la unión de una segunda molécula reduce la capacidad de CRP para unirse a ADN (Tutar, 2008). Puesto la concentración de AMPc en la célula es inferior al rango milimolar (Epstein et al., 1975), el papel de la unión de una segunda molécula de AMPc en la actividad de CRP *in vivo* es sólo especulativo (Tutar, 2008; Fic et al., 2009).

La proteína CRP sin ligando (apo-CRP) es un dímero simétrico con una conformación abierta, en el cual, la hélice de dimerización se despliega hacia su extremo carboxilo-terminal, orientando el dominio de unión a ADN en una conformación que es incompatible con la unión al mismo (Popovych et al., 2009; Sharma et al., 2009). Por el contrario, al producirse la unión a AMPc en el dominio sensor, induce un cambio conformacional en el dominio de unión a ADN, debido a la interacción del AMPc con dos residuos de la región carboxilo-terminal de la hélice α de dimerización (T127 y S128 de la otra subunidad). Esta interacción extiende la hélice de dimerización

3 vueltas, induciendo una rotación de 60° y una traslación de 7 \AA de las hélices αF de reconocimiento de ADN (Figura 2.4.4), disminuyendo su distancia relativa entre sí, y adoptando una conformación que encaja perfectamente en el surco mayor del ADN. Además, la molécula de AMPc expulsa un residuo aromático de la cavidad, desplazando el bucle de la lámina β hacia la hélice de dimerización, lo que da como resultado la interacción con el dominio de unión a ADN.

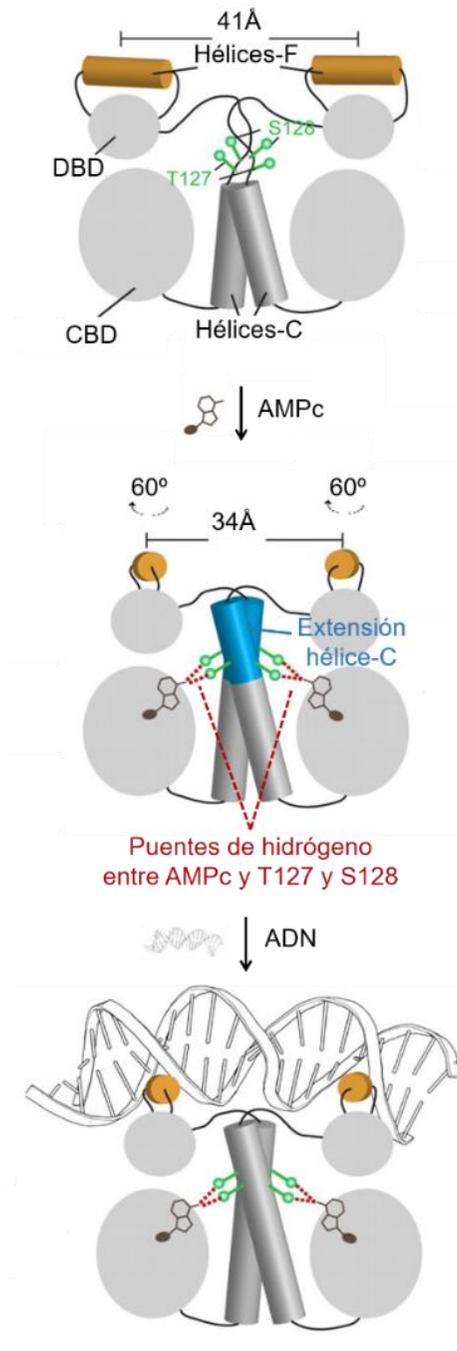


Figura 2.4.4. Mecanismo del control alostérico de CRP.

Adaptado de Popovych et al., 2009. Modelo esquemático de CRP en sus 3 estados estructurales: apo-CRP, CRP-AMPc y CRP-AMPc-ADN. El AMPc se une al dominio de unión a AMPc (CBD) e interacciona directamente con los residuos T127 y S128, lo que induce una extensión de la hélice de dimerización (hélice C) en 3 vueltas. Esta extensión en espiral da como resultado la rotación de los dominios de unión a ADN (DBD) del dímero en aproximadamente 60° y una traslación de los mismos de aproximadamente 7 Å. Esta rotación y traslación hace que las hélices α F (F) se sitúen en la orientación y posición correctas para interactuar con los surcos principales del ADN.

En la estructura de CRP-AMPc en complejo con ADN se observó que la proteína provoca un giro de 90° del ADN (Figura 2.4.5), de manera que las hélices α F se unen a los dos surcos mayores de la hélice B del mismo, y establecen interacciones específicas con las bases nitrogenadas y el esqueleto del ADN (Schultz et al., 1991; Parkinson et al., 1996).

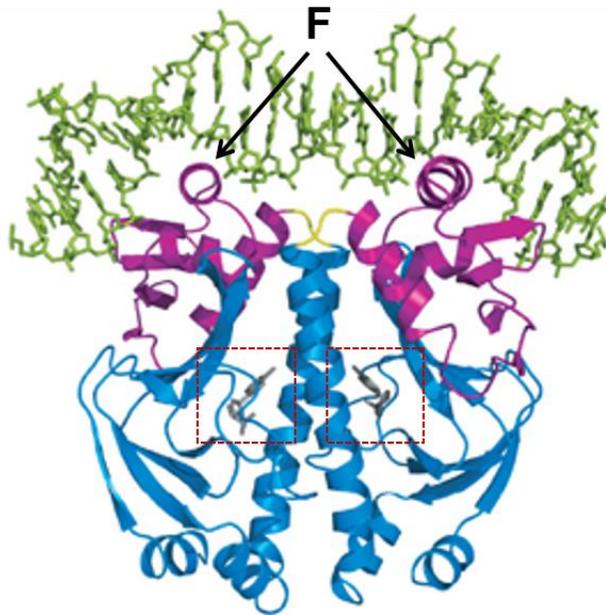


Figura 2.4.5. Estructura de CRP-AMPc en complejo con ADN. Los dominios sensor, de unión a ADN, AMPc y ADN se representan en azul, magenta, gris y verde, respectivamente. F: hélices α F de reconocimiento de ADN. Las moléculas de AMPc se indican enmarcadas con un recuadro rojo con línea discontinua. Adaptado de Tzeng y Kalodimos, 2009.

2.4.3. FNR

La proteína FNR es un factor de transcripción que responde a la concentración de O₂, de manera que controla la transición entre la respiración anóxica y óxica en anaerobios facultativos a través del ensamblaje/degradación del grupo prostético [4Fe-4S]²⁺ (Figura 2.4.6). La mayoría de los estudios sobre FNR se han llevado a cabo con *E. coli*, donde los niveles intracelulares de esta proteína son similares, independientemente de la concentración de O₂ (Sutton et al., 2004). En condiciones de limitación de O₂, cada monómero de FNR se une a un grupo [4Fe-4S]²⁺ a través de tres cisteínas amino-terminales (C20, C23 y C29) y una cisteína interna (C122). La estructura de FNR de *E. coli* no se ha podido resolver pero, en su ortólogo de *Aliivibrio fischeri*, la unión de la proteína al grupo [4Fe-4S]²⁺ presenta una coordinación similar en los residuos correspondientes, es decir C-X₂-C-X₅-C en la región amino-terminal y un residuo de cisteína central (Figura 2.4.6; Volbeda et al., 2015). La formación de la holo-proteína se traduce en la dimerización de la misma y la unión, en consecuencia, a sus promotores diana que contienen una secuencia de reconocimiento específica (caja FNR).

En condiciones óxicas, FNR detecta directamente la presencia de O₂, lo que ocasiona la desestabilización de los grupos [4Fe-4S]²⁺ (Sutton et al. al., 2004; Reinhart et al., 2008), para dar lugar grupos [2Fe-2S]²⁺ y finalmente la formación de monómeros sin efector o lo que es lo mismo la apo-forma de la proteína, la cual no se puede unir a ADN (Jordan et al., 1997; Khoroshilova et al., 1997; Popescu et al., 1998; Green et al., 2001; Sutton et al., 2004; Volbeda et al., 2015).

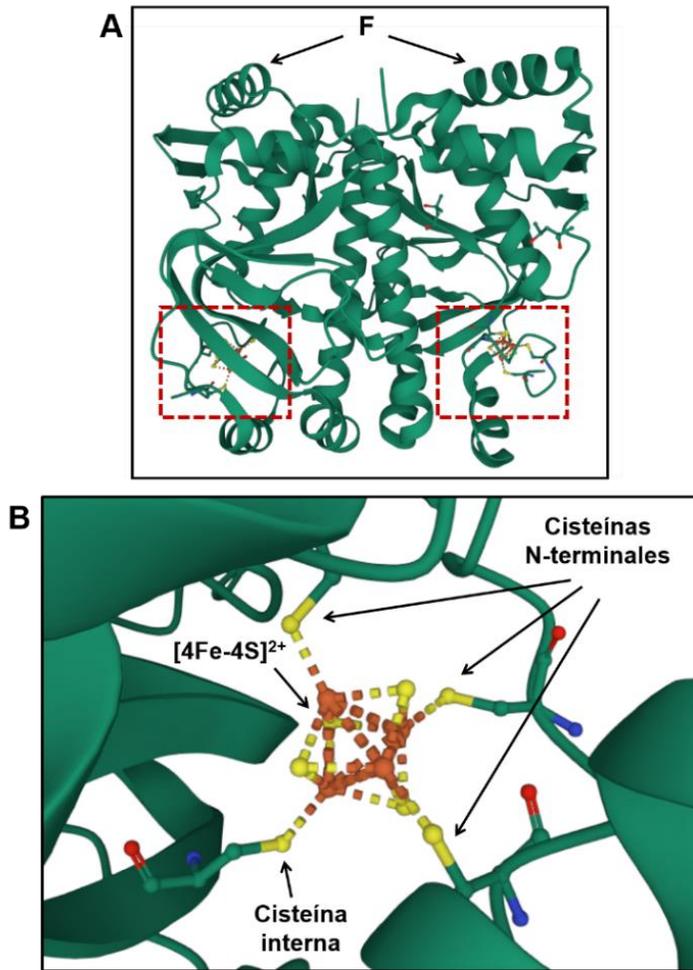


Figura 2.4.6. Estructura cristalina de la holoenzima FNR de *Aliivibrio fischeri*. A. Proteína FNR en estado dimérico. B. Visión ampliada de la región de la proteína donde se sitúa el grupo prostético $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ en complejo con 3 cisteínas amino-terminales y 1 cisteína interna. F, hélices α F de reconocimiento de ADN. PDB ID: 5E44. Adaptado de Volbeda et al., 2015.

Además de la regulación de la actividad de FNR mediante la unión a grupos $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$, los niveles de la proteína están controlados por el sistema chaperona-proteasa ClpXP en células de *E. coli* (Flynn et al., 2003), de manera que degrada la apo-forma monomérica (Mettert y Kiley, 2005). Este mecanismo, hasta la fecha, solo se ha descrito para FNR y la proteína FixK₂ de *B. diazoefficiens* (Bonnet et al., 2013; véase apartado 2.5.2).

2.4.4. CooA

Las proteínas de tipo CooA son capaces de detectar monóxido de carbono (CO) y controlar, en consecuencia, genes implicados en su metabolismo (Tripathi y Poulos, 2018), ya que algunas bacterias lo emplean como fuente de energía para crecer (Ensign et al., 1989; Kerby et al., 1995). La proteína CooA se identificó por primera vez en la bacteria fotosintética *R. rubrum*. En concreto, esta proteína (Figura 2.4.7) es capaz de unirse CO a través de un grupo hemo *b* como grupo prostético (Aono et al., 1996; He et al., 1996) y dicha unión tiene lugar a través del residuo C75 en estado férrico y a través del residuo H77 en el estado ferroso (Aono et al., 1998; Shelver et al., 1999). Según datos estructurales, el residuo P2 de la otra subunidad actuaría como segundo ligando para unirse a hemo (Lanzilotta et al., 2000).

La estructura de CooA de *Carboxydotherrmus hydrogenofomans* en complejo al ligando exógeno imidazol (Borjigin et al., 2007; Komori et al., 2007), conjuntamente con el resto de estructuras de esta proteína disponibles hasta la fecha, ha permitido profundizar en su mecanismo de activación en respuesta a CO. Dichas estructuras revelan una gran similitud de los dominios de las proteínas tipo CooA con aquellos característicos de CRP. No obstante, en el caso de la variante apo-CooA, la dimerización de la hélice αC se extiende por la hélice αD , posicionando al dominio de unión a ADN lejos del

dominio sensor. Así mismo, el movimiento del dominio de unión a ADN es posible gracias a la flexibilidad de la región bisagra. La otra diferencia se localiza en el extremo amino-terminal, más extenso y que sirve como ligando para el hemo de la otra subunidad (P2 para *R. rubrum* y M1 para *C. hydrogenoformans*). Tras la unión de CO al grupo hemo, el extremo amino-terminal se desplaza, colocándose entre el dominio sensor y el de unión a ADN, lo que permite un posicionamiento correcto de este último para una unión efectiva (Lanzilotta et al., 2000; Borjigin et al., 2007). Esto se ha denominado el modelo de “velcro N-terminal de activación” de CooA (Tripathi y Poulos, 2018).

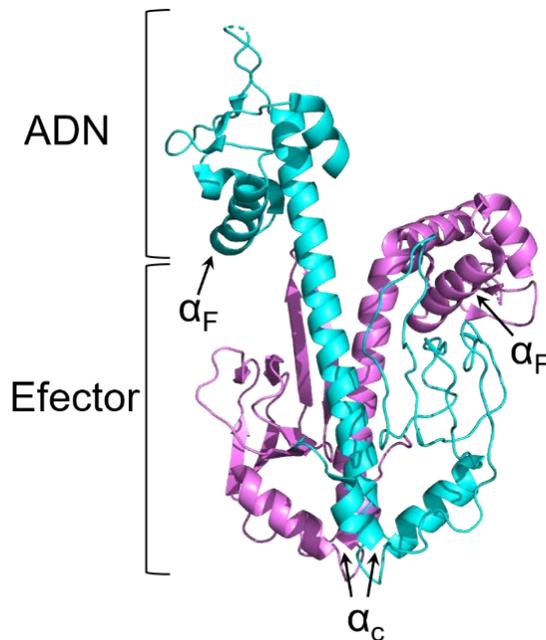


Figura 2.4.7. Estructura de CooA sin efector de *R. rubrum*. Adaptado de Kerby et al., 2003. La proteína consta de dos monómeros, coloreados de manera diferente, que dimerizan a lo largo de las hélices C centrales (α_C). El dominio de unión al ADN forma la parte superior de la estructura

y las posiciones de las hélices que interactúan específicamente con el ADN que se indican como α_F (número de acceso 1FT9). Los números de acceso de las proteínas se corresponden a la base de datos PDB.

2.4.5. Proteínas de tipo FixK/FnrN

Dentro de la familia CRP/FNR, los clados FixK y FnrN engloban reguladores relevantes implicados en el establecimiento de la simbiosis y la fijación de N_2 en rizobios. Tanto el análisis filogenético realizado por Körner et al. (2003), como el evolutivo que se llevó a cabo por Matsui y colaboradores (Matsui et al., 2013), sitúan a estos dos tipos de proteínas en agrupaciones diferentes. En concreto, en este último trabajo, las agrupaciones VII y IX del total de 12 que incluyen todos los miembros de la familia CRP/FNR, se corresponderían, principalmente, a los clados FnrN y FixK, respectivamente.

La similitud entre los miembros de estos dos grupos es bastante alta. En su extremo carboxilo-terminal presentan un motivo H-V-H de unión a ADN altamente conservado (Figura 2.3.2, paneles D y E; Spiro y Guest, 1990; Sawers, 1991; Spiro, 1994). En condiciones microóxicas, la forma dimérica activa de la proteína puede unirse a ADN y activar la transcripción de los genes diana. No obstante, los clados FnrN y FixK, difieren en su dominio sensor localizado en su extremo amino-terminal. Las proteínas de tipo FnrN conservan los cuatro residuos de cisteína necesarios para la unión al grupo prostético $[4Fe-4S]^{2+}$, similar a lo descrito para FNR, lo que le permite detectar directamente la concentración de O_2 (revisado en Körner et al., 2003; Matsui et al., 2013). Mientras que las proteínas de tipo FixK no los conservan y están integradas en cascadas de regulación como FixLJ ó hFixL-FxkR (revisado en Rutten y Poole, 2019). No obstante, se han descrito otros mecanismos alternativos

que modulan su función (revisado en Fernández et al., 2016; Rutten y Poole 2019; véase apartado 2.5.2).

Las proteínas FixK muestran una similitud del 35-45 % entre los ortólogos estudiados. En general, se considera que FixK es crucial para la fijación de N₂ en el entorno simbiótico (Körner et al., 2003), incluso en *S. meliloti*, *B. diazoefficiens* y *A. caulinodans* (David et al., 1988; Kaminski y Elmerich, 1991; Nellen-Anthamatten y Rossi, 1998), dónde una proteína de tipo FixK opera junto a un regulador tipo FnrN, el cual, generalmente, no es esencial (Patschkowski et al., 1996; Granados-Baeza et al., 2007).

Se han descrito una serie de características típicas para las proteínas de tipo FixK (Fischer, 1994). En primer lugar, su implicación en la inducción en respuesta a microoxia de la expresión de los operones *fixNOQP* y *fixGHIS*, que codifican, respectivamente, una oxidasa terminal de alta afinidad por el O₂ necesaria durante la simbiosis (Preisig et al., 1996; Koch et al., 2000; Körner et al., 2003). Este control por FixK es clave en especies de rizobios que codifican la cascada canónica FixLJ que responde a microoxia, pero no en aquellas que emplean la cascada hFixL-FxkR (D'hooghe et al., 1995; Patschkowski et al., 1996). De forma similar ocurre en *A. caulinodans*, donde la expresión de *fixGHI* ocurre en condiciones de vida libre, de forma independiente a FixK y O₂. Estas diferencias reflejan la capacidad de este organismo para realizar la fijación de N₂ en vida libre utilizando múltiples oxidاسas terminales (Dreyfus y Dommergues, 1981; Dreyfus et al., 1983; Gebhardt et al., 1984; Kitts y Ludwig, 1994).

Las proteínas FixK también auto-regulan su propia expresión. Este es un mecanismo común, independientemente del tipo de cascada FixLJ. En *S. meliloti* la represión de FixK es indirecta (Fousard et al., 1997), a través de su diana *fixT* (Berges et al., 2001).

FixT parece actuar como una anti-quinasa, reprimiendo la fosforilación de FixL (Garnerone et al., 1999), lo que inhibe la cascada FixLJ y, a su vez, reprime la inducción de *fixK*, completando así el ciclo de auto-regulación negativa de FixK (Garnerone et al., 1999). FixT también podría actuar con un mecanismo alternativo para interferir en la expresión génica mediada por FixLJ (Rutten y Poole, 2019). En *B. diazoefficiens*, el mecanismo de auto-regulación negativa de FixK₂ es desconocido (Nellen-Anthamatten y Rossi, 1998; Körner et al., 2003; Mesa et al., 2005; Reutimann et al., 2010).

Otra función menos frecuente de las proteínas de tipo FixK es la regulación de la expresión de *nifA*, el activador central de la fijación de N₂ (Fischer, 1994; Dixon y Kahn, 2004). Mientras que en *S. meliloti*, FixK reprime la expresión de *nifA* (Batut et al., 1989; Reyrat et al., 1993), en *A. caulinodans*, la activa (Kaminski et al., 1991; Fischer, 1996). En el caso de *B. diazoefficiens*, el efecto del regulador FixK₂ sobre *nifA* es indirecto, ya que modula la actividad de la proteína NifA a través del control de la expresión de *rpoN*₁, que codifica el factor σ^{54} requerido para la activación transcripcional mediada por NifA (Kullik et al., 1991; Mesa et al., 2008). Este mecanismo se ha descrito en otros rizobios, como por ejemplo *R. etli*, donde el control de la concentración de RpoN por FixK constituye un mecanismo de modulación de la actividad de NifA (Rutten y Poole, 2019).

Como se ha mencionado, las proteínas FnrN detectan directamente la concentración de O₂ a través de un mecanismo muy similar al descrito para FNR (Spiro, 1994; Guest et al., 1996). No obstante, el motivo de cisteínas necesario para la unión al grupo [4Fe-4S]²⁺ es algo diferente al de FNR y consiste en 3 cisteínas en la región amino-terminal con una coordinación C-X₂₋₃-C-X₇-C y una cisteína central (Fischer, 1994). La presencia de proteínas de tipo FnrN se

correlaciona con la cascada hFixL-FxkR-FixK, donde ejercen la función de detectar la concentración de O₂ y, en consecuencia, regular sus genes diana, entre ellos los operones *fixNOQP* y *fixGHIS*.

Tanto la expresión como la auto-regulación de *fnrN* parecen ocurrir sólo bajo condiciones microóxicas (Colombo et al., 2000). Este efecto regulador se debe a la presencia de dos secuencias de reconocimiento en el promotor de los genes *fnrN*: un sitio de alta afinidad en la región distal y un sitio de baja afinidad en la región proximal. La unión de FnrN al lugar de unión distal induce la expresión de *fnrN*. Cuando los niveles de FnrN son altos, se une al lugar de unión de baja afinidad y reprime la transcripción de *fnrN*.

Las proteínas FnrN pueden actuar de forma redundante junto a proteínas FixK cuando coexisten en un organismo, como ocurre en *R. etli* CFN42 (Schlüter et al., 1997; Lopez et al., 2001; Zamorano-Sanchez et al., 2012), o bien compensar la ausencia de un homólogo de FixK en situaciones en las que no existe como ocurre en *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Rlv UPM791) (Gutierrez et al., 1997), en el que se codifican dos copias de *fnrN* (Rutten y Poole, 2019). Sin embargo, no siempre pueden suplir la función de una proteína de tipo FixK, como ocurre en el caso de FixK₂ de *B. diazoefficiens*, ya que sus funciones solo se reemplazan cuando FixK₁, su parálogo de tipo FnrN, se expresa de forma constitutiva (Nellen-Anthamatten et al., 1998; Mesa et al., 2008).

2.5. Proteínas CRP/FNR en *Bradyrhizobium diazoefficiens*

De acuerdo con lo descrito en secciones anteriores, la redundancia de proteínas CRP/FNR es común en rizobios. En particular, *B. diazoefficiens*, el endosimbionte de la soja, contiene un total de 16 proteínas de tipo CRP/FNR potenciales que engloban, como clados principales, FixK, FnrN, NnrR y NtcA (Figura 2.5.1; Mesa et al.

2006). Dentro del clado FixK, la proteína FixK₂ juega un papel central en la cascada FixLJ que responde a microoxia en esta bacteria (apartado 2.5.1; Mesa et al., 2008).

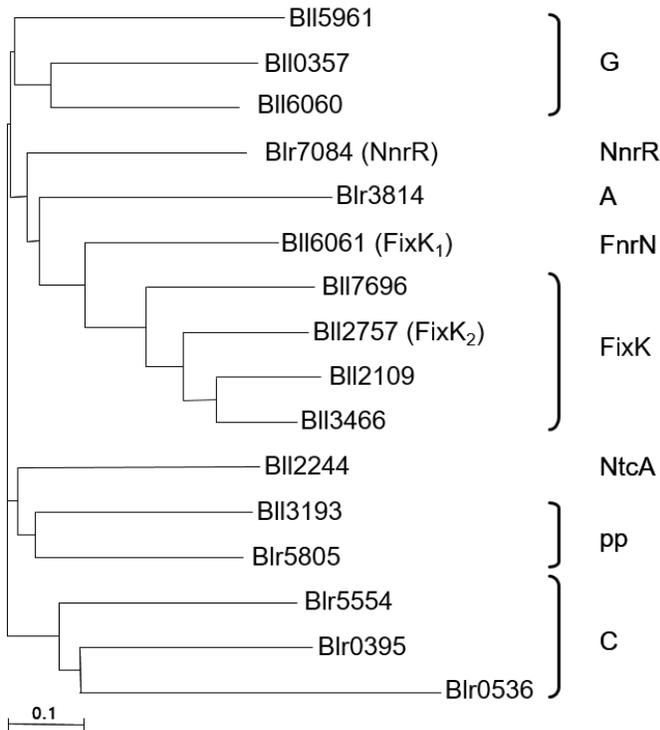


Figura 2.5.1. Árbol filogenético de las 16 proteínas tipo CRP/FNR de *B. diazoefficiens*. Adaptado de Mesa et al., 2006. El alineamiento múltiple de las secuencias de proteínas se realizó y analizó como se describe por Mesa y colaboradores (2003). Las proteínas se nombran según la nomenclatura del gen anotado en el genoma de *B. diazoefficiens* (<http://www.kazusa.or.jp/rhizobase/>) donde la primera letra se escribe en mayúsculas. Las diferentes agrupaciones se indican según la clasificación descrita en Körner et al., 2003 (FnrN, FixK, NnrR, A, C y G, pp). BII2244 podría constituir el grupo NtcA. La barra de escala representa una distancia de 0,1 sustituciones por posición.

2.5.1. *B. diazoefficiens*

B. diazoefficiens (*Bradyrhizobium japonicum* hasta 2013; Delamuta et al., 2013), pertenece a la familia *Bradyrhizobiaceae* dentro del orden Rhizobiales y representa una de las bacterias más beneficiosas e importantes que se usan en agricultura. Además de establecer interacciones simbióticas con plantas de soja, es el único rizobio conocido que puede llevar a cabo el proceso de desnitrificación de forma completa en condiciones de microoxia, tanto en vida libre como en simbiosis (Mesa et al., 2004; Bedmar et al., 2005; Bedmar et al., 2014). Esto hace que se emplee como modelo para estudiar ambos procesos en un solo organismo.

En *B. diazoefficiens* el proceso de desnitrificación, es decir la reducción de NO_3^- a N_2 molecular, con NO_2^- , NO y N_2O como intermediarios, tiene lugar por la acción secuencial de cuatro enzimas: una nitrato reductasa periplásmica (Nap), una nitrito reductasa de tipo cobre (NirK), una óxido nítrico reductasa tipo c (Nor) y una óxido nitroso reductasa (Nos) codificadas, respectivamente, por los genes *napEDABC*, *nirK*, *norCBQD* y *nosRZDFYLX* (Velasco et al., 2001, 2004; Mesa et al., 2002; Delgado et al., 2003; Bedmar et al., 2005, 2013).

B. diazoefficiens tiene la peculiaridad de poseer una red de regulación en respuesta a microoxia formada por dos cascadas conectadas entre sí (FixLJ-FixK₂, y RegSR-NifA), para el control de la expresión de genes esenciales para el metabolismo microóxico y anóxico de esta bacteria, en vida libre y en simbiosis (Figura 2.5.2; Sciotti et al., 2003; Fernández et al., 2016; Salas et al., 2021). Estas cascadas responden a concentraciones de oxígeno diferentes. Mientras que la cascada RegSR-NifA integra la señal de $\leq 0,5\%$ de O_2 a nivel del regulador NifA, la cascada FixLJ, que es de tipo canónico, responde a concentraciones $\leq 5\%$ de O_2 . En esta última

cascada, la activación del sistema de dos componentes da lugar a la inducción de la expresión del gen *fixK₂*, y, en consecuencia, la proteína FixK₂ activa la transcripción de más de 300 genes, entre ellos, los genes *fixNOQP* que codifican la oxidasa terminal de alta afinidad por O₂, además de genes reguladores y genes de la desnitrificación (Mesa et al., 2003, 2008).

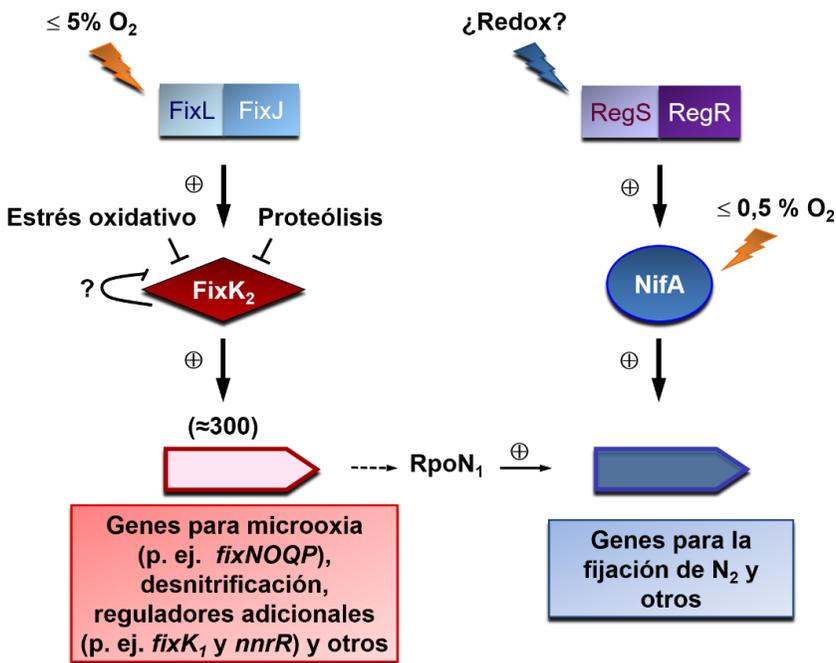


Figura 2.5.2. Red de regulación que responde a microoxia en *B. diazoefficiens*. Modificado de Fernández et al., 2016. Dos cascadas de regulación vinculadas controlan genes esenciales para el metabolismo microóxico, anóxico y simbiótico. El O₂ se indica con rayo naranja. Las líneas que terminan en flechas o barras indican activación y represión de la regulación, respectivamente. La línea discontinua apuntando a “RpoN₁” hace referencia a que está incluida en el regulón de FixK₂. Los sistemas de dos componentes se muestran con rectángulos. Las flechas gruesas indican regulones. Rombos y elipses representan factores transcripcionales.

2.5.2. FixK₂ como proteína clave

FixK₂ es una de las 16 proteínas CRP/FNR (Körner et al. 2003; consulte sección 2.3.1.2) presentes en el genoma de *B. diazoefficiens* según el análisis de comparativo y filogenético llevado a cabo por Mesa y colaboradores (Figura 2.5.1; Mesa et al. 2006). Pertenecer al subgrupo FixK, junto con BII2109, BII3466 y BII7696, proteínas muy similares a los clados FNR y FnrN que carecen de una o más de las cuatro cisteínas requeridas para unirse al grupo [4Fe-4S]²⁺.

Como se mencionó en apartados anteriores, FixK₂ ejerce un papel clave dentro de la cascada FixLJ-FixK₂, ya que distribuye la señal de microoxia que se percibe a nivel del sistema de dos componentes FixLJ. Así que regula un grupo numeroso de genes implicados en el metabolismo micróxico, anóxico y simbiótico de *B. diazoefficiens*, entre los que obviamente se incluye su diana prototipo *fixNOQP* (Figura 2.5.2). Otro de los genes característicos bajo el control de FixK₂ es *rpoN₁*, que codifica el factor σ^{54} que colabora con el regulador NifA para activar la expresión genes esenciales para la fijación de N₂. Por lo que FixK₂ actúa como nexo de unión entre las cascadas FixLJ-FixK₂ y RegSR-NifA.

El grupo de genes controlados por FixK₂ también incluye una serie genes reguladores (Mesa et al., 2008), de manera que expande la cascada FixLJ. En particular, 4 de ellos codifican proteínas de tipo CRP/FNR: FixK₁ que pertenece al clado FnrN, BII2109 y BII3466 que forman parte del clado FixK conjuntamente con la propia proteína FixK₂ y NnrR, el regulador que integra la señal de óxidos de nitrógeno para la máxima expresión de los genes de la desnitrificación y constituye un clado con su mismo nombre (Mesa et al., 2006; Mesa et al., 2003; Jiménez Leiva et al., 2019; Salas et al., 2021). En concreto, NnrR es capaz de percibir la señal de NO y

activar de forma directa la expresión de los genes *norCBQD* que codifican la Nor (Bueno et al., 2017).

Por otro lado, al igual de lo descrito para sus ortólogos, la proteína FixK₂ también auto-regula negativamente su propia expresión (Figura 2.5.2; Nellen-Anthamatten et al., 1998; Reutimann et al., 2010; Fernández et al., 2016). No obstante, el mecanismo asociado a este control es desconocido hasta la fecha y parece ser distinto al correspondiente a FixK de *S. meliloti* (Garnerone et al., 1999; Reutimann et al., 2010).

El mecanismo de activación de la transcripción por FixK₂ es muy similar al descrito para los miembros de la familia CRP/FNR a la que pertenece (apartado 2.4.1). Para ello, como homodímero, se une a una secuencia palindrómica consenso de 14 pares de bases (TTGA/C-N₆-T/GCAA; caja FixK₂) situada a una determinada posición del inicio de la transcripción de los genes que regula (generalmente -41) y, en consecuencia, activa su transcripción (Mesa et al., 2005; Cabrera et al., 2021). Curiosamente, FixK₂ en solución se encuentra en un equilibrio monómero-dímero que se desplaza a la forma dimérica a concentraciones superiores a 20 μM (Mesa et al., 2005).

FixK₂ también preserva la estructura típica de las proteínas de tipo CRP/FNR (apartado 2.4.1). No obstante, tiene la peculiaridad de carecer de un módulo obvio de unión a efector en su dominio sensor. En este sentido, hay que mencionar que proteína FixK₂ recombinante purificada de células de *E. coli* cultivadas de forma óxica es activa en un ensayo de activación de la transcripción *in vitro* (IVT) sin un activador reconocible (Mesa et al., 2005). No obstante, la concentración de proteína FixK₂ requerida para inducir la transcripción es superior a la de otros ortólogos como CRP o FNR (Browning y Busby 2004). Otra característica significativa de FixK₂

es su regulación a nivel postraduccional por oxidación del residuo C183 (Mesa et al., 2009) y por proteólisis específica (entre los residuos V220 y L221; M. Bonnet, 2011) y general, mediada por el sistema ClpAP₁ (Bonnet et al., 2013b; revisado en Fernández et al., 2016). Recientemente, también se identificó un control a nivel posttranscripcional de FixK₂ en respuesta a microoxia (Fernández et al., 2019). Estas evidencias experimentales hacen que esta proteína se considere un modelo de estudio dentro de la familia de factores transcripcionales de tipo CRP/FNR.

2.5.2.1. Relación estructura-función

Con el objeto de comprender mejor el mecanismo molecular de FixK₂ se abordó su cristalización y resolución de la estructura (Bonnet et al. 2013a). Para ello se empleó una variante de proteína insensible a la oxidación y al sistema proteolítico chaperona-proteasa ClpAP₁ (C183S FixK₂His₆), en complejo con la caja FixK₂ presente en la región promotora de los genes *fixNOQP*. La estructura FixK₂-ADN, a una resolución de 1,77 Å, constituyó la primera de una proteína CRP/FNR sensible a O₂. (Figura 2.5.3).

FixK₂ forma un homodímero con una simetría doble perfecta (Bonnet et al. 2013a; Figura 2.5.3A) en el que cada monómero consta 7 hélices (α A- α G) y 12 láminas (β 1- β 12) (Figura 2.5.3B) distribuidos en dos dominios, el sensor y el de unión a ADN, unidos por la hélice α C (residuos 128-154), que está implicada en la dimerización de los dos monómeros. El dominio sensor en la parte amino-terminal, está formado por las hélices α A- α B (residuos 1-127) y las láminas β 2- β 9 (residuos 41-116). El dominio de unión a ADN en la parte carboxilo-terminal, está formado por las hélices α D- α G y las láminas β 10- β 12 (residuos 155-236) y contiene el motivo H-V-H comprendido en las hélices α E y α F (residuos 184-216). En el motivo H-V-H, los residuos L195, E196 y R200 de cada monómero de

FixK₂ interaccionan específicamente con las bases 1, 12 y 3/11 de la caja FixK₂ situada en la región promotora de los genes *fixNOQP* (Figura 2.5.3; Bonnet et al., 2013a).

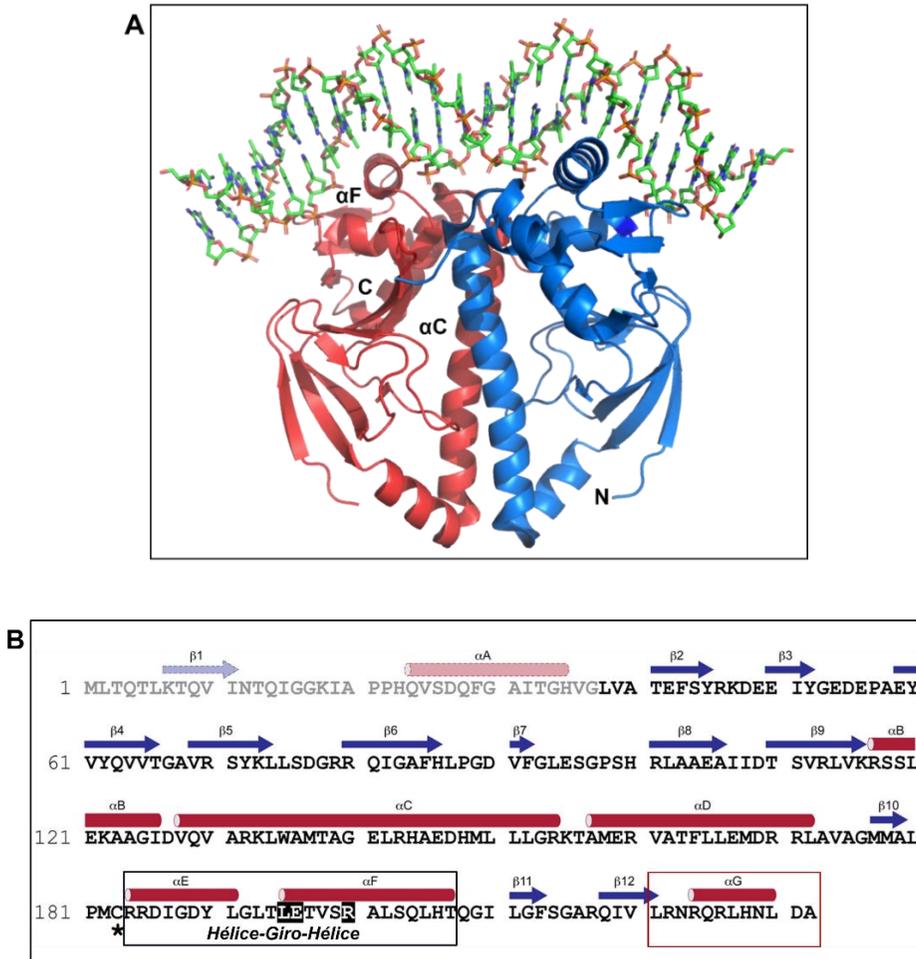


Figura 2.5.3. Dominios estructurales de FixK₂. Adaptado de Bonnet et al., 2013a. A: Estructura del complejo C183S FixK₂-His₆ con ADN de doble cadena que contiene la caja FixK₂ presente en la región promotora de los genes *fixNOQP*. Los dos monómeros se indican en azul y rojo. B: Estructura secundaria de FixK₂. Se muestran los siguientes elementos estructu-

rales: hélices α (rojo), láminas β (azul), H-V-H (enmarcado en negro; dominio de unión a ADN), residuos clave en la interacción con la caja FixK₂ (letras blancas sobre fondo negro), C183 (asterisco), últimos 12 aminoácidos que constituyen el lugar de reconocimiento del sistema proteolítico ClpAP₁ (enmarcado en rojo).

Curiosamente, aunque FixK₂ no requiera, aparentemente, ningún cofactor para activar la transcripción *in vitro* (Mesa et al., 2005), en la estructura del complejo FixK₂-ADN se observó la presencia de una cavidad con carga negativa en cada uno de los monómeros que indica la posible unión a una molécula efectora (Figura 2.5.4; Bonnet et al., 2013a). Esta cavidad conserva homología con el lugar de unión de a AMPc de alta afinidad en CRP (Passner y Steitz, 1997), aunque los aminoácidos implicados en la unión a AMPc no están conservados. De hecho, la presencia de AMPc no influye ni en el estado oligomérico ni en la actividad de FixK₂ *in vitro* (Mesa et al., 2005). Sin embargo, resultaría interesante investigar la posible función de esta cavidad en el mecanismo de FixK₂.

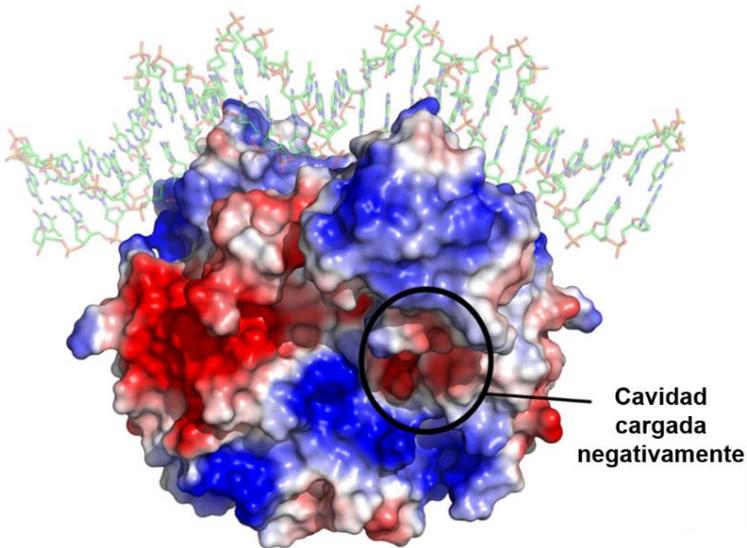


Figura 2.5.4. Visualización de la carga eléctrica de superficie de la proteína FixK₂. La estructura del complejo FixK₂-ADN presenta una cavidad con carga negativa en cada monómero (marcada con un círculo en uno de ellos) que indica la posible unión a una molécula efectora (adaptado de Bonnet et al., 2013a). Carga negativa (rojo), carga positiva (azul), carga neutra (blanco). Imagen obtenida con PyMOL® versión 2.2.3.

La estructura FixK₂-ADN reveló que, efectivamente, el residuo implicado en la sensibilidad a la oxidación es una cisteína localizada en posición 183, expuesta en la superficie y localizada en la proximidad del dominio de unión a ADN (Bonnet et al. 2013a). La oxidación de la cisteína conlleva a la formación de derivados de ácido sulfénico, sulfínico y sulfónico, y, en consecuencia, a un impedimento estérico y una repulsión electrostática con el grupo fosfato del ADN con carga negativa, bloqueando la unión de FixK₂ al ADN o al menos la flexión de este último. Esto explicaría la inhibición por ROS de FixK₂ a nivel postraduccional (Mesa et al., 2009). Este control postraduccional por oxidación también se ha descrito para la

proteína CprK de *Desulfitobacterium dehalogenans*, pero en este caso, la oxidación de las cisteínas da lugar a la formación de puentes de sulfuro intra- e intermoleculares (Levy et al. 2008; Bonnet et al., 2013a).

La última hélice de FixK₂ (α G) está expuesta en superficie, lo que la hace susceptible a proteasas, bien por escisión y por degradación por el sistema ClpAP₁. La escisión de los últimos 12 aminoácidos de FixK₂ ocurriría entre los residuos V220 y L221 situados en la cadena β 12 (Figura 2.5.3B). Curiosamente, esta cadena, conjuntamente con las cadenas β 10, β 11, forma parte de una lámina β muy cercana al dominio de unión al ADN. Aunque esta lámina β no interactúa directamente con el ADN, se forman enlaces de hidrógeno entre la cadena β 12 y la hélice α G y entre la hélice α G y la hélice α E, que contiene el motivo H-V-H. Por lo tanto, la escisión de los últimos 12 aminoácidos afectaría al dominio de unión al ADN con la consecuente inactivación de la proteína. La hélice α G también está presente en otros miembros de la familia CRP/FNR como CprK de *D. dehalogenans*, PrfA de *Listeria monocytogenes* y SdrP de *Thermus thermophilus*, donde juega un papel crucial en la actividad y la unión al ADN. Por ejemplo, en CprK, el extremo carboxilo-terminal interactúa directamente con el ADN, pero no está estructurado en la apo-forma de la proteína. En PrfA, su mutación altera la unión al ADN y, en consecuencia, la activación de los genes diana (Herler et al. 2001; Eiting et al. 2005; Levy et al. 2008; Agari et al. 2008).

2.5.2.2. Control postraducciona l por proteólisis

Como se ha mencionado anteriormente, la proteína FixK₂ está controlada a nivel postraducciona l por proteólisis. Una primera evidencia fue el hecho que sus niveles en células de *B. diazoefficiens* permanecen constantes independientemente de la concentración de

O₂ (Mesa et al. 2009). Posteriormente, en un estudio de proteómica de bacteroides de *B. diazoefficiens* procedentes de nódulos de soja realizado por Delmotte y colaboradores (Delmotte et al. 2010) no fue posible detectar la proteína FixK₂. Sin embargo, sí se observó inducción a nivel de expresión génica, lo cual es indicativo de la existencia de un control postranscripcional. Además, en la purificación de FixK₂ como proteína recombinante purificada, siempre se observa la existencia de un derivado con una escisión de 12 aminoácidos en su parte carboxilo-terminal, entre los residuos V220 y L221, cuando no se etiqueta su parte carboxilo-terminal (M. Bonnet, 2011). Es más, este derivado truncado es inactivo en ensayos de IVT (M. Bonnet y S. Mesa, resultados no publicados).

La parte carboxilo-terminal de FixK₂ también es la secuencia de reconocimiento del sistema proteolítico ClpAP₁ (Bonnet et al., 2013b). Este sistema es de tipo chaperona-proteasa, complejos proteicos dependientes de energía y responsables de la degradación de proteínas truncadas o mal plegadas. Además, degradan sustratos específicos (revisado en Kress et al. 2009; Schmidt et al. 2009; Fernández et al., 2016). Constan de dos partes diferenciadas: un anillo de chaperona hexamérica perteneciente a la familia AAA+ ATPasas y un cilindro de proteasa (Figura 2.5.5), además de adaptadores que modulan su función. Un estudio de degradación realizado con la chaperona ClpA, la proteasa ClpP₁ y su adaptador ClpS₁ de *B. diazoefficiens* recombinantes demostró que FixK₂ es un sustrato específico de este sistema proteolítico (Bonnet et al. 2013b). De hecho, los últimos 12 aminoácidos de FixK₂ constituyen la principal secuencia de reconocimiento de ClpA, si bien los primeros 9 aminoácidos también contribuyen parcialmente a la degradación de FixK₂ (Bonnet et al. 2013b; revisado en Fernández et al., 2016).

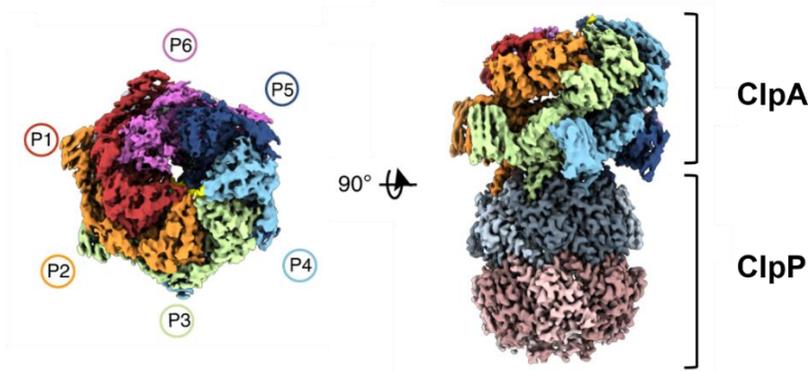


Figura 2.5.5. Vistas superior y lateral de ClpAP de *E. coli*. Vista superior de ClpA coloreada por protómeros individuales (parte izquierda de la figura). Giro de 90° del complejo proteico (parte derecha de la figura). ClpP formando un cilindro de proteasa (parte derecha inferior de la figura). Adaptado de Lopez et al., 2020. PDB ID: 6W21.

Este tipo de control proteolítico también se ha descrito en FNR de *E. coli*, donde los niveles de la proteína están controlados por otro sistema chaperona-proteasa de tipo Clp, en concreto ClpXP (Flynn et al. 2003; Mettert y Kiley 2005; revisado en Fernández et al., 2016). Es más, la secuencia carboxilo-terminal de FNR juega un papel crucial en la degradación de la apo-forma (inactiva) de FNR por ClpXP, ya que las posiciones 239-244 de la proteína promueven un pliegue estructural que limita la exposición del sitio de unión de este sistema proteolítico (Mettert y Kiley 2005; Pan et al. 2012).

2.5.2.3. Control postraduccional por oxidación y sus implicaciones *in vivo*

Además del control por proteólisis, FixK₂ también está regulada postraduccionalmente por oxidación, a nivel de una cisteína exclusiva

(C183), próxima al motivo H-V-H del dominio de unión al ADN (Figura 2.5.6). La oxidación de C183 *in vitro* desencadena la formación de puentes disulfuro intermoleculares reversibles entre los dos monómeros, así como la formación de derivados irreversibles de ácido sulfínico o sulfónico (Mesa et al. 2009), lo que da como resultado la inactivación de la proteína. *In vivo*, el mecanismo de oxidación más probable es el de la superoxidación.

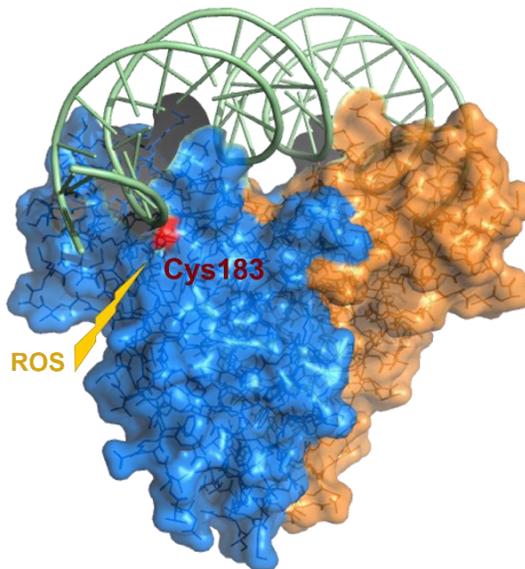


Figura 2.5.6. Representación en superficie complejo C183S FixK₂-His₆ con ADN. Los monómeros de FixK₂ se indican en azul y naranja. El residuo C183 (resaltado en rojo) próximo a la cadena de ADN y expuesto en superficie es sensible a ROS y, por lo tanto, está implicado en la inactivación de FixK₂.

La importancia de este control por oxidación de FixK₂ en las células de *B. diazoefficiens* se basa en pruebas indirectas. Un análisis transcriptómico de células de *B. diazoefficiens* cultivadas en

condiciones microóxicas y tratadas con H_2O_2 mostró que la expresión de la mayor parte de los genes regulados directamente por FixK₂ se reduce por la presencia de este agente ROS en la cepa parental, mientras que no se afecta en una cepa de con una mutación puntual del residuo C183 a alanina o a serina (Mesa et al., 2009). La oxidación de FixK₂ podría ser relevante para detener instantáneamente su actividad en respuesta a ROS durante la interacción simbiótica con la planta huésped, en concreto durante la etapa temprana de la infección del pelo radicular, en el proceso de respiración endosimbiótica, y posteriormente durante la senescencia del nódulo. En todas estas circunstancias, la actividad de FixK₂ podría no ser necesaria o incluso perjudicial (Pauly et al. 2006; Chang et al. 2009; revisado en Fernández et al., 2016).

Un estudio llevado a cabo por Sugawara y colaboradores describió otra posible función del control por oxidación de la proteína FixK₂: su posible vinculación con el metabolismo del azufre en *B. diazoefficiens* (Sugawara et al. 2011). La comparación del perfil transcripcional de células cultivadas en medio mínimo con cisteína (como fuente reducida de azufre) con el de las células cultivadas con sulfato o sulfonato (fuente oxidada de azufre), indicó que el 85% de los genes expresados diferencialmente en dicha comparación estaban regulados por la cascada FixLJ-FixK₂ (Mesa et al. 2008). A diferencia de los genes regulados por FixK₂, que mostraron una mayor expresión en presencia de cisteína, la expresión del gen *fixK₂* se vio incrementada en un crecimiento en presencia de sulfato y sulfonatos. Una hipótesis plausible sería que, mientras el crecimiento con cisteína podría ayudar a mantener FixK₂ en su configuración activa, el crecimiento con sulfato o sulfonato podría provocar estrés oxidativo y conducir a la oxidación de C183 en FixK₂, disminuyendo, por tanto, la expresión de genes regulados por FixK₂ (revisado en Fernández et al., 2016).

Teniendo en cuenta el papel de las ROS en la interacción simbiótica y todas estas evidencias que indican la relevancia del control postraduccional por oxidación de FixK₂ *in vivo*, resultaría interesante profundizar en el mecanismo asociado a dicho control, así como otras posibles implicaciones en *B. diazoefficiens*, sobre todo en la simbiosis con plantas de soja.

3

OBJETIVOS

3. Objetivos

En *Bradyrhizobium diazoefficiens*, endosimbionte de la soja y bacteria del suelo que realiza la desnitrificación de forma completa, existe una compleja red de regulación formada por dos cascadas interconectadas entre sí (RegSR-NifA y FixLJ-FixK₂) que responde a baja tensión de oxígeno (microoxia). En esta segunda cascada, la proteína FixK₂ juega un papel esencial, ya que controla la expresión de un grupo numeroso de genes necesarios para el metabolismo microóxico, simbiótico y para la desnitrificación. También constituye el nexo de unión con la cascada RegSR-NifA, a través de su regulación de la expresión del gen *rpoN*₁ que codifica el factor σ^{54} que colabora con la proteína NifA para la activación de los genes implicados en la fijación de N₂.

FixK₂ es una de las 16 proteínas de tipo CRP/FNR (*cyclic AMP receptor protein/fumarate-nitrate reductase regulator*) presentes en *B. diazoefficiens*. En particular, pertenece al clado FixK, conjuntamente con sus parálogos BII2109, BII3466 y BII7696, proteínas que carecen de un motivo de cisteínas en su módulo sensorial para la unión al grupo prostético [4Fe-4S]²⁺ para la percepción de la señal de microoxia. No obstante, FixK₂ es un ejemplo único en *B. diazoefficiens*, ya que regula de forma exclusiva e irremplazable la respiración bacteriana dentro de los nódulos y la desnitrificación. La expresión del gen *fixK*₂ está compensada entre la activación por el sistema de dos componentes FixLJ y la auto-represión mediada por la propia proteína FixK₂ por un mecanismo todavía desconocido. De forma excepcional dentro de la familia CRP/FNR, la expresión y actividad de FixK₂ se modulan a nivel postranscripcional y postraduccional, respectivamente. Este último modo de regulación implica una proteólisis por escisión específica y un mecanismo de degradación general por el sistema chaperona-proteasa ClpAP₁, así como

la oxidación a nivel del residuo C183 en respuesta a agentes oxidantes.

La estructura del complejo FixK₂-ADN fue la primera conocida de proteínas de tipo CRP/FNR que responden a oxígeno. Su resolución no solo ha permitido identificar los diferentes dominios estructurales: sensorial, de dimerización y de unión a ADN, sino también establecer las bases moleculares de su inactivación asociada al control postraduccional por proteólisis y oxidación. Por lo que constituye la base de este estudio.

En la estructura FixK₂-ADN, el residuo C183 está expuesto en superficie y próximo al lugar de unión a ADN, lo que explica su susceptibilidad a oxidarse a ácido sufénico, sulfínico y sulfónico en presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS). Esto genera un impedimento estérico y una repulsión electrostática que impide la interacción proteína-ADN y, en consecuencia, la activación de los genes regulados por FixK₂. La importancia de este control postraduccional por oxidación de FixK₂ en respuesta a ROS, se ha demostrado indirectamente en células de *B. diazoefficiens* crecidas en vida libre. Sin embargo, no se pudo asignar una función de este mecanismo en la respuesta a las ROS que se producen en diferentes etapas de la interacción rizobio-leguminosa. Por lo que sería interesante desarrollar una aproximación experimental para profundizar en el mecanismo y en las consecuencias de la oxidación de FixK₂ *in vivo*, tanto en vida libre como durante la simbiosis.

Diversos estudios previos indicaron la importancia del estado oligomérico de las proteínas de tipo CRP/FNR para activar la transcripción de sus dianas en colaboración con la ARN polimerasa, ya que, generalmente, se unen en forma de dímeros a una secuencia conservada que se localiza en su región promotora. En el caso de FixK₂, existe un equilibrio monómero-dímero en solución que se

desplaza a la forma dimérica a concentraciones superiores a 20 μM . En la estructura FixK₂-ADN, los residuos 128-154 forman parte de una hélice (αC), posiblemente implicada en la dimerización de la proteína, debido al grado de conservación con la de otras proteínas ortólogas como FNR y CRP, ambas de *Eschericia coli* ó CooA de *Rhosdospirillum rubrum*. En estas proteínas, el contacto entre monómeros ocurre a través de la interacción de residuos hidrofóbicos de las posiciones *a* y *d* de una espiral heptamérica. Estos residuos también participan en la conformación de la proteína, su capacidad de interacción con moléculas efectoras y con ADN, así como en la actividad de las mismas. Teniendo en cuenta todos estos aspectos y el escaso conocimiento sobre la relevancia del estado oligomérico de FixK₂ en el mecanismo molecular de la proteína, se podría abordar un estudio funcional de la hélice de dimerización de FixK₂.

Resultados anteriores del Grupo de Investigación demostraron que FixK₂ es capaz de activar la transcripción de los genes que regula en colaboración con la ARN polimerasa de *B. diazoefficiens* sin necesidad de ningún cofactor conocido. Sin embargo, la estructura del complejo FixK₂-ADN reveló la presencia de una cavidad con carga negativa en cada uno de los monómeros que indica la posible unión a una molécula efectora. Es más, dicha cavidad presenta homología con el lugar de unión a AMP cíclico (AMPC) de alta afinidad en la proteína CRP, si bien la presencia de AMPC no afectó ni al estado oligomérico ni a la actividad de FixK₂. Por tanto, sería interesante abordar la identificación de un posible cofactor que module la actividad de FixK₂.

De acuerdo a los antecedentes descritos, en esta Tesis Doctoral se plantearon los siguientes Objetivos:

1. Profundizar en el conocimiento del mecanismo molecular del control postraducciona por oxidación de FixK₂.
 2. Caracterizar el dominio de dimerización de la proteína FixK₂.
 3. Realizar una modelización molecular proteína-ligando para la identificación del posible cofactor de FixK₂.
-

1. To deepen our understanding of the mechanism underpinning the oxidation-mediated posttranslational control of FixK₂.
2. To characterize the dimerization domain of the FixK₂ protein.
3. To perform a protein-ligand modeling approach for the identification of the putative cofactor for FixK₂.

4

MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

4.1.1. Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas de *E. coli* y *B. diazoefficiens* utilizadas en este trabajo y las descripciones más relevantes se indican en la siguiente tabla (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Cepas bacterianas.

Cepa	Descripción	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>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	-	Bethesda Research Laboratories Inc., Gaithersburg, Maryland, Estados Unidos
S17-1	<i>thi pro recA hsdR hsdM</i> RP4Tc::Mu Km::Tn7	Tp ^r Sm ^r Spc ^r	Simon et al., 1983
SM10	<i>thi thr leu tonA lacY supE</i> <i>recA::RP4-2-Tc::Mu Km</i> λ <i>pir</i>	Km ^r	Simon et al., 1983
ER2566	<i>fhuA2 lacZ::T7 gene1</i> [lon] <i>ompT gal sulA11</i> <i>R(mcr-73::miniTn10-Tet^S)2 [dcm]</i> <i>R(zgb-210::Tn10-Tet^S)</i> <i>endA1</i> Δ (<i>mcrC-mrr</i>)114::IS10	-	New England Biolabs (NEB), USA
<i>B. diazoefficiens</i>			
USDA 110	Cepa silvestre	Cm ^r	Departamento de Agricultura, Beltsville, Maryland, Estados Unidos

Cepa	Descripción	Resistencia	Referencia
110spc4	Cepa silvestre	Cm ^r Spc ^r	Regensburger y Hennecke, 1983
110spc4-1121	$\Delta fixK_2$	Cm ^r Spc ^r	Cabrera et al., 2021
9043	$fixK_2::\Omega$	Cm ^r Spc ^r Sm ^r	Nellen-Anthamatten et al., 1998
8855	C183S $fixK_2$	Cm ^r Spc ^r	Colección de laboratorio
1255	C183D- $fixK_2$	Cm ^r Spc ^r	Este trabajo
1293	H100A $fixK_2$	Cm ^r Spc ^r	Este trabajo
1295	C183S-W135A $fixK_2$	Cm ^r Spc ^r	Este trabajo
1296	C183S-L142A $fixK_2$	Cm ^r Spc ^r	Este trabajo
1297	C183S-M149A $fixK_2$	Cm ^r Spc ^r	Este trabajo
1298	C183S-E141A $fixK_2$	Cm ^r Spc ^r	Este trabajo
3604	$fixNOQP-lacZ$ integrada en el cromosoma de 110spc4	Cm ^r Spc ^r Tc ^r	Zufferey et al., 1996
110spc4-1121-3603	$\Delta fixK_2::fixNOQP'-lacZ$	Cm ^r Spc ^r Tc ^r	Este trabajo
9043-3603	$\Delta fixK_2::fixNOQP'-lacZ$	Cm ^r Spc ^r Tc ^r	Este trabajo
8855-3603	C183S $fixK_2::fixNOQP'-lacZ$	Cm ^r Spc ^r Tc ^r	Este trabajo
1255-3603	C183D- $fixK_2::fixNOQP'-lacZ$	Cm ^r Spc ^r Tc ^r	Este trabajo
1295-3603	C183S-W135A $fixK_2::fixNOQP'-lacZ$	Cm ^r Spc ^r Tc ^r	Este trabajo
1296-3603	C183S-L142A $fixK_2::fixNOQP'-lacZ$	Cm ^r Spc ^r Tc ^r	Este trabajo
1298-3603	C183S-E141A $fixK_2::fixNOQP'-lacZ$	Cm ^r Spc ^r Tc ^r	Este trabajo

Cepa	Descripción	Resistencia	Referencia
110spc4-1121-3604-pMB1282	$\Delta fixK_2::fixNOQP'-'lacZ$ con pMB1282	Cm ^r Spc ^r Sm ^r Tc ^r Km ^r	Este trabajo
110spc4-1121-3604-pMB1283	$\Delta fixK_2::fixNOQP'-'lacZ$ con pMB1283	Cm ^r Spc ^r Sm ^r Tc ^r Km ^r	Este trabajo
110spc4-1121-3604-pMB1285	$\Delta fixK_2::fixNOQP'-'lacZ$ con pMB1285	Cm ^r Spc ^r Sm ^r Tc ^r Km ^r	Este trabajo
110spc4-1121-3604-pMB1286	$\Delta fixK_2::fixNOQP'-'lacZ$ con pMB1286	Cm ^r Spc ^r Sm ^r Tc ^r Km ^r	Este trabajo
110spc4-1121-3604-pMB1287	$\Delta fixK_2::fixNOQP'-'lacZ$ con pMB1287	Cm ^r Spc ^r Sm ^r Tc ^r Km ^r	Este trabajo
110spc4-1121-3604-pMB1288	$\Delta fixK_2::fixNOQP'-'lacZ$ con pMB1288	Cm ^r Spc ^r Sm ^r Tc ^r Km ^r	Este trabajo
110spc4-1121-3604-pRJ5857	$\Delta fixK_2::fixNOQP'-'lacZ$ con pRJ5857	Cm ^r Spc ^r Sm ^r Tc ^r Km ^r	Este trabajo
110spc4-1121-3604-pBBR1MCS-2	$\Delta fixK_2::fixNOQP'-'lacZ$ con pBBR1MCS-2	Cm ^r Spc ^r Sm ^r Tc ^r Km ^r	Este trabajo
1109	<i>fixK₂-lacZ</i> integrada en el cromosoma de 110spc4	Cm ^r Spc ^r Tc ^r	Fernández et al., 2016
9043-1109	$\Delta fixK_2::fixK_2'-'lacZ$	Cm ^r Spc ^r Tc ^r	Fernández et al., 2016
1255-1109	C183D- $\Delta fixK_2::fixK_2'-'lacZ$	Cm ^r Spc ^r Tc ^r	Este trabajo

4.1.2. Plásmidos

En la tabla siguiente se describen los plásmidos utilizados en este trabajo (Tabla 4.2)

Tabla 4.2. Plásmidos.

Plásmido	Descripción	Resistencia	Referencia
pTXB1	IMPACT <i>Mxe</i> GyrA Inteína CBD, vector de expresión para purificación de proteínas sin etiqueta mediante la cola de inteína/ CBD bajo el control del promotor T7	Amp ^r	NEB, USA
pBBR1MCS-2	<i>lacZ mob⁺</i> , vector de clonación	Km ^r	Kovach et al., 1995
pK18 <i>mobsacB</i>	<i>lacZ sacB mob⁺</i> , vector suicida movilizable, derivado de pUC18	Km ^r	Schäfer et al., 1994
pGEM-T Easy	<i>lacZ</i> , vector de clonación	Amp ^r	Promega
pRJ0051	[pTXB1] con un fragmento <i>NdeI/Spel</i> de 715 pb que codifica C183S FixK ₂ clonado en fase con la etiqueta de inteína/ CBD para la expresión y purificación de FixK ₂ sin etiqueta	Amp ^r	Bonnet et al., 2011
pRJ0053	[pTXB1] con un fragmento <i>NdeI/Spel</i> de 715 pb que codifica FixK ₂ clonado en fase con la etiqueta de inteína/ CBD para la expresión y purificación de FixK ₂ sin etiqueta	Amp ^r	Bonnet et al., 2011

Plásmido	Descripción	Resistencia	Referencia
pRJ3603	[pSUP202pol2] <i>bl</i> 2761, <i>bl</i> 2762 y <i>fixNOQP'</i> - <i>lacZ</i> en un fragmento <i>Xho</i> I de 8,261 kb	Tc ^r	Zufferey et al., 1996
pRJ8816	(pRJ9519) fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI de 563 pb con la región promotora de <i>fixNOQP</i>	Amp ^r	Mesa et al., 2005
pRJ8848	pUC19 con un fragmento <i>Sal</i> I de 2,28 Kb que codifica C183S FixK ₂	Amp ^r	Bonnet et al., 2013a
pRJ8858	[pUC19 con un fragmento <i>Bam</i> HI de 1800 pb que codifica C183S FixK ₂	Km ^r	Colección de laboratorio
pRJ9041	pUC19 con un fragmento <i>Sal</i> I de 2,28 kb que codifica FixK ₂	Amp ^r	Mesa et al., 2005
pRJ9054	[pSUP202] <i>fixJ</i> , <i>bl</i> 2758 y <i>fixK₂'-lacZ</i> en un fragmento <i>Nsi</i> I/ <i>Dra</i> I de 4,434 kb	Tc ^r	Nellen-Anthamatten et al., 1998
pMB1109	[pRJ9054] <i>fixK₂'-lacZ</i> con una delección de fragmento <i>Sma</i> I de 136 pb dentro de la región codificante de <i>bl</i> 2758	Tc ^r	Fernández et al., 2016
pMB1250	pUC19 con un fragmento <i>Sal</i> I de 2,28 Kb que codifica C183D FixK ₂	Amp ^r	Este trabajo

Plásmido	Descripción	Resistencia	Referencia
pMB1251	pBBR1MCS-2 con un fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Xba</i> I de 1,84 Kb procedente de pMB1250	Km ^r	Este trabajo
pMB1253	pTXB1 con un producto de PCR de 715 pb con extremos <i>Nde</i> I/ <i>Spe</i> I que codifica C183D FixK ₂ -inteína-CBD (pMB1251 como molde y <i>fixK2_mut19/fixK2mut_58</i> como oligonucleótidos)	Amp ^r	Este trabajo
pMB1254	Religación de un fragmento <i>Bgl</i> II de 4,97 kb procedente del plásmido pMB1256	Amp ^r	Este trabajo
pMB1255	pK18 <i>mobsacB</i> con un fragmento <i>Bam</i> HI de 1,84 kb procedente de pMB1254	Km ^r	Este trabajo
pMB1256	pRJ9041 (pUC19) con un fragmento <i>Not</i> I de 3,96 kb procedente de pMB1251	Amp ^r Km ^r	Este trabajo
pMB1265	pUC19 con un fragmento <i>Sa</i> I de 2,28 Kb que codifica C183S-W135A FixK ₂	Amp ^r	Este trabajo
pMB1266	pUC19 con un fragmento <i>Sa</i> I de 2,28 Kb que codifica C183S-T138A FixK ₂	Amp ^r	Este trabajo
pMB1268	pUC19 con un fragmento <i>Sa</i> I de 2,28 Kb que codifica C183S-M149A FixK ₂	Amp ^r	Este trabajo

Plásmido	Descripción	Resistencia	Referencia
pMB1270	pUC19 con un fragmento <i>SaII</i> de 2,28 Kb que codifica C183S-E146A FixK ₂	Amp ^r	Este trabajo
pMB1271	pUC19 con un fragmento <i>SaII</i> de 2,28 Kb que codifica C183S-L142A FixK ₂	Amp ^r	Este trabajo
pMB1272	pUC19 con un fragmento <i>SaII</i> de 2,28 Kb que codifica C183S-E141A FixK ₂	Amp ^r	Este trabajo
pMB1274	pTXB1 con un producto de PCR de 715 pb con extremos <i>NdeI/Spel</i> que codifica C183S-W135A FixK ₂ (pMB1282 como molde y <i>fixK2_mut19/fixK2mut_58</i> como oligonucleótidos)	Amp ^r	Este trabajo
pMB1275	pTXB1 con un producto de PCR de 715 pb con extremos <i>NdeI/Spel</i> que codifica C183S-T138A FixK ₂ (pMB1283 como molde y <i>fixK2_mut19/fixK2mut_58</i> como oligonucleótidos)	Amp ^r	Este trabajo
pMB1277	pTXB1 con un producto de PCR de 715 pb con extremos <i>NdeI/Spel</i> que codifica C183S-L142A FixK ₂ (pMB1285 como molde y <i>fixK2_mut19/fixK2mut_58</i> como oligonucleótidos)	Amp ^r	Este trabajo
pMB1278	pTXB1 con un producto de PCR de 715 pb con extremos <i>NdeI/Spel</i> que codifica C183S-M149A FixK ₂ (pMB1286 como molde y <i>fixK2_mut19/fixK2mut_58</i> como oligonucleótidos)	Amp ^r	Este trabajo

Plásmido	Descripción	Resistencia	Referencia
pMB1280	pTXB1 con un producto de PCR de 715 pb con extremos <i>NdeI/Spel</i> que codifica C183S-E141A FixK ₂ (pMB1287 como molde y <i>fixK2_mut19/ fixK2mut_58</i> como oligonucleótidos)	Amp ^r	Este trabajo
pMB1281	pTXB1 con un producto de PCR de 715 pb con extremos <i>NdeI/Spel</i> que codifica C183S-E146A FixK ₂ (pMB1288 como molde y <i>fixK2_mut19/ fixK2mut_58</i> como oligonucleótidos)	Amp ^r	Este trabajo
pMB1282	[pBBR1MCS-2] con un fragmento <i>EcoRI</i> de 1314 pb procedente de pMB1265 en pRJ8858	Km ^r	Este trabajo
pMB1283	[pBBR1MCS-2] con un fragmento <i>EcoRI</i> de 1314 pb procedente de pMB1266 en pRJ8858	Km ^r	Este trabajo
pMB1285	[pBBR1MCS-2] con un fragmento <i>EcoRI</i> de 1314 pb procedente de pMB1271 en pRJ8858	Km ^r	Este trabajo
pMB1286	[pBBR1MCS-2] con un fragmento <i>EcoRI</i> de 1314 pb procedente de pMB1268 en pRJ8858	Km ^r	Este trabajo
pMB1287	[pBBR1MCS-2] con un fragmento <i>EcoRI</i> de 1314 pb procedente de pMB1272 en pRJ8858	Km ^r	Este trabajo
pMB1288	[pBBR1MCS-2] con un fragmento <i>EcoRI</i> de 1314 pb procedente de pMB1270 en pRJ8858	Km ^r	Este trabajo
pMB1291	pUC19 con un fragmento <i>SaI</i> de 2,28 Kb que codifica H100A FixK ₂	Amp ^r	Este trabajo

Plásmido	Descripción	Resistencia	Referencia
pMB1293	pK18 <i>mobsacB</i> con un fragmento <i>Bam</i> HI de 1,84 kb procedente de pMB1291	Km ^r	Este trabajo
pMB1295	pK18 <i>mobsacB</i> con un fragmento <i>Bam</i> HI de 1,84 kb procedente de pMB1282	Km ^r	Este trabajo
pMB1296	pK18 <i>mobsacB</i> con un fragmento <i>Bam</i> HI de 1,84 kb procedente de pMB1285	Km ^r	Este trabajo
pMB1297	pK18 <i>mobsacB</i> con un fragmento <i>Bam</i> HI de 1,84 kb procedente de pMB1286	Km ^r	Este trabajo
pMB1298	pK18 <i>mobsacB</i> con un fragmento <i>Bam</i> HI de 1,84 kb procedente de pMB1287	Km ^r	Este trabajo
pMB1299	pK18 <i>mobsacB</i> con un fragmento <i>Bam</i> HI de 1,84 kb procedente de pMB1288	Km ^r	Este trabajo

4.1.3. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo de investigación se describen en la tabla siguiente (Tabla 4.3)

Tabla 4.3. Oligonucleótidos.

Nombre	Gen	Secuencia ADN (5' → 3') ^(a, b, c)	Descripción	Referencia
Mutagénesis puntual dirigida				
fixK2_m ut59	<i>fixK₂</i>	GATGGCGCTGCC	Intercambio de cisteína por serina en la posición 183 de FixK ₂	Este trabajo
		GATGGACCGCCG CGATATCGGCG		
fixK2_m ut60	<i>fixK₂</i>	CGCCGATATCGC	de FixK ₂	Este trabajo
		GGCGGTCCATCG GCAGCGCCATC		

Nombre	Gen	Secuencia ADN (5' → 3') ^(a, b, c)	Descripción	Referencia
His100- Ala100- for	<i>fixK₂</i>	CCTCGAATCCGG CCCCAGC GCCCG TCTTGCCGCCGA AGCC	Intercambio de histidina por alanina en la	Este trabajo
His100- Ala100- rev	<i>fixK₂</i>	GGCTTCGGCGGC AAGACGG GCGCT GGGGCCGGATTC GAGG	posición 100 de FixK ₂	Este trabajo
fixK2_m ut135W _for	<i>fixK₂</i>	CGTGCAGGTTGC CCGCAAGCTC GC GGCGATGACCGC CGGCGAACTTCG	Intercambio de triptófano por alanina en la	Este trabajo
fixK2_m ut135W _rev	<i>fixK₂</i>	CGAAGTTCGCCG GCGGTCATCG CC GCGAGCTTGCGG GCAACCTGCACG	posición 135 de FixK ₂	Este trabajo
fixK2_m ut138T_ for	<i>fixK₂</i>	CGCAAGCTCTGG GCGATG GCCGCC GGCGAACTTCGC C	Intercambio de treonina por alanina en la	Este trabajo
fixK2_m ut138T_ rev	<i>fixK₂</i>	GGCGAAGTTCGC CGGC GGCCATCG CCCAGAGCTTGC G	posición 138 de FixK ₂	Este trabajo
fixK2_m ut141E_ for2	<i>fixK₂</i>	CGCAAGCTCTGG GCGATGACCGCC GGC GCGCTTCGC CACGCCGAGGAT CACATGCTGC	Intercambio de glutámico por alanina en la posición 141 de FixK ₂	Este trabajo

Nombre	Gen	Secuencia ADN (5' → 3') ^(a, b, c)	Descripción	Referencia
fixK2_m ut141E_ rev2	<i>fixK₂</i>	GCAGCATGTGAT CCTCGGCGTGCC GAAG CGCG CCG GCGGTCATCGCC CAGAGCTTGCG		Este trabajo
fixK2_m ut142L_ for2	<i>fixK₂</i>	GCTCTGGGCGAT GACCGCCGGCGA A GC CGCCACGC CGAGGATCACAT GCTGC	Intercambio de leucina por alanina en la	Este trabajo
fixK2_m ut142L_ rev2	<i>fixK₂</i>	GCAGCATGTGAT CCTCGGCGTGCC G CGCT TCGCCGG CGGTCATCGCCC AGAGC	posición 142 de FixK ₂	Este trabajo
fixK2_m ut146E_ for	<i>fixK₂</i>	CCGGCGAACTTC GCCACGCC CGG GATCACATGCTG CTGCTCGG	Intercambio de glutámico por alanina en la	Este trabajo
fixK2_m ut146E_ rev	<i>fixK₂</i>	CCGAGCAGCAGC ATGTGATC CGCG GCGTGGCGAAGT TCGCCGG	posición 146 de FixK ₂	Este trabajo
fixK2_m ut149M _for	<i>fixK₂</i>	CGAACTTCGCCA CGCCGAGGATCA C GC GCTGCTGCT CGGCCGCAAGAC CGCG	Intercambio de metionina por alanina en la posición 149 de FixK ₂	Este trabajo

Nombre	Gen	Secuencia ADN (5' → 3') ^(a, b, c)	Descripción	Referencia
fixK2_m		CGCGGTCTTGCG		
ut149M	<i>fixK₂</i>	GCCGAGCAGCAG		
_ rev		CGCGTGATCCTC GGCGTGGCGAAG TTCG		Este trabajo
Construcción del plásmidos de expresión				
fixK2_m	<i>fixK₂</i>	GCGCATATGCTG	Amplificación de un fragmento de 727 pb de plásmidos procedentes de mutagénesis puntual dirigida que codifican FixK ₂ inteína-CBD para clonación en pTXB1	Bonnet et al., 2013a
ut19		ACCCAGACAC		
fixK2_m	<i>fixK₂</i>	GACTAG[<u>TGCATC</u> TCCCGTGATGCA]; nteinGGCGTCCGAGA TTGTGCAGGC	Amplificación de un fragmento de 727 pb de plásmidos procedentes de mutagénesis puntual dirigida que codifican FixK ₂ inteína-CBD para clonación en pTXB1	Cabrera et al., 2021
ut58				

Nombre	Gen	Secuencia ADN (5' → 3') ^(a, b, c)	Descripción	Referencia
Molde IVT				
fixN4_for	<i>fixN</i>	CGG- GATCCCGACTCC- TATCCGGTCGAG- GAC	Comprobación de ADN en las muestras de ARN	Mesa et al., 2005
fixN4_rev	<i>fixN</i>	CGGAA- TTCCGGGTCATG- GATTTGGA- GATGG	en ensayos IVT	Mesa et al., 2005
Resonancia de plasmón de superficie				
fixN_3_for	<i>fixN</i>	CCACCTATCTTGA TTTCAATCAATTC CCCG	Oligos RPS para la generación de regiones promotoras de	Bonnet et al., 2011
fixN_3_rev-biot	<i>fixN</i>	[B _{tn}]CGGGGAATT GATTGAAATCAA GATAGGTGG	doble cadena de ADN <i>fixNOQP</i> biotiniladas	Cabrera et al., 2021
EMSA				
fixN_29_for	<i>fixN</i>	CGCGAAAGCCTC ACATTAACAG	Oligos EMSA para la generación de regiones promotoras de	Este trabajo
fixN_29_rev	<i>fixN</i>	AAGAACACAGCG CCAGAAAC	doble cadena de ADN <i>fixNOQP</i>	Este trabajo
Verificación de pásmidos y cepas				
fixK2_3	<i>fixK₂</i>	GGGCATGACCTA CGGGGTTC	Verificaciones mediante PCR de <i>fixK₂</i>	Colección de laboratorio

Nombre	Gen	Secuencia ADN (5' → 3')^(a, b, c)	Descripción	Referencia
fixK2_4	<i>fixK₂</i>	GACGTGTTCCGGC CTCGAATC	Secuenciación de <i>fixK₂</i>	Colección de laboratorio
fixK2_5	<i>fixK₂</i>	GAGGCTCGAGCG TTTCAC	Secuenciación de <i>fixK₂</i>	Colección de laboratorio
fixK2_7	<i>fixK₂</i>	CCTTTTGATCCTC CTCGTGATG	Verificaciones mediante PCR y secuenciación de <i>fixK₂</i>	Colección de laboratorio
fixK2_8	<i>fixK₂</i>	CTTTGTGGTCGA TGATGACG	Verificación de recombinación simple y doble en cepas mutantes sin marcador	Colección de laboratorio
fixK2_9	<i>fixK₂</i>	GTCTTCCTGGTC ACGTTCT	Verificación de recombinación simple y doble en cepas mutantes sin marcador	Colección de laboratorio
fixK2_1 2	<i>fixK₂</i>	AGGGTGAGGCCG AGATAGTC	Secuenciación de <i>fixK₂</i> y verificaciones mediante PCR	Colección de laboratorio
fixK2_1 4	<i>fixK₂</i>	TGCGCAGCTACA AGCTTCTC	Secuenciación de <i>fixK₂</i>	Colección de laboratorio

Nombre	Gen	Secuencia ADN (5' → 3')^(a, b, c)	Descripción	Referencia
fixK2_1 6	<i>fixK₂</i>	TGCAGCATGATC GAGGTCAG	Verificaciones mediante PCR de <i>fixK₂</i>	Colección de laboratorio
fixN6_fo r	<i>fixN</i>	GGTGTCACTCCC ATTCTCGT	Verificación clonajes pRJ3603	de con Colección de laboratorio
RV lacZ- Fus	<i>lacZ</i>	CCTCTTCGCTATT ACGCCAG	Verificación clonajes pRJ3603	de con Colección de laboratorio
M13for	<i>fixK₂</i>	GTAAAACGACGG CCAGT	Verificación de recombinación simple en cepas mutantes sin marcador y secuenciación tras clonaje en pK18 <i>mobsacB</i>	Sigma
M13rev	<i>fixK₂</i>	AACAGCTATGAC CATGATTACG	Verificación de recombinación simple en cepas mutantes sin marcador y secuenciación tras clonaje en pK18 <i>mobsacB</i>	Sigma

Nombre	Gen	Secuencia ADN (5' → 3')(a, b, c)	Descripción	Referencia
Mf5	<i>fixK₂</i>	CGGAATTCCTGG ATCATGGCGTAC CTCT	Verificación de recombinación simple en cepas mutantes sin marcador	Colección de laboratorio
Mf8	<i>fixK₂</i>	CCCAAGCTTGTC TGCATGACGTCG TTGAC	Verificación de recombinación simple en cepas mutantes sin marcador	Colección de laboratorio
PK18_4	<i>fixK₂</i>	CTGCGCAACTGT TGGGAAGG	Verificación de clonaje pK18 <i>mobsacB</i>	Colección de laboratorio
T3	<i>fixK₂</i>	AATTAACCCTCAC TAAAGGG	Verificación de recombinación simple en cepas mutantes sin marcador	Thermo Fisher Scientific
T7	<i>fixK₂</i>	TAATACGACTCAC TATAGGG	Verificación de clonaje pBBR1MCS-2 mediante secuenciación	Thermo Fisher Scientific
Kan1	<i>kanR</i>	ATCAGATCTTGAT CCCCTGC	Verificación de clonajes resistencia kanamicina	Colección de laboratorio

Nombre	Gen	Secuencia ADN (5' → 3')^(a, b, c)	Descripción	Referencia
pTXB1_ 1	<i>fixK₂</i>	GGGAATT- GTGAGCGGA- TAAC	Verificación de clonaje en pTXB1 mediante secuenciación	Colección de laboratorio
pTXB1_ 2	<i>fixK₂</i>	ATTGC- CATGCCGGT- CAAG	Verificación de clonaje en pBBR1MCS-2 y pTXB1 mediante secuenciación	Colección de laboratorio

^a Las dianas de restricción artificiales se muestran subrayadas.

^b Las mutaciones se muestran en negrita.

^c Las secuencias o etiquetas adicionales se indican entre paréntesis.
Btn, biotina.

4.1.4. Medios de cultivo

Los medios de cultivo para *B. diazoefficiens* y *E. coli* necesarios en este trabajo se describen en la siguiente tabla (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Composición y referencia de los medios de cultivos empleados en este trabajo.

Medio de cultivo	Composición para 1 l de medio	Referencia
<i>E. coli</i>		
LB (Luria-Bertani)	Triptona 10 g; NaCl 5 g; Extracto de levadura 5 g	Miller, 1972
<i>B. diazoefficiens</i>		
PSY (<i>Peptone-salts-yeast extract</i>)	KH ₂ PO ₄ 0,3 g; Na ₂ HPO ₄ 0,3 g; CaCl ₂ ·H ₂ O 0,005 g; MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,1 g; extracto de levadura 1 g; *solución (100x) de elementos traza 10 ml; **L-arabinosa 0,1%; peptona 3 g. pH 7	Regensburger y Hennecke, 1983, modificado en Mesa et al., 2008
YEM*** (<i>Yeast extract mannitol</i>)	NaCl 0,1 g; Manitol 5 g; K ₂ HPO ₄ 0,5 g; extracto de levadura 1 g; MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,2 g, pH 7	Daniel y Appleby, 1972

Los medios de cultivo sólidos se obtienen añadiendo 15 g de agar bacteriológico por cada litro de medio, una vez medido el pH del medio.

Los medios se esterilizan en autoclave a 121°C durante 20 min. La arabinosa y los antibióticos se añaden al medio PSY tras la esterilización con autoclave en todos los casos.

*La solución de elementos traza (100X) se prepara con la siguiente composición: H₃BO₃ 1g; ZnSO₄·7H₂O 0,1 g; CuSO₄·5H₂O 0,05 g; MnCl₂·4H₂O 0,01 g; Na₂MoO₄·2H₂O 0,01 g; FeCl₃ 0,019 g; H₂O 1 litro.

**L-arabinosa: Se esteriliza mediante filtración con un filtro Minisart® NML (Sartorius) de 0,2 µm de tamaño de poro en alícuotas al 10%. Posteriormente se almacena a 4°C.

***En algunos casos, como en curvas de crecimiento en condiciones anóxicas, el medio YEM puede ser suplementado con nitrato 10 mM.

4.1.5. Antibióticos

Los medios de cultivo son suplementados con soluciones de antibióticos concentradas en H₂O_d y esterilizadas mediante filtración con un filtro Minisart® NML (Sartorius) de 0,2 µm de tamaño de poro. Para la preparación de cloranfenicol y tetraciclina se emplea alcohol como disolvente por lo que no se requiere filtración. Las concentraciones finales de los antibióticos se indica en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5. Antibióticos.

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

*La solución concentrada de Cm requiere etanol.

**La solución concentrada de Tc requiere metanol absoluto o metanol:agua (1:1) en función de la concentración (10 o 1 mg/ml, respectivamente).

4.1.6. Soluciones químicas y bioquímicas

Los tampones y soluciones utilizados en este trabajo, así como su uso y composición se describen en la tabla siguiente (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Composición y uso de las soluciones usadas en este trabajo.

Solución	Composición	Utilidad
Actividad β-galactosidasa		
Tampón Z	KCl 10 mM; Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 60 mM; NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 40 mM; MgSO ₄ 1 mM. pH 7. Añadir β -mercaptoetanol 50 mM antes de usar.	Reacción β -galactosidasa
Solución de ONPG	<i>orto</i> -nitrofenil- β -D-galactopiranosido, 4 mg/ml (en tampón fosfato)	
Tampón fosfato	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 0,1 mM; NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 0,1 mM	
Solución stock carbonato sódico	CO ₃ Na ₂ 1 M	Bloqueo de reacción
Leg-hemoglobina		

Solución	Composición	Utilidad
Medio de extracción	Tampón Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ 50 mM, pH 7,4; [K ₃ Fe(CN) ₆] 0,02 %; NaHCO ₃ 0,1 % (añadir 100 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP) /6 ml de medio de extracción antes de uso)	Extracción Leg-hemoglobina
Tampón Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄	81% Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 50 mM; 19% NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 50 mM; pH 7,4	Preparación de medio de extracción
Solución saturada de ácido oxálico	H ₂ C ₂ O ₄ (6,6 g/100 ml)	Reacción fluorimétrica
Preparación células competentes de <i>E. coli</i>		
Tampón TFB1	RbCl 100 mM; CH ₃ CO ₂ K 30 mM; MnCl ₂ ·4H ₂ O 50 mM; CaCl ₂ ·2H ₂ O 10 mM; glicerol 15%. pH 5,8	Preparación de células competentes con RbCl
Tampón TFB2	CaCl ₂ ·2H ₂ O 75 mM; MOPS 10 mM; RbCl 10 mM; glicerol 15%. pH 6,8. Preservar de la luz	
Minipreps TENS de <i>E. coli</i>		
Solución TENS	SDS 0,5%; NaOH 0,1 M; ARNasa A en TE 1 µl	
TE	EDTA 1 mM; Tris-HCl 10 mM. pH 8	Aislamiento de plásmidos de <i>E. coli</i>
Solución ARNasa A	NaCl 0,1 M; 2 mg/ml de ARNasa A en Tris-HCl 10 mM (pH 7,4); 20% glicerol y hervir 10 min (para eliminar ADNasas)	
Minipreps de <i>B. diazoefficiens</i>		
Solución de lavado	NaCl 1 M; 1% Sarcosil	

Solución	Composición	Utilidad
Solución MAXI	Glucosa 50 mM; tris-HCl 25 mM; EDTA 10 mM. pH 8	Aislamiento de
Solución de lisis	SDS 1%; NaOH 0,2 M	plásmidos de <i>B.</i>
Solución de neutralizado	Acetato sódico 3 M; equilibrado con ácido acético glacial. pH 4,8	<i>diazoefficiens</i>
Sobre-expresión y purificación de proteínas en <i>E. coli</i> (sistema IMPACT)		
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.	Inducciones de <i>E. coli</i> ER2566 para sobreexpresión de proteínas
Column buffer	NaCl 500 mM; Na-HEPES 20 mM (pH 8,5); EDTA 1 mM	Lavado de cultivos, base de otros tampones, lavado y regeneración de columna cromatográfica
Solución stock <i>AD-Nasa</i>	<i>DNAse</i> I (Sigma) 20 g/ml	Fraccionamiento celular (también se usan en inmunodetección)
Solución stock AEBSF	4-[2-Aminoethyl] benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (Sigma) 1 mM	
Tampón de escisión	Column buffer con DTT 50mM	Cromatografía de afinidad
Happy buffer	Tris HCl 40mM; KCl 150mM; EDTA 0,1mM; pH 7	Intercambio de tampón (filtración en gel en columna PD-10) para ensayos <i>in vitro</i>

Solución	Composición	Utilidad
Inmunodetección (Western-Blot)		
Tampón de lavado	Tris HCl 40mM; KCl 150mM; pH 7	Lavado de cultivos celulares
Tampón de fraccionamiento	Tris HCl 40mM; KCl 150mM; pH 7; AEBSF 0,2 mM	Obtención de fracción soluble (citosol) de <i>B. diazoefficiens</i> de cultivos en vida libre
<i>ADNasa I</i>	<i>DNase I</i> (Sigma) 20 g/ml	
TBS	Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM	Transferencia a membranas de nitrocelulosa
TTBS	TBS; 0,1% Tween 20	
Tampón de bloqueo	TTBS; caseína 1%	
Tampón de lisis	Manitol 250 mM; tris-HCl 50 mM. pH 7,4	
Tampón de sedimentos	Tris-HCl 50 mM. pH 7,4	Inmunodetección en bacteroides
Tampón de resuspensión	KCl 150 mM; Tris-HCl 40 mM; AEBSF 0,2 mM. pH 7	
Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS)		
Tampón de desarrollo PAGE-SDS	Tris-Base 3,03 g/l; Glicina 14,41 g/l; SDS 1 g/l	Tampón de electroforesis
Gel de resolución PAGE-SDS 14%	Tris-HCl 1,5M (pH 8,8) 1,25 ml; acrilamida 30% (37,5:1) 2,34 ml; H ₂ O 1,31 ml; SDS 10% 50 µl; APS 10% (preparado fresco) 31,25 µl; TEMED 6,6 M 2,5 µl	Gel de poliacrilamida

Solución	Composición	Utilidad
Gel de empaquetado PAGE-SDS 4%	Tris-HCl 0,5M (pH 6,8) 0,375 ml; SDS 10% 15 µl; H ₂ O _d , 0,91 ml; acrilamida 30% (37,5:1) 0,2 ml; APS 10% (fresco) 30 µl; TEMED 6,6 M 1,25 µl	
Solución APS	Persulfato amónico (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ 10% en H ₂ O _d	Geles de empaquetado y resolución
Tampón de carga 2X	Tris-HCl 125 mM (pH 6,8); glicerol 20%; DTT 100 mM; SDS 4%; azul de bromofenol 0,01%	Proteína purificada (IMPACT) 10 µl/10 µl de proteína
Tampón de carga 1X	Tris-HCl 62,5 mM (pH 6,8); glicerol 10%; DTT 50 mM; SDS 2%; azul de bromofenol 0,01%	Lisados celulares 100 µl/ml DO=1
Tampón de carga 6X (Western-Blot)	DTT 620 mM; Tris-HCl 350 mM (pH 6.8), glicerol 30%; SDS 10%; azul de bromofenol 0,01%	Inmunodetección vida libre 1 µl/5 µl de muestra citosólica
Tampón de carga 1X (Western-Blot)	Tris-HCl 58,3 mM (pH 6.8), glicerol 5%; DTT 103,3 mM; SDS 1,7%; azul de bromofenol 0,01%	Inmunodetección simbiosis 20 µl/ ml DO=1 de muestra lisada
Tinción de geles de poliacrilamida con Coomassie		
Solución de Coomassie	Ácido acético 100 ml; azul Comasie R250 1 g; metanol 400 ml; H ₂ O _d hasta 500 ml	Detección de proteínas en gel con Coomassie

Solución	Composición	Utilidad
Solución de desteñido	Ácido acético 100 ml; metanol 250 ml; H ₂ O hasta 650 ml	
Electroforesis de ADN, ADNc y ARN en geles de agarosa		
TBE 0,5X	EDTA 1 Mm; Tris-HCl 45 mM; borato 45 mM. pH 8	Para ADN
TBE 1X	EDTA 2 Mm; Tris-HCl 90 mM; borato 90 mM. pH 8	Para ADNc fragmentado
TAE 1X	EDTA 1 Mm; Tris-acetato 40 mM. pH 8 en H ₂ O-DEPC	Para ARN (lavado del tanque de electroforesis y el peine)
Solución stock SDS 0,5%	Dodecilsulfato sódico (5 mg/ml)	
Tampón de carga de ADN 6X	Sacarosa 40%; azul de bromofenol 0,025%	Para ADN, ADNc y ARN
Microarrays		
Solución <i>Stop</i>	10% fenol equilibrado en etanol (pH 8)	Extracción de
Tampón A	NaOAc 20 mM (pH 5,5); EDTA 1 mM (pH 8) en H ₂ O-DEPC*	ARN
IVT		
Tampón de IVT 5X	EDTA 0,1 mM; DTT 0,1 mM; Tris-HCl 40 mM (pH 8); MgCl ₂ 10 mM; KCl 150 mM; K ₃ PO ₄ 0,4 mM	Reacción de
Solución Sanger	EDTA 40 mM (pH 8); 98% formamida; azul de bromofenol 0,05%; xylene cyanol 0,05%	transcripción
Solución stock TBE 10X	20 mM EDTA; 900 mM Tris-HCl; 900 mM borato. pH 8	Electroforesis en gel de secuenciación

Solución	Composición	Utilidad
Solución stock APS	Persulfato amónico (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ 10%	Gel de secuenciación
Solución stock H ₂ O _d -DEPC	H ₂ O _d , DEPC 0,1% (en agitación 24 h y autoclavar posteriormente)	Extracción de ARN y base de otras soluciones
RPS		
Tampón de desarrollo Biacore	EDTA 0,1 mM; Tris-HCl 40 mM (pH 7); KCl 150 mM; Tween 20 0,005%	Tampón de ejecución de los ensayos de interacción proteína-ADN (Biacore X100)
Tampón de Inmovilización	NaCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM (pH 7,5); EDTA 1 mM	Inmovilización de oligos en chip (Biacore X100)
Tampón de activación	NaOH 50 mM; NaCl 1M	
Tampón de limpieza	NaOH 50 mM; NaCl 1 M; Isopropanol 50%	
EMSA		
Tampón modificado IVT	EDTA 0,1 mM; KCl 150 mM; Tris-HCl 40 mM pH 8, MgCl ₂ 10 mM; DTT 0,1 mM; K ₃ PO ₄ 0,4 mM	Reacción EMSA
Tampón de carga EMSA	Tampón IVT modificado con glicerol 30% y azul de bromofenol 1%	Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6 % no desnaturante 0,5X Tris-borato EDTA (TBE)
Cultivos de soja		

Solución	Composición	Utilidad
Medio Jensen	CaHPO ₄ (0,42 g/l); CaSO ₄ ·2H ₂ O (0,54 g/l); K ₂ HPO ₄ (0,08 g/l); MgSO ₄ ·7H ₂ O (0,08 g/l); NaCl (0,08 g/l); FeCl ₃ ·6H ₂ O (0,07 g/l); MnCl ₂ ·6H ₂ O (0,21 mg/l); Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O (0,04 mg/l); H ₃ BO ₃ (4,23 mg/l); CuSO ₄ ·5H ₂ O (0,21 mg/l); ZnSO ₄ ·7H ₂ O (0,42 mg/l). Ajustar a pH 7 con NaOH	Riego de plantas de soja inoculadas con <i>B. diazoefficiens</i>

*Añadir 0,1% de DEPC, en agitación durante una noche y autoclavando al día siguiente, en los tratamientos con DEPC (dietil pirocarbonato) de soluciones acuosas (no detergentes) para la extracción de ARN.

4.2. Métodos microbiológicos

4.2.1. Conservación de cepas bacterianas

El método de conservación de las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo consistió en el uso de criotubos con glicerol estéril al 50% en volumen junto a suspensiones bacterianas de cultivos en fase logarítmica. Las suspensiones se obtuvieron inoculando 25 ml de PSY, para *B. diazoefficiens* o 7 ml de LB, para *E. coli*, suplementados con antibióticos a partir de una sola colonia aislada en placa. Los cultivos de *E. coli* se incubaron a 37°C durante 24 horas, y los de *B. diazoefficiens* a 30°C durante 4-5 días. Posteriormente los cultivos fueron centrifugados y lavados con el mismo medio, sin antibiótico. Los sedimentos se resuspenden en 2,1 ml de medio y se alicuotan en fracciones de 700 µl. Una de las alícuotas se conserva a -20°C para uso individual, y otras dos a -80°C para la colección del grupo.

4.2.2. Cultivos de cepas de *B. diazoefficiens*

4.2.2.1. Precultivos de rutina sólido y líquido

Los cultivos de *B. diazoefficiens* en medio sólido se inician, habitualmente, partiendo de criotubos de cepas conservadas. Se estrían con asa bacteriológica en placas con medio PSY sólido suplementado con antibióticos. Se incuban a 30°C 4-5 días. Para la obtención de precultivos líquidos se parte de colonias aisladas de cultivo sólido e inoculadas en matraces de 250 ml con 50 ml de medio PSY líquido suplementado con antibióticos. Las células se incuban a 30°C en un agitador orbital a 170 rpm, durante 4-5 días, hasta alcanzar la fase exponencial tardía de crecimiento ($DO_{600nm} \approx 1$).

Posteriormente los precultivos se centrifugan y lavan con el mismo medio de destino, resuspendiendo los sedimentos en 1/20 del volumen inicial, y determinando la DO_{600nm} de las suspensiones celulares concentradas obtenidas.

4.2.2.2. Cultivos óxicos

Los cultivos óxicos se preparan a partir de precultivos líquidos, inoculando matraces de 250 ml con 50 ml de medio PSY cerrados con tapón de celulosa a una DO_{600nm} inicial de 0,02. Posteriormente se incuban a 30°C en agitación (170 rpm). Para controlar el crecimiento se mide la DO_{600nm} de alícuotas de 1 ml extraídas en condiciones estériles, utilizando medio líquido sin inocular como blanco.

4.2.2.3. Cultivos microóxicos

Estos cultivos se realizan en matraces de 500 ml tapados con tapón de goma perforable y manteniendo una proporción 1:5 entre las fases líquida y acuosa. Como fase gaseosa se utiliza una mezcla

de gases con 0,5% de O₂ y 99,5% de N₂. Los matraces deben ser gaseados durante 10 min empleando filtros Minisart® NML (Sartorius) de 0,2 µm de tamaño de poro, para mantener la esterilidad. El reciclado de la fase gaseosa se realiza cada 8-16 h. Estos cultivos se inician a una DO_{600nm} de 0,02 y se incuban a 30°C y 170 rpm durante 7-10 días para curvas de crecimiento, 32-37 h para inmunodetección de proteínas y 48 h para actividad enzimática.

4.2.2.4. Determinación del crecimiento en condiciones de anoxia en presencia de nitrato

En este trabajo, el término anoxia es empleado como indicativo de la eliminación de la mayor parte de O₂ presente en el cultivo. Puesto que las cepas de *B. diazoefficiens* utilizadas en este trabajo son capaces de crecer en anoxia utilizando como aceptor final de electrones el NO⁻³, fueron empleados tubos de 17 ml enrasados con medio YEM y cerrados herméticamente. Así, el cultivo consume el oxígeno y en pocas horas de incubación queda en. Se realizan dos tipos de cultivo en paralelo para curvas de crecimiento, uno suplementado con NO⁻³ 10 mM como aceptor final de electrones, y otro sin NO⁻³ como control negativo de crecimiento. Los tubos se inoculan a una DO_{600nm} inicial de 0,02. Tras ser inoculados, se incuban a 30°C a 170 rpm durante 7-10 días, midiendo la DO_{600nm} cada 24 h.

4.2.2.5. Cultivos para extracción de ARN

Para la extracción de ARN se utilizan cultivos iniciados a partir de cultivos líquidos de rutina. Se inoculan 8 matraces (por cepa) de 500 ml, con 25 ml de medio PSY suplementado con los antibióticos pertinentes, cerrados con tapón de goma perforable y gaseados con 0,5% de O₂ en 99,5% de N₂ durante 10 min, con un reciclado de la fase gaseosa cada 8-16 h. La inoculación se inicia a una DO_{600nm}

inicial de 0,02, incubando a 30°C en agitación (170 rpm) hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,4-0,5.

4.2.2.6. Cultivos para inoculación de plantas de soja

Los cultivos de las diferentes cepas de *B. diazoefficiens* para la preparación de preinóculos de plantas de soja se iniciaron a partir de colonias aisladas de cultivo sólido claramente no contaminado, sembradas en matraces de 250 ml con 50 ml de medio PSY líquido suplementado con los antibióticos adecuados y cerrados con tapón de celulosa. Las células se incuban a 30°C en agitación a 170 rpm durante 4-5 días, hasta alcanzar la fase exponencial tardía de crecimiento ($DO_{600nm} \approx 1$). A continuación, los cultivos son centrifugados y lavados con una solución estéril al 0,9% de NaCl para, a continuación, ser resuspendidos en la misma solución salina a una DO_{600nm} de 0,5 que será utilizada como inóculo de semillas de soja.

4.2.2.7. Determinación del número de unidades formadoras de colonia (UFC/ml) para el aislamiento de bacteroides

Con el fin de asegurar la ausencia de contaminación en ensayos de inoculación de plantas de soja, fueron aislados los bacteroides presentes en los nódulos de las raíces para una posterior cuantificación de UFC/ml y verificación mediante secuenciación. Para ello los nódulos fueron esterilizados superficialmente sumergiéndolos durante 1 minuto en etanol absoluto, y posteriormente sometidos a 5 tandas de 1 minuto de lavado con agua destilada estéril. A continuación, se rompieron y resuspendieron en 100 μ l de PSY líquido con ayuda de una espátula de Drigalsky invertida. El extracto se resuspendió en un volumen final de 1 ml de PSY con el cual se realizaron 7 tandas de diluciones 1:10. Se sembraron en masa 100 μ l de cada tanda en medio PSY

sólido suplementado con los antibióticos pertinentes incluyendo cycloheximide a una concentración final de 100 µg/ml para evitar el crecimiento de posibles hongos presentes en los nódulos. Se incubaron a 30°C durante 5-10 días y las colonias resultantes fueron cuantificadas y verificadas mediante secuenciación.

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

La obtención de la fracción soluble de cultivos de *B. diazoefficiens* se realiza una lisis celular por diferencia de presión, usando una prensa de French (SLM), o mediante sonicación, con ayuda de un sonicador (S-250A Model Sonifier™), mediante 6 pulsos de 10 s. Los cultivos de *B. diazoefficiens* se centrifugan a 5.500 × *g* durante 7 min a 4°C y los sedimentos son lavados con tampón de fraccionamiento (ver tabla 4.6) y posteriormente resuspendidos en 1 ml del mismo tampón al que se añade ADNasa I (20 µg/ml) y 1 mM de AEBSF (4-[2-Aminoethyl] benzenesulfonyl fluoride hydrochloride) (ver tabla 4.6). La suspensión se añade a la célula de la prensa, previamente enfriada y ensamblada, llevándose a cabo la lisis celular aplicando una presión constante a 120 MPa, repitiendo cada ciclo 3-4 veces hasta obtener un lisado amarillo claro y poco viscoso.

El extracto obtenido es centrifugado a 8.000 × *g* durante 10 min y 4°C con objeto de sedimentar las células no lisadas, y el sobrenadante es centrifugado a 140.000 × *g* durante 45 min y 4°C. El sobrenadante final corresponde a la fracción soluble (citosol) y el sedimento a la fracción particulada (membranas).

4.2.4. Aislamiento de bacteroides

Con la finalidad de verificar en ensayos de inoculación de plantas de soja, que no se habían producido contaminaciones por parte de

otros rizobios o procariotas, se llevó a cabo el aislamiento de bacteroides de nódulos mediante el siguiente protocolo:

1. Esterilizar la superficie de los nódulos sumergiéndolos en un endorf de 2 ml con alcohol absoluto durante 1 min. Seguidamente lavar con abundante H₂O estéril y retirar el contenido acuoso.
2. Añadir 100 µl de medio PSY líquido y romper nódulo con ayuda de una espátula de Drigalsky estéril e invertida.
3. Adicional otros 9 µl de medio PSY líquido y agitar con ayuda de un vórtex.
4. Realizar un total de 7 diluciones seriadas (1:10).
5. Sembrar en masa 100µl de suspensión las soluciones 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ y 10⁻⁷. Y todas las soluciones en gota (de la 0 a la -7) (todas las gotas en la misma placa por duplicado, 10µl). El medio de inoculación será PSY suplementado con los antibióticos habituales para *B. diazoefficiens*, además de cycloheximide (100 µg/ml) con objeto de evitar el crecimiento de hongos que hayan podido quedar adheridos a la superficie de los nódulos.
6. Incubar a 30°C durante 5-10 días.
7. Aislar colonias de la forma habitual y secuenciar (véase apartado 4.4.11).

4.3. Métodos analíticos

4.3.1. Determinación de actividad β-galactosidasa

Para determinar la actividad β-galactosidasa se utiliza una metodología adaptada de Sambrook y Russell, 2001, tal como se detalla a continuación:

1. Se transfieren alícuotas de 0,3 ml de cultivo de *B. diazoefficiens* ($DO_{600nm} = 0,4-0,6$) a eppendorf de 2 ml, midiendo igualmente la DO_{595nm} de 0,3 ml en placa ELISA.
2. Se añade a los eppendorf 450 μ l de tampón Z suplementado con SDS al 10% (ver tabla 4.6) y 10 μ l de cloroformo. Se agita toda la mezcla en vórtex durante 30 s y se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos, la solución debe ponerse blanquecina y turbia.
3. Añadir 150 μ l de ONPG (orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido) (tabla 4.6), e iniciar la medición del tiempo de reacción. Mezclar los tubos e incubar a 30°C hasta alcanzar una coloración amarillenta.
4. Adicionar 350 μ l de CO_3Na_2 a cada tubo para detener la reacción.
5. Los tubos de reacción son centrifugados a 13.000 rpm, 5 min, a 4°C y se transfieren, con precaución, 3 réplicas de 300 μ l de sobrenadante a pocillos de una placa ELISA. Se mide la DO_{420nm} y DO_{595nm} de todas las muestras y se calcula la actividad β -galactosidasa (en unidades Miller; UM) según la siguiente fórmula:

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

UM = Unidades Miller.

DO_{420} y DO_{550} = Valores de DO de la reacción a 420 y 550 nm, respectivamente.

DO_{595} = Valor de DO a 595 nm de la alícuota de cultivo que se toma al inicio.

t = tiempo de incubación en minutos.

v = volumen de cultivo (300 μ l 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).

En función de la concentración de proteína de la reacción, la actividad β -galactosidasa también puede ser expresada según la fórmula siguiente:

$$UM = \frac{1000 \times (DO_{420} - DO_{550})}{0,045 \times t(\text{min}) \times V(\text{ml}) \times [\text{prot.}](\text{mg/ml})}$$

0,0045 = absorbancia de 1 nmol de ONPG.

4.3.2. Determinación de proteína

La determinación de la concentración de proteína de extractos celulares y soluciones de proteína pura, se utiliza el reactivo Bradford 5X (Bio-Rad). El proceso se realiza como se detalla:

1. Tomar alícuotas de muestras y añadir H₂O_d (dilución 1:10) hasta un volumen de 100 μ l.
2. En pocillos de una placa ELISA añadimos 60 μ l de Bradford 5X, 230 μ l H₂O_d y 10 μ l de muestra de proteína diluida. Mezclamos con ayuda de una micropipeta.
3. La mezcla se incuba durante 2-60 min.
4. Frente a un blanco que contiene H₂O_d, se mide la absorbancia a DO_{595nm} de cada muestra.
5. La concentración proteica es calculada por interpolación de los valores de absorbancia obtenidos respecto a una curva patrón

realizada con cantidades conocidas de albúmina sérica bovina (Sigma-Aldrich).

4.3.3. Análisis de parámetros fisiológicos en plantas de soja

4.3.3.1. Determinación de nitrógeno en plantas de soja

El análisis de contenido en nitrógeno presente en brotes de soja se realizó según el protocolo establecido en el “Servicio de Análisis de Nitrógeno y Carbono” de la Estación Experimental del Zaidín, CSIC (<https://www.eez.csic.es/es/servicio-de-analisis-de-nitrogeno-y-carbono>).

El servicio de análisis elemental de Nitrógeno/Carbono, ubicado en el Instituto de Nutrición Animal (INAN-EEZ), permite la determinación cuantitativa del contenido total de Nitrógeno y Carbono en una gran variedad de matrices: suelos, forrajes, tejidos animales y vegetales, excretas y en prácticamente cualquier muestra que se puede presentar de manera homogénea.

La prueba se realiza con un analizador elemental Leco TruSpec CN, que analiza el N presente en la muestra con el método Dumas (Tortosa et al., 2020). Dicho método consiste en la combustión completa de la muestra a 950°C en presencia de Oxígeno, reducción de los óxidos de nitrógeno formados a nitrógeno molecular y detección de éste con un detector de conductividad térmica. El carbono es medido como dióxido de carbono (procedente de la combustión de la muestra) mediante un detector de infrarrojo. La cuantificación se realiza con patrones de referencia certificados de distinta concentración de nitrógeno y carbono.

El resultado final se expresa como porcentaje de N y C en la masa total analizada.

En este trabajo, se utilizaron al menos seis muestras biológicas representativas de material vegetal (brotes de soja), utilizando como mínimo 0,2 gramos de muestra para cada análisis, según los requerimientos de la prueba. Para ello, fue necesario secar el tejido vegetal a 70°C durante al menos 3 días, y a continuación, moler las muestras con ayuda de un molino eléctrico de mesa (Glen Creston Stanmore, Retsch®) hasta que el material vegetal quede homogéneamente micronizado. Por último, y a partir de los porcentajes obtenidos en el análisis y de la masa biológica utilizada, se calcularon los contenidos en miligramos de nitrógeno por muestra, y los resultados se extrapolaron a miligramos de nitrógeno por planta.

4.3.3.2. Determinación de leg-hemoglobina

Mediante fluorimetría, siguiendo la técnica descrita por LaRue y Child, 1979, se determinó el contenido en leghemoglobina de los nódulos. Para ello se procedió como se detalla a continuación:

1. Homogeneizar 0,3 g de nódulos en 6 ml de medio de extracción de leghemoglobina (ver tabla 4.6) suplementado con un 100 mg de polivinilpirrolidona insoluble (PVPP).

2. Centrifugar el extracto resultante a 12.000 x g durante 20 minutos.

3. Tomar alícuotas de 50 µl de sobrenadante y añadir 3,15 ml de una solución saturada de ácido oxálico (6,6 g/100 ml).

4. Calentar las muestras a 120°C durante 30 minutos en una autoclave.

5. Determinar la fluorescencia de las soluciones una vez enfriadas a temperatura ambiente.

Para ello se utilizó un fluorímetro Shimadzu equipado con una lámpara xenón-mercurio y un fotomultiplicador sensible al rojo, RF-540. La longitud de onda de excitación fue de 405 nm y la del

selector monocromático de emisión de 600 nm. Las diferencias existentes entre los valores de la fluorescencia emitidos por las muestras control (no calentadas) y calentadas son proporcionales a la cantidad de hemoproteínas existentes y por tanto indicativo de la cantidad de leghemoglobina en las muestras. Como referencia se construyó una curva patrón a partir de hemoglobina de plasma humano. El contenido de Lb se expresó en mg de leghemoglobina/g peso fresco de nódulos ($\text{mg Lb} \cdot \text{g NFW}^{-1}$).

4.3.3.3. Determinación del peso seco de brotes de soja

Para la cuantificación del peso seco de los brotes de soja, los brotes fueron introducidos en un sobre de papel cerrado, correctamente etiquetado y secados en estufa durante al menos 3 días a una temperatura constante de 70°C tal como se detalla en Tortosa et al., 2020. Pasado ese tiempo, se extrajeron los brotes secos y se pesaron en una balanza de precisión (Sartorius ED224S Extend Analytical Balance) para determinar el peso seco (en gramos) de cada brote.

4.3.3.4. Determinación del número y peso seco de nódulos

La determinación del número de nódulos se realizó mediante conteo *in situ* de los nódulos presentes en la raíz de cada planta tal como se detalla en Tortosa et al., 2020. Los datos obtenidos, fueron requeridos también para la cuantificación del peso seco por nódulo. Para la determinación del peso seco de los nódulos por planta, fue necesario un secado previo de los mismos. Para ello, todos los nódulos de cada planta fueron introducidos en un tubo de microcentrífuga debidamente perforado, y sometidos a una temperatura constante de 70°C durante al menos 3 días en estufa. A continuación, se cuantificó el peso total del contenido de cada tubo de microcentrífuga en una balanza de precisión (Sartorius

ED224S Extend Analytical Balance), para determinar el peso seco por planta (en mg). Posteriormente, se determinó el peso seco por nódulo (en mg) dividiendo el peso total de los nódulos de cada tubo entre el número de nódulos que contenía.

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

La electroforesis de proteína en geles de poliacrilamida se realiza con el sistema Mini-Protean Tetra Handcast (Bio-Rad). Se utilizan geles de 1 mm de espesor con poliacrilamida al 14% para el gel de resolución (tabla 4.6) y del 4% para el gel de empaquetado (tabla 4.6). Los geles se preparan entre los cristales previamente ensamblados, sobre los que se vierten 4,9 ml de la solución del gel de resolución, vertiéndolo inmediatamente después de adicionar el persulfato amónico (APS) y la tetrametilendiamina (TEMED). Para que el gel esté adecuadamente nivelado se añade 1 ml de isopropanol sobre el gel de resolución. Tras 30-40 min de incubación, se elimina el isopropanol, se lava con abundante H₂O, se seca con papel de filtro y se vierte la solución de empaquetado hasta enrasar, justo después de añadir el APS y el TEMED como en la etapa anterior. Finalmente, se coloca el peine para crear los pocillos, con precaución para que no se formen burbujas.

Tras la polimerización de los geles, se ensambla el sistema en la cubeta de electroforesis, quedando un vaso estanco entre los dos geles montados en el cassette. El vaso creado por los cristales y la cubeta se enrasa con tampón de desarrollo (tabla 4.6).

Antes de introducir las muestras en los carriles, se corre previamente el gel durante unos 50-60 min. Posteriormente, se cargan los geles con los extractos celulares, lisados o soluciones proteicas que se deseen analizar adicionando en cada uno de ellos el tampón de carga pertinente (tabla 4.6), dependiendo del análisis

a realizar a continuación: inmunodetección (apartado 4.3.7), detección de lisados celulares con Coomassie y detección de proteínas con Coomassie (apartado 4.3.8). En todos los casos se carga uno de los carriles con 5 μ l de marcador de peso molecular PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) o Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards (BIO-RAD). La electroforesis se lleva a cabo a 20 mA hasta visualizar el frente al final del gel.

4.3.5. Transferencia a membrana de nitrocelulosa

En los ensayos de inmunodetección, las proteínas resultantes de la electroforesis en gel de poliacrilamida son transferidas a membranas de nitrocelulosa de 0,2 μ m de espesor. Para la transferencia se utiliza el sistema Trans-Blot Turbo Blotting (Bio-Rad), usando un pack comercializado por Bio-Rad que contiene las membranas de nitrocelulosa de 0,2 μ m y los papeles de filtro humedecidos. Finalizada la electroforesis en gel de poliacrilamida, el gel es colocado en contacto con la membrana de nitrocelulosa, cubriendo el conjunto por ambas caras con el papel de filtro del pack, situándose la membrana en el interior junto al gel, poniendo especial cuidado en que no queden burbujas entre las capas. Posteriormente, tras haber enfriado el cassette del sistema a -2°C durante 2 h, el conjunto es colocado en su interior 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 este caso se emplea el protocolo High MW (10 min, 25 V, 1,3 A) para la inmunodetección con anticuerpos. Por último, las membranas se lavan con el tampón adecuado para inmunodetección de las proteínas (ver tabla 4.6).

4.3.6. Ensayo de inmunodetección (Western-Blot)

4.3.6.1. Inmunodetección en células crecidas en vida libre

La inmunodetección de FixK₂ de células de *B. diazoefficiens* crecidas en microoxia se realizó siguiendo el protocolo descrito por Mesa et al., 2009, tal como se detalla a continuación. Se recogieron al menos tres réplicas biológicas de 300 ml de cultivos cultivados microóxicamente (0,5 % O₂) en la fase exponencial media (DO_{600nm} de 0,45-0,58), se centrifugaron a 5.000 x g durante 7 min a 4°C, se lavaron con tampón de fraccionamiento (ver tabla 4.6) y se resuspendió en 1,5 ml del mismo tampón que contenía 0,2 mM de 4-[2-aminoetil] bencenosulfonilo clorhidrato de fluoruro (AEBSF). Las suspensiones de células se rompieron mediante tres pases a través de una prensa de French (SLM Aminco) a aproximadamente 120 MPa y, posteriormente, se centrifugaron a 27.000 x g durante 30 min a 4°C, para obtener el extracto crudo. A continuación, se llevó a cabo una electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida y posterior transferencia a membrana de nitrocelulosa (apartados 4.3.5 y 4.3.6 respectivamente), con objeto de llevar a cabo la inmunodetección de FixK₂ en la etapa siguiente, para la cual, se usó un anticuerpo policlonal derivado de conejo contra FixK₂ a una dilución 1:1,000 (Bio-Rad, California, CA, EE. UU.), como anticuerpo primario, y un anticuerpo anti-conejo de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) a una dilución 1:3.500 (Bio-Rad, California, CA, EE. UU.), como anticuerpo secundario.

Una vez transferidas las proteínas a la membrana de nitrocelulosa se realizaron los pasos que se describen a continuación:

1. Se lavan las membranas con 25 ml de tampón TBS (ver tabla 4.6) durante 10 min en un balancín. A continuación, se elimina el TBS y se añade la misma cantidad de tampón de bloqueo (ver tabla 4.6), dejando la membrana incubar durante toda la noche a 4°C en balancín.

2. Se llevan a cabo tres lavados de membrana con TTBS (ver tabla 4.6), 15 min de duración cada uno.

3. Incubación de la membrana con 10 ml de anticuerpo primario durante 1 h.

4. Tres lavados de 15 min con TTBS.

5. Incubación de la membrana con 12 ml de anticuerpo secundario durante 1 h.

6. Cuatro lavados de 15 min con TTBS.

7. Por último se realiza el revelado. Para ello, la membrana se incuba durante 30-60 s con 600 µl de la mezcla de reactivos del kit ECL Select™ Western Blotting Detection Reagent (Amersham, GE Healthcare). La emisión de luz es detectada con el sistema de detección de quimioluminiscencia ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad) durante 15-100 s. Las imágenes son analizadas con el programa ImageLab (Bio-Rad).

4.3.6.2. Inmunodetección en bacteroides

El aislamiento de bacteroides de nódulos de soja inoculados con las diferentes cepas se realizó como se describe en Mesa et al., 2004 y Tortosa et al., 2021. En resumen, se emplearon de 0,8 a 1 g de nódulos por cepa y condición, se rompieron en tampón de lisis (ver tabla 4.6) con ayuda de un mortero, se centrifugó 5 min a 250 x g a 4°C, y el sobrenadante se centrifugó a 12.000 x g durante 10 min. A continuación, el sedimento fue resuspendido en tampón de

sedimentos (ver tabla 4.6). Después de la extracción, se determinó la densidad celular de las suspensiones de bacteroides y se igualó la DO_{600nm} con el mismo tampón. Luego, se tomaron alícuotas, se centrifugaron a $12.000 \times g$ durante 5 min y se resuspendieron en tampón de carga SDS diluido seis veces (Tris-HCl 350 mM, pH 6,8, SDS al 10 %, glicerol al 30 %, DTT 620 mM, azul de bromofenol al 0,01 %) en una proporción de 20 μ l por ml de $DO_{600nm} = 1$. Finalmente, se hirvieron a $95^{\circ}C$ 10 min y se centrifugaron a $12.000 \times g$ durante 5 min antes de cargar en gel de poliacrilamida.

Las condiciones de SDS-PAGE y western blotting fueron iguales a las descritas en estudios previos (ver apartado 4.3.7.1).

4.3.7. Visualización de proteínas en geles de poliacrilamida con azul de Coomassie

Tras la electroforesis en geles de poliacrilamida, las proteínas se revelaron por tinción con Azul de Coomassie (*Coomassie Brilliant Blue R250*). Para tal fin, el gel de poliacrilamida se incubó durante 15 min en solución de Coomassie (ver tabla 4.6). A continuación, el gel se lava con una solución de desteñido (ver tabla 4.6) durante 1-2 h y por último con H_2O .

4.3.8. Concentración de eluidos de proteína de columnas cromatográficas

Para ensayos de cromatografía de exclusión molecular tras la purificación de proteínas fue necesario, en algunos casos, la concentración de las mismas para poder realizar los análisis de manera adecuada, utilizando las mismas concentraciones proteicas de todos los derivados requeridos. Para ello, algunas alícuotas de derivados proteicos fueron concentradas mediante el empleo de concentradores centrífugos de 3 kDa de tamaño de poro (Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Unit, Merck). Para tal fin, se centrifugaron

a 12.000 x g durante 4 min a 4°C volúmenes de 500 µl de proteína, para los que se cuantificó la concentración de las alícuotas antes y después de la centrifugación.

4.3.9. Determinación del estado oligomérico de FixK₂ mediante cromatografía de exclusión molecular por tamaño (SEC)

4.3.9.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Con el objeto de analizar el estado oligomérico de los diferentes derivados de la proteína FixK₂, se realizaron experimentos de cromatografía de exclusión molecular mediante el empleo de un sistema de HPLC. El análisis se realizó a temperatura ambiente en una columna Superdex 200 10/300 GL (Cytiva, Little Chalfont, Reino Unido) usando un sistema de purificación de proteínas ÄKTA PURE (Cytiva, Little Chalfont, Reino Unido). Después de equilibrar la columna con tampón de elución (Tris-HCl 40 mM, pH 7,0, KCl 150 mM, EDTA 0,1 mM), se inyectaron muestras de proteína de 100 µl y se separaron a un caudal de 0,75 ml/min. La absorbancia se registró a 280 nm. Para determinar el volumen de elución de las fases monómero (≈26 kDa) y dímero (≈52 kDa) de la proteína FixK₂, se realizó una curva calibración con el kit *Gel Filtration LMW Calibration Kit* (Cytiva, Little Chalfont, Reino Unido), según el protocolo descrito por la casa comercial, en la cual se utilizaron las siguientes proteínas: conalbúmina (75 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), ribonucleasa A (13,7 kDa) y aprotinina (6,5 kDa). Los experimentos de filtración en gel se repitieron al menos tres veces con preparaciones independientes de cada proteína en un rango de cinco concentraciones. Se empleó el software de control del sistema UNICORN™ (versión 6.3, Cytiva, Little Chalfont, Reino Unido) para programar las ejecuciones cromatográficas y para los análisis preliminares de los datos ajustando los tiempos de inyección.

4.3.9.2. Normalización de los perfiles de elución

Los resultados del análisis de las muestras de proteína realizados mediante cromatografía de exclusión molecular, dan lugar a perfiles de elución que requieren de un procesamiento informático para la normalización de resultados, como consecuencia de las desviaciones ocasionadas en la línea base cromatográfica (eje vertical Y, mAU o absorbancia a 280 nm) y el momento de inyección de las muestras (eje horizontal X o ml de elución). Por este motivo, los datos obtenidos en cada muestra analizada para cada derivado, fueron ajustados en función de diferentes parámetros.

Para el ajuste del eje horizontal X, los datos fueron normalizados en una primera etapa, restando a cada valor de X el valor equivalente al volumen transcurrido durante la inyección de la muestra (valor proporcionado por el programa UNICORN™), de esta manera, los perfiles de elución de todas las muestras inyectadas tendrían un mismo punto de inicio. A continuación, se seleccionaron únicamente los valores comprendidos entre 13,7 y 18,4 ml del eje X, con la finalidad de simplificar el eje horizontal a los rangos próximos al inicio y final del perfil de elución.

Para el ajuste del eje vertical Y, fueron necesarias dos etapas de normalización. La primera, consistió en restar a cada valor Y de la muestra el primer valor Y detectado por el sistema (momento uno), de manera que el primer valor equivaldría a cero. En la segunda etapa, se calculaba el valor mínimo de Y de cada muestra inyectada, y dicho valor era sumado a cada valor Y obtenido en la fase anterior. Dado que la línea base cromatográfica poseía valores negativos y con diferentes puntuaciones según el momento de inyección, con esta normalización lográbamos ajustar la línea base a cero para cada perfil de elución.

La última etapa del proceso de ajuste de datos consintió en la normalización de las áreas de cada perfil de elución. El objetivo de esta fase es evitar solapamiento de picos (monómero-dímero), así como hacer proporcional el área total para cada derivado a igualdad de concentración. Dado que las concentraciones y volúmenes inyectados para cada derivado son iguales, es esperable que las áreas totales resulten equivalentes en cada caso. Con este propósito se actuó como se describen a continuación:

1. Se procede a realizar la sumatoria de todos los valores Y de cada muestra inyectada obtenidos en la etapa anterior.
2. La muestra (a igualdad de concentración) con la sumatoria más alta es seleccionada como valor de referencia.
3. Al valor de referencia se le divide el valor de sumatoria de los valores Y de la muestra a normalizar (la muestra de la cual se obtiene el valor de referencia queda por tanto exenta de normalización), obteniendo un valor múltiplo.
4. A cada valor Y de la muestra a normalizar se le multiplica el valor múltiplo, obteniendo así el valor Y normalizado final, y con ello un área proporcional a cada rango de concentración.

4.4. Métodos de biología molecular

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

4.4.1.1. Lisado por calor

Para obtener ADN total de células de *E. coli* y *B. diazoefficiens*, en el cribado por PCR de distintos candidatos, se realizó un lisado celular mediante calor según el siguiente protocolo:

1. Se resuspende en tubos de microcentrífuga con 200 μ l de H₂O ultrapura una pequeña cantidad de masa celular procedente de cultivos sólidos, o 25 μ l de un cultivo líquido en fase estacionaria.

2. Cada tubo se somete durante 10 min a una temperatura 100°C.

Previo a la utilización del extracto obtenido, para la reacción de PCR, se enfrían en hielo y se centrifugan a 13.000 rpm durante 1 minuto. Se utiliza un volumen de lisado equivalente al 10% de la mezcla de reacción. Tras el lisado, las muestras pueden ser conservadas a 4 o -20°C (durante una semana o al menos un mes respectivamente).

4.4.1.2. Método comercial

Para obtener ADN total con mayor pureza de *B. diazoefficiens*, se utilizó el Kit de Realpure Spin Plantas y Hongos (Real®). El protocolo a seguir fue el descrito por la casa comercial y todas las soluciones necesarias están incluidas en el kit:

1. Tomar el sedimento celular de un cultivo de 50 ml de *B. diazoefficiens* crecido hasta fase exponencial y resuspender en 1 ml de tampón de extracción. Posteriormente, añadir 200 µl de solución PVP y homogenizar mediante vórtex.

2. Añadir 200 µl de solución SDS y volver a homogeneizar mediante vórtex. Incubar a 80°C durante 30-45 min.

3. Centrifugar la muestra a 13.000 rpm durante 5 min y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de micrófuga.

4. Añadir 200 µl de solución de precipitado e incubar 3 min en hielo. Volver a centrifugar a 13.000 rpm durante 5 min y traspasar el sobrenadante a un nuevo tubo.

5. Adicionar un volumen de solución de lisis con proteinasa K, mezclar e incubar a 70°C durante 10 min. A continuación, adicionar 300 µl de isopropanol y trasvasar la mezcla a una columna incluida en el kit. Centrifugar a 12.000 rpm durante 5 min y descartar el líquido que eluye.

6. Añadir a la columna 500 µl de solución de desinhibición, centrifugar y descartar el eluyente. Realizar dos lavados con 500 µl de solución de lavado y finalmente centrifugar la columna 2 min a 13.000 rpm.

7. Por último, eluir el ADN con 50 µl de tampón de elución o H₂O ultrapura a una temperatura de 70°C, esperando 1 min para la hidratación de la columna para, a continuación, centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min. La concentración de ADN se cuantifica mediante espectrofotometría 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* se llevó a cabo según el procedimiento que se detalla a continuación:

1. Centrifugar a 13.000 rpm durante 5 min cultivos de 3 ml de *E. coli* crecidos a 37°C durante 12-16 h, y resuspender en 300 µl de solución TENS (Tabla 4.6). Posteriormente, añadir 150 µl de ácido acético 3 M, pH 5,2 y se agita rápidamente mediante vórtex durante 5 s.

2. Centrifugar 10 min a 13.000 rpm y trasvasar el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga.

3. Añadir 1 ml de etanol absoluto enfriado a 4°C, mezclar por inversión y centrifugar durante 5 min. Eliminar el sobrenadante y realizar un lavado con 200 µl de etanol 70% a 4°C.

4. El sedimento obtenido se deja secar al vacío durante 15 min.

5. El sedimento se resuspende en 100 µl de H₂O ultrapura y se adiciona 1 µl de solución de *ARNasa* (Tabla 4.6).

Estas preparaciones de ADN se utilizaron en digestiones de ADN con endonucleasas de restricción y en las reacciones de PCR (las muestras se añadieron, como máximo, en un 10% del volumen final).

4.4.2.2. Métodos comerciales

4.4.2.2.1. Minipreps

En caso de requerir que el ADN plasmídico conserve mayor pureza, como en el caso de secuenciación o el empleo en clonajes posteriores, se utiliza el método comercial QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen®), según el protocolo que se detallan continuación.

1. Obtener el sedimento de 3 ml de cultivo de *E. coli* centrifugando a 13.000 rpm durante 1 min.

2. El sedimento se resuspende en 250 µl de solución P1. Lugo, adicionamos 250 µl de solución P2 y finalmente 350 µl de solución N3. Tras añadir las soluciones P2 y N3 se mezclan suavemente los tubos por inversión.

3. Centrifugar a 13.000 rpm durante 10 min y trasvasar el sobrenadante resultante a una columna proporcionada por el kit. Volver a centrifugar a 13.000 rpm, 1 min y eliminar el eluato.

4. Añadir 500 µl de solución PB a la columna y centrifugar como en los casos anteriores. Descartar el eluato y añadir a la columna 750 µl de solución PE. Centrifugar nuevamente y eliminar eluato. Posteriormente, centrifugar la columna para eliminar los posibles restos de etanol procedentes de la solución PE.

5. Por último, añadir a la columna 50 µl de H₂O ultrapura para que se hidrate durante 1 min. Centrifugar a 13.000 rpm, 1 min para que eluya el ADN en un nuevo tubo. Medir la concentración de ADN en el NanoDrop (apartado 4.4.5).

4.4.2.2.2. Midipreps

Para obtener ADN plasmídico con un mayor rendimiento que en la metodología de Minipreps, se utilizó el método comercial Plasmid Midi Kit (Qiagen®). Este protocolo se utilizó para la extracción de plásmidos con bajo número de copias o la preparación de ADN molde para ensayos de IVT. Se realizó según las instrucciones de la casa comercial tal como se detalla a continuación.

1. Se preparan 100 ml de cultivos de cepas *E. coli* con el plásmido de interés y se centrifugan a $5.500 \times g$ durante 15 min a 4°C.

2. Resuspender el sedimento en 4 ml de solución P1. A continuación, se añaden 4 ml de solución P2 y agitar manualmente de forma vigorosa.

3. Incubar durante 5 min a temperatura ambiente (15-25°C).

4. Adicionar 4 ml de solución P3 previamente enfriada en hielo, y mezclar rápidamente por inversión 4-6 veces. A continuación, incubar en hielo 15 min.

5. Centrifugar a $20.000 \times g$ durante 15 min y trasvasar el sobrenadante a una columna Tip 100 proporcionada por el kit. Antes de verter el sobrenadante sobre la columna, debe equilibrarse la columna con 4 ml de solución QBT.

6. Sobre la columna, se añaden 10 ml de solución QC y se deja eluir mediante gravedad. A continuación, se eluye el ADN añadiendo 5 ml de solución QF.

7. Precipitar el ADN añadiendo 3,5 ml de isopropanol y mezclar por inversión.

8. Centrifugar a 15.000 × g durante 30 min a 4°C y descartar el sobrenadante con cuidado de no arrastrar el sedimento.

9. Lavar el sedimento de ADN con 2 ml de etanol al 70% frío.

10. Centrifugar a 15.000 × g durante 10 min a 4°C y eliminar el sobrenadante.

11. Secar el sedimento al vacío durante 15 min y resuspender con 120 µl de H₂O ultrapura. Medir la concentración de ADN en el NanoDrop (apartado 4.4.5).

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

Para verificar la presencia de plásmidos en células de *B. diazoefficiens* introducidos por conjugación, utilizando *E. coli* como bacteria donadora, se empleó el siguiente protocolo de aislamiento de plásmidos:

1. Preparar un sedimento celular a partir de 5 ml de cultivo en fase exponencial tardía de *B. diazoefficiens*.

2. Lavar dos veces resuspendiendo el sedimento en 500 µl de solución de lavado (Tabla 4.6).

3. Tras el lavado, resuspender el sedimento en 200 µl de solución MAXI (Tabla 4.6). A continuación, adicionar 400 µl de solución de lisis (Tabla 4.6) y mezclar mediante inversión. La lisis completa se alcanza pasados 10-15 min.

4. Adicionar 200 µl de solución de neutralizado (Tabla 4.6). Invertir varias veces para lograr la mezcla, e incubar en hielo 15 min. Seguidamente, centrifugar a 13.000 rpm, 3 min, añadir el sobrenadante a un nuevo tubo y adicionar un volumen de isopropanol. Volver a centrifugar a 13.000 rpm y eliminar el sobrenadante.

5. Adicionar 1 ml de etanol 70% y centrifugar a 14.000 rpm, 2 min. Descartar el sobrenadante y secar el sedimento al vacío durante 10-15 min.

6. Resuspender el sedimento en 20 μ l de H₂O ultrapura.

Dado que la extracción de ADN plasmídico de *B. diazoefficiens* tiene un rendimiento muy bajo, no se puede detectar en geles de agarosa. Por esta razón, para obtener una cantidad mayor de ADN plasmídico y poder comprobarlos, son transformados en células competentes de *E. coli* DH5 α (apartado 4.4.13.3).

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

Para la extracción de ARN total de células de *B. diazoefficiens* cultivadas en condiciones de microoxia, se llevó a cabo el protocolo que se detalla a continuación.

1. Se mezclan 35 ml de cultivo con 5 ml de solución de Stop (Tabla 4.6) en tubos de centrifuga de 50 ml libres de *ARNasa* (Labcon[®]) y se centrifuga a 9.000 rpm (5 min, 4°C). Se descarta el sobrenadante y el sedimento celular puede congelarse en nitrógeno líquido y conservarlo a -80°C para su utilización posterior.

2. El sedimento celular es resuspendido en 1,5 ml de tampón A (Tabla 4.6) previamente enfriado en hielo. Tras la resuspensión, la solución obtenida es trasvasada a tubos de centrifuga de 15 ml con 160 μ l de SDS al 10%, 3,5 ml de fenol ácido y 2 ml de tampón A (Tabla 4.6), calentados a 65°C previamente. Tras la mezcla, se agitan 30 s mediante vórtex y se incuban a 65°C durante 2 min. Se vuelven a agitar mediante vórtex durante 1 min y se incuban nuevamente 5 min.

3. Tras la incubación, los tubos son centrifugados a 9.000 rpm, 5 min, 4°C. La fase acuosa se trasvasa a un nuevo tubo de

centrífuga con 3,5 ml de fenol ácido y se agita 1 min en vórtex. Este paso es utilizado para muestras muy contaminadas por ADN.

4. Se centrifuga a 9.000 rpm, 8 min, 4°C y la fase acuosa se transfiere a otro tubo de centrifuga que con 3 ml de una solución de biofenol (fenol/cloroformo/alcohol isoamílico; Ambion). Tras mezclar se agita en vórtex durante 1 min.

5. Se vuelve a centrifugar como en los casos previos y se transfiere la fase acuosa a un nuevo tubo de centrifuga que contiene 2,5 ml de cloroformo, para a continuación, agitar 1 min en vórtex.

6. Por último, se realiza una otra centrifugación a 9.000 rpm, 5 min, 4°C y se trasfiere la fase superior acuosa a otro tubo de centrifuga de 15 ml. Esta fase será la que contenga el ARN, por lo cual desde este punto deben mantenerse las muestras en hielo constantemente. Se recuperan 10 µl de la solución obtenida para verificar, en un gel de agarosa al 1,5%, la integridad del ARN.

7. Se alícuota el resto de la solución, distribuyendo alícuotas de 500 µl en tubos de microfuga. Estos tubos contendrán previamente 2 volúmenes de etanol 100% (1 ml) y 1/10 de ácido acético 3 M (50 µl). A continuación, se procede a la mezcla mediante inversión y se almacena a -80°C para precipitar el ARN durante al menos una noche.

8. Tras precipitar el ARN, los tubos de microcentrifuga son centrifugados a 13.000 rpm, durante 1 h a 4°C. El sobrenadante se descarta y se adiciona 1 ml de etanol al 80% para lavar el pellet de ARN, sin resuspender. Se centrifuga nuevamente durante 15 min y se elimina el sobrenadante con una pipeta.

9. El tubo es invertido sobre un papel y se deja secar durante 20-30 min, hasta que el sedimento de ARN esté seco, pero no

excesivamente. Transcurrido este tiempo, se adicionan 50 μ l de H₂O ultrapura, se resuspende y se cuantifica la concentración en el NanoDrop (ver apartado 4.4.5).

4.4.5. Determinación de la concentración de ADN y ARN

La concentración tanto del ADN como del ARN es calculada con el instrumento NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific®) por determinación de la absorbancia a 260 nm de soluciones acuosas mediante espectrofotometría. Con este instrumento podemos seleccionar el tipo de ácido nucleico (ARN o ADN de cadena doble o sencilla). Cada medida se lleva a cabo con una gota de 1-2 μ l de solución, con un ajuste previo con un blanco, que puede ser una gota de H₂O ultrapura u otra solución utilizada para eluir el ácido nucleico. Una vez medidas las muestras, pueden observarse en la pantalla los espectros de absorbancia a 260 y 280 nm (A₂₆₀ y A₂₈₀), además de los datos de concentración en ng/ μ l y los ratios 260/280 y 260/230. Los ratios indican el grado de pureza de la muestra. De este modo, el ratio 260/280 debe tener valores cercanos 1,8 en muestras de ADN y 2 en muestras de ARN (ratios menores indican una posible contaminación por proteínas o disolventes orgánicos). Los valores para el ratio 260/230 deben encontrarse entre 1,8-2 (valores fuera de este rango indican la presencia de contaminantes co-purificados con la muestra).

Las concentraciones de los ácidos nucleicos resultantes pueden verificarse mediante electroforesis en gel de agarosa (apartado 4.4.9), contrastando la intensidad lumínica de la muestra con las del marcador de concentraciones conocidas de ADN GeneRuler 1 Kb Plus DNA (Thermo Fisher Scientific®), ya sea de forma directa o con el software ImageLab (Bio-Rad®).

4.4.6. Digestión de ADN

4.4.6.1. Digestión con endonucleasas de restricción

Tanto la verificación de construcciones como la clonación de fragmentos de ADN en vectores, puede necesitar del empleo de endonucleasas de restricción para la digestión de ADN, con objeto de poder comparar el perfil obtenido con el teórico del clonaje *in silico* con el programa Clone Manager® (9 Professional Edition) o SnapGene® Viewer (versión 4.2.6). Estas reacciones de restricción se llevan a cabo en tubos de microcentrifuga con 1 µg de ADN plasmídico o 0,2 µg de ADN procedente de PCR como máximo, 1 µl de tampón de reacción, con o sin tampón de carga según las recomendaciones del proveedor (dependiendo de su empleo posterior para clonaje de fragmentos o cribado de candidatos), 0,5 µl (5 U) de la endonucleasa a emplear y H₂O ultrapura hasta 10 µl como volumen final. Cuando es necesario realizar reacciones con varias endonucleasas, para que las enzimas no superen el 10% del volumen total de la reacción se ajusta previamente el volumen de las mismas, incrementando de forma general hasta 30-50 µl. Las reacciones son incubadas durante un tiempo determinado para cada enzima a 37°C (Tabla 4.7). En algunos casos es necesario realizar una inactivación térmica (Tabla 4.7) o una extracción fenólica para eliminar la actuación de las enzimas, si el fragmento digerido va a ser empleado en posteriores clonaciones. En este último caso, se incrementa el volumen hasta 300 µl, adicionando un volumen de biofenol y agitando en vórtex durante 10 s. A continuación, se centrifuga a 13.000 rpm, 5 min y rescatándose la fracción acuosa superior. Seguidamente, se añaden 2,5 volúmenes de etanol absoluto y se incuba a -80°C durante 1 h o a -20°C un mínimo de 12 h. De esta forma precipita el ADN y se procede a la centrifugación a 13.000 rpm durante 60 min para la obtención del

sedimento. El sedimento es lavado con 200 µl de etanol 70% frío. Se seca la muestra al vacío y con 10 µl de H₂O ultrapura se resuspende el sedimento.

La tabla que se muestra a continuación indica las endonucleasas utilizadas durante el desarrollo de esta tesis doctoral, con las características a considerar para su uso.

Tabla 4.7. Endonucleasas de restricción.

Nombre	Diana	Tiempo de reacción (min)		Inactivación
		Plásmidos 1 µg	PCR 0,2 µg (bases)*	
<i>BamHI</i>	G/GATCC	5	5 (2)	5 min/80°C
<i>BglII</i>	A/GATCT	20	30 (3)	-
<i>DpnI</i>	GA(CH ₃)/TC	30	-	-
<i>EcoRI</i>	G/AATTC	5	20 (2)	5 min/80°C
<i>HindIII</i>	A/AGCTT	5	20 (3)	10 min/80°C
<i>KpnI</i>	GGTAC/C	5	5 (3)	5 min/80°C
<i>NdeI</i>	CA/TATG	5	60 (3)	5 min/65°C
<i>NotI</i>	GC/GGCCGC	30	5 (2)	5 min/80°C
<i>PstI</i>	CTGCA/G	5	30 (3)	-
<i>SacI</i>	GAGCT/C	5	30 (1)	5 min/65°C
<i>SmaI</i>	CCC/GGG	5	5 (1)	5 min/65°C
<i>SpeI (BcuI)</i>	A/CTAGT	5	5 (1)	-
<i>XbaI</i>	T/CTAGA	5	5 (2)	20 min/65°C
<i>SalI</i>	G/TCGAC	5	60 (3)	10 min/65°C
<i>XhoI</i>	C/TCGAG	5	5 (2)	5 min/80°C

Se muestra la secuencia diana con el lugar de corte en la cadena 5'-3'.

* Bases protectoras requeridas en el extremo 5' en el caso de digestiones de fragmentos de PCR indicadas entre paréntesis.

4.4.6.2. Digestión de ADN metilado

La digestión de ADN metilado se lleva a cabo con la finalidad de eliminar ADN molde procedente de PCR en ensayos de mutagénesis puntual dirigida, manteniendo solo al ADN de nueva síntesis (sin metilar). Para tal fin, se adiciona 1 µl de enzima *DpnI* (New England Biolabs®) a 10 µl de muestra de ADN. La mezcla es centrifugada a 13.000 rpm durante 30 s, y se incuba a 37°C durante 70 min, y seguidamente a 80°C durante 20 min para su inactivación.

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

Esta técnica se ha utilizado para la amplificación de ADN para alcanzar diferentes objetivos:

- Obtener fragmentos de ADN para la clonación en vectores.
- Chequeo en construcciones de plásmidos.
- Verificación de transformaciones y conjugaciones.
- Chequeo de cepas recombinantes.
- Comprobación de ausencia de ADN como contaminante de muestras de ARN.

En función del objetivo de la amplificación de ADN pueden utilizarse ADN polimerasas diferentes:

- Dream Taq (Thermo Fisher Scientific®): PCR de rutina de verificación de clones, de especificidad de oligonucleótidos, comprobaciones rutinarias mediante secuenciación y chequeo de contaminación de ADN en muestras de ARN.

- Phusion (Thermo Fisher Scientific®): En reacciones en las que se precisa mucha fidelidad de secuencia amplificada y amplicones de mayor tamaño, por este motivo, es la utilizada para fragmentos de ADN que serán utilizados en clonaje.

Las reacciones se realizan en termocicladores de tapa calefactable Mastercycler 5333 (Eppendorf®), Px2 (Thermo Fisher Scientific®) y GeneAmp 2400 (PerkinElmer®). El programa de PCR es diseñado en función de las especificaciones de cada polimerasa.

En las siguientes tablas se detallan la composición de las mezclas de reacción para cada una de las ADN polimerasas en reacciones de 10 µl, (Tabla 4.8), así como las temperaturas y los tiempos de cada etapa (Tabla 4.9).

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

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

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

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

4.4.8. Mutación puntual dirigida (QuikChange)

Para realizar mutaciones puntuales en secuencias de ADN de cadena doble se llevó a cabo la técnica QuikChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene®), según el siguiente protocolo:

1. Diseñar parejas de oligonucleótidos complementarios antiparalelos de alrededor de 40 pb, que contengan en la zona central los nucleótidos a reemplazar (Tabla 4.3).

2. Llevar a cabo una reacción de PCR con Phusion ADN polimerasa (véase con más detalle en apartado 4.4.7), utilizando como ADN molde un plásmido con un tamaño preferiblemente inferior a 6 kb que con la región de ADN a mutar. En caso de no disponer del plásmido, se amplificará mediante PCR la secuencia de ADN en la que se desee realizar la mutagénesis (también con Phusion ADN polimerasa). Tras verificar mediante electroforesis en gel de agarosa (apartado 4.4.9), la pureza y el tamaño del producto de PCR, se procede a purificar (apartado 4.4.10) y digerir con las endonucleasas de restricción adecuadas con objeto de clonar dicho fragmento de PCR en un vector de pequeño tamaño y alto número de copias.

3. Digestión enzimática del producto de PCR anterior con la enzima *DpnI* (1 μ l, 10 U/ μ l, New England Biolabs®). Para más detalles consúltese el apartado 4.4.6.2.

4. Se comprueba la efectividad de la reacción utilizando 5 μ l de los productos de PCR digeridos y no digeridos con *DpnI*, mediante electroforesis en gel de agarosa (apartado 4.4.9).

5. Transformar células competentes de *E. coli* DH5 α (apartado 4.13.3) con 5 μ l de ADN digerido y sembrar en placas de LB suplementado con los antibióticos adecuados.

6. Seleccionar colonias, aislar y purificar ADN plasmídico, y comprobar mediante secuenciación (apartados 4.4.2 y 4.4.11, respectivamente) la presencia de las mutaciones puntuales dirigidas deseadas usando oligonucleótidos específicos (Tabla 4.3).

4.4.9. Electroforesis de ADN y ARN en geles de agarosa

Tanto la visualización como la separación de fragmentos de ADN resultantes de PCR, digestión o minipreps se realiza mediante electroforesis horizontal de rutina en geles de agarosa al 0,7% en TBE (0,5X) o 1% para la distinción de fragmentos de menos de 500 pb (Tabla 4.6). Se lleva a cabo con el sistema Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad®) con TBE (0,5X) usado como tampón de desarrollo (Tabla 4.6) para la realización de la electroforesis. Las muestras, previamente mezcladas con tampón de carga 6X (Tabla 4.6), se cargan en los geles de agarosa y se corren a 100 V hasta que el frente ha recorrido el 75% de la longitud del gel.

Para verificar la integridad de muestras de ARN total se utiliza el mismo sistema con geles de agarosa al 1% disuelta en TAE (1X preparado con H₂Od-DEPC) (Tabla 4.6). Así mismo, antes del uso la suspensión del gel es tratada con 0,005% de DEPC durante 30

min. De igual modo, cubeta y bandeja de electroforesis se someten a un lavado con SDS 0,5% durante al menos dos horas y posteriormente se lavan con H₂O_d-DEPC antes de su empleo. Las muestras son cargadas con tampón de carga 6X, como en las muestras de ADN, y como tampón de desarrollo se utiliza TAE 1X (Tabla 4.6). En este caso, la electroforesis se realiza a 80 V durante 30-45 min. Podrán visualizarse tres bandas definidas correspondientes a ARNr 23s, 16s y 5s.

Para revelar y visualizar las muestras en los geles se utiliza el sistema GelDoc XR (Bio-Rad®) haciendo uso de un agente intercalante de ácidos nucleicos que se incorpora en el tampón de carga al 2%, como el bromuro de etidio (5 µl de una solución de 10 mg/ml por 100 ml de gel) o del fluoróforo GelRed (Biotium®). Estos fluoróforos son capaces de emitir luz a 605 nm cuando están unidos al ADN, excitándose por luz ultravioleta a 250 nm. Para el análisis rutinario de imagen se utiliza Quantity One (Bio-Rad®) e ImageLab (Bio-Rad®).

4.4.10. Purificación de fragmentos de ADN de PCR o de restricción

La eliminación de restos de agarosa, oligonucleótidos, tampón, ADN molde o dNTPs de una reacción de PCR se requiere cuando el fragmento amplificado se destina a clonación directa en un vector o digerido previamente por endonucleasas de restricción, para posteriormente clonarlo en vectores de clonación. Dicha purificación se puede llevar a cabo directamente en el tubo de reacción de PCR o tras la separación del fragmento de un gel de agarosa.

4.4.10.1. A partir de la reacción de PCR

Cuando la reacción de PCR resulta en un único producto de ADN, éste es purificado utilizándose el kit Minielute PCR Purification Kit (Qiagen®), según el siguiente protocolo:

1. Añadir 5 volúmenes de tampón PB a la reacción de PCR, mezclar y verificar que dicha mezcla es amarilla, con ayuda de un indicador de pH que posee el tampón. De no ser así, resultando la coloración naranja o violeta, añadir 10µl de acetato sódico 3 M pH5, lo que hará que la coloración torne a amarilla. Colocar la mezcla en una columna que la proporciona el propio kit y centrifugar 1 min a 13.000 rpm. Tras la centrifugar descartar el eluyente.

2. Utilizar 750 µl de tampón PE para lavar la columna y volver a centrifugar como en el paso anterior. Descartar el eluyente y centrifugar la columna a máxima velocidad un minuto, con el fin de eliminar los restos de etanol.

3. Añadir 10 µl de tampón EB o H₂O ultrapura para que se hidrate el ADN de la columna durante 1 min. Finalmente, eluir en un nuevo tubo centrifugando la columna a 13.000 rpm, 1 min.

4. Cuantificar la concentración de ADN en NanoDrop (apartado 4.4.5).

4.4.10.2. A partir de geles de agarosa

Cuando se pretende purificar un fragmento a partir de múltiples productos de PCR, o un producto específico de una restricción para su clonaje, este puede ser extraído de una banda concreta desde un gel de agarosa. En este caso se puede utilizar el kit comercial Gene JET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific®), o el kit QIAEX II Gel extraction Kit (QIAGEN®), siguiendo el protocolo definido por la casa comercial.

Para Gene JET Gel Extraction Kit:

1. Cortar la banda del gel en un transiluminador UV e introducir en un tubo de microcentrífuga de 2 ml. Previamente se requiere pesar la porción de gel extraída.

2. Añadir 100 µl de Binding Buffer por cada 100 mg de agarosa.

3. Incubar a 50-60°C durante 10 minutos.

4. Mezclar mediante vórtex. Si el color es naranja o violeta se precisará añadir 10 µl de acetato sódico 3M, si el color es amarillo el pH será óptimo.

5. Transferir a la columna suministrada por el kit un volumen máximo de 800 µl. Centrifugar 1 minuto a 13000 rpm y descartar eluyente.

6. Añadir 100 µl de Binding Buffer, centrifugar 1 minuto a 13000 rpm y descartar eluyente.

7. Añadir 700 µl de Wash Buffer a la columna, centrifugar 1 minuto a 13000 rpm y descartar eluyente.

8. Volver a centrifugar a 13.000 rpm 1 min como en el paso anterior.

9. Transferir la columna a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5ml, añadir 20 µl de Elution Buffer o H₂O ultrapura y volver a centrifugar.

10. Medir en Nanodrop (véase apartado 4.4.5).

Para QIAEX II Gel extraction Kit:

1. Aislar banda.

2. Añadir 3 volúmenes de buffer QX1.

3. Añadir 10µl de tampón QIAEX II (previamente resuspendido) a cada muestra (para una cantidad inferior o igual a 2 µg de ADN).

4. Incubar a 50°C 10 min, mezclar y asegurar que el color sea amarillo (de no ser así añadir 10 µl de acetato sódico 3M pH5).

5. Centrifugar a 13.000 rpm 30 s y descartar el sobrenadante.

6. Lavar sedimento con 500 µl de buffer QX1, mezclar, centrifugar a 13.000 rpm 30 s y descartar el sobrenadante.

7. Lavar sedimento con 500 µl de buffer PE, mezclar, centrifugar a 13.000 rpm 30 s y descartar el sobrenadante.

8. Dejar que el sedimento se seque durante no más de 10 min hasta que el color comience a tonar a blanco.

9. Añadir 20 µl de H₂O ultrapura precalentada a 50°C, resuspender con ayuda de una pipeta e incubar a 50°C 5 min.

10. Centrifugar a 13.000 rpm 30 s y transferir el sobrenadante con cuidado a un nuevo tubo de microcentrifuga.

11. Medir en Nanodrop (ver apartado 4.4.5).

4.4.11. Secuenciación de ADN

Con objeto de verificar clonaciones o mutagénesis en plásmidos o cromosoma bacteriano, secuenciamos la región de interés mediante el método Sanger. La técnica es realizada en el Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra (<https://www.ipb.csic.es/servicios/Genomica/index.html>) siguiendo las indicaciones del servicio. Se precisa que la muestra esté disuelta en H₂O ultrapura, con 400-800 ng de ADN plasmídico, o 10-80 ng de producto de PCR, 6,4 pmoles de un único oligonucleótido necesario para iniciar la lectura de secuenciación y llevar a un volumen final de 12 µl con H₂O ultrapura. Los resultados recibidos

desde el servicio son analizados con programas informáticos como FinchTV[©] (versión 1.4.0) y Clone Manager[®] (9 Professional Edition).

4.4.12. Ligación de fragmentos de restricción en vectores de clonación

4.4.12.1. Ligación a vectores de clonación

Para ligar un fragmento de ADN en un vector es necesario que ambos se hayan digerido previamente con enzimas compatibles, para a continuación, mezclar moles de vector en inserto en una proporción 1:3, siendo al menos 100 ng la suma de ambas moléculas de ADN. Esta reacción se realiza en tubos de microcentrifuga, añadiendo 1 µl de ligasa (T4 DNA ligase, 1U/µl; Roche[®]), ADN vector, ADN inserto, 1 µl de tampón de ligasa 10X y H₂O ultrapura hasta alcanzar un volumen final de 10 µl. A continuación, se mezcla y se centrifuga (un pulso), incubándose durante 1 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.

4.4.12.2. Defosforilación de vectores de clonación

A fin de evitar una posible religación o la ligación entre moléculas de vector digerido, este puede ser defosforilado mediante un tratamiento con fosfatasa alcalina, según el siguiente protocolo.

1. Una vez digerido el vector con las enzimas de restricción adecuadas, preparar la reacción de defosforilación en un tubo de microcentrifuga:

- Hasta 1 µg de vector digerido.
- 0,5 µl de fosfatasa alcalina de camarón (Shrimp Alkaline Phosphatase, SAP, 1 U/µl. Thermo Fisher Scientific[®]).
- 1 µl de tampón de fosfatasa alcalina 10X.
- H₂O ultrapura hasta 10 µl.

2. Mezclar cuidadosamente y centrifugar (1 pulso). Incubar a 37°C, 60 min para extremos 3' protuberantes o romos y 30 min para extremos 5' protuberantes. Detener la reacción inactivando con calor incubando 15 min a 65°C.

4.4.13. Transferencia de ADN en células de *E. coli*

Para realizar una transferencia de ADN a células de *E. coli*, se requiere una preparación previa de las mismas. Para tal fin, se utiliza la técnica del cloruro de rubidio (RbCl), descrita por Hanahan, 1983, o la técnica del cloruro de calcio (CaCl₂) siguiendo el protocolo de Chang et al., 2017.

4.4.13.1. Preparación de células competentes con RbCl

1. Inocular un matraz de 500 ml con 100 ml de medio LB a 37°C, con 5 ml de un cultivo de células de *E. coli* crecido durante 16 h. Incubar en agitación (170 rpm) a 37°C hasta alcanzar una DO600 de 0,4-0,6 (fase logarítmica). A continuación, el cultivo se coloca en hielo durante 15 min para detener el crecimiento celular.

2. Centrifugar el cultivo en tubos estériles a 8.000 × g, 10 min, 4°C. Descartar el sobrenadante y resuspender el sedimento resultante en 30 ml de solución TFB1 (Tabla 4.6) estéril, enfriado previamente a 4°C. Incubar en hielo 15 min y centrifugar a 8.000 × g durante 10 min a 4°C. Descartar el sobrenadante.

3. El sedimento obtenido es resuspendido en 4 ml de solución TFB2 (Tabla 4.6) enfriado previamente. Se alicuota en tubos de micrófuga y se conservan a -80°C.

Dada la sensibilidad de las células competentes se requiere, para evitar la lisis celular, que todos los procesos se lleven a cabo sin estrés mecánico y en frío, pipeteando con cuidado y sin agitaciones en vórtex.

4.4.13.2. Preparación de células competentes con CaCl₂

1. Preparar CaCl₂ 1 M esterilizado mediante filtración con un tamaño de poro de 0,22 µm.

2. Diluir la solución de CaCl₂ 1 M con 9 volúmenes de H₂O estéril, quedando la solución a una concentración de 0,1 M. Seguidamente adicionar glicerol estéril al 15%.

3. Incubar células de *E. coli* en medio líquido LB a 37°C y 200 rpm durante 12-16 horas.

4. Agregar 1 ml de cultivo a 99 ml de medio fresco LB (dilución 1:100, sin antibióticos). Incubar a 37°C y 200 rpm durante 3-4 horas o hasta una DO de 0,4.

5. Centrifugar los cultivos a 4°C y 4.000 rpm durante 10 minutos, y descartar el sobrenadante.

6. Resuspender los sedimentos en 20 ml de CaCl₂ 0,1 M enfriado a 4°C, e incubar en hielo durante 30 minutos.

7. Volver a centrifugar a 4°C y 4.000 rpm durante 10 minutos y descartar el sobrenadante.

8. Resuspender en 5 ml de CaCl₂ 0,1 M y 15% glicerol enfriado a 4°C.

9. Utilizar para transformación o conservar a -80°C.

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

Para llevar a cabo la transferencia de ADN plasmídico a células de *E. coli* se realiza la metodología descrita por Rodríguez y Tait, 1983, para transformaciones bacterianas, modificada como se detalla a continuación:

1. Alícuotas de 100 μ l de células competentes son descongeladas en hielo (aproximadamente 10 min).

2. Se adicionan 25 ng de plásmido puro o 50-100 ng de ADN procedente de ligación con el que se desee transformar. Se mezcla cuidadosamente y se incuba en hielo durante 30 min.

3. La mezcla se somete a un choque térmico de 42°C durante 45 s y a continuación se incuba 5 min en hielo.

4. Se adicionan 400 μ l (4 volúmenes) de medio LB y se incubamos a 37°C en agitación durante al menos 1 h en función del antibiótico de selección (con algunos antibióticos se requiere ampliar el tiempo de incubación). Se preparan placas Petri con medio LB y los antibióticos adecuados. Para una selección por color, se puede adicionar al medio 40 μ l de X-Gal (5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) a una concentración de 20 mg/ml, diluido en dimetilformamida, y 4 μ l de IPTG (1-Isopropil-(R)-D-1-tiogalactopiranosido) (Tabla 4.6) a una concentración de 200 mg/ml.

5. Finalizada la transformación las células se siembran en las placas para ser incubadas a 37°C durante la noche.

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

Para transferir ADN a células de *B. diazoefficiens*, se procede a una conjugación biparental de la cepa de *E. coli* S17.1, que contiene el plásmido de interés o la construcción que se quiere transferir, siguiendo el protocolo que se describe a continuación:

1. En 50 ml de PSY suplementado con los antibióticos adecuados se cultivan las cepas receptoras *B. diazoefficiens* hasta alcanzar la fase exponencial tardía (4-5 días). Se cultivan en 3 ml de LB con los antibióticos adecuados las cepas donadoras *E. coli*

S17.1 con cada una de las construcciones a transferir, durante 16 h (los cultivos se iniciarán un día antes de llevar a cabo la conjugación).

2. Antes de iniciar el proceso de conjugación, se refrescan los cultivos de las cepas donadoras inoculando 150 μ l de los cultivos del día anterior en tubos con 3 ml de LB suplementado con los antibióticos adecuados. Se cultivan durante aproximadamente 3 h, hasta alcanzar la fase logarítmica (DO600 0,6-0,8).

3. Se centrifugan 1 ml de la donadora *E. coli* S17.1 y 5 ml de la cepa receptora *B. diazoefficiens*. Se desecha el sobrenadante y el sedimento se lava dos veces con 1 ml de medio PSY.

4. Se resuspende el sedimento obtenido en 100 μ l de PSY y se coloca la suspensión en el centro de una placa de PSY sin antibióticos, dejándola secar para a continuación incubarla 48 h a 30°C.

5. Tras incubar, se preparan dos placas de PSY suplementadas con los antibióticos necesarios por cada conjugación, para llevar a cabo la selección de los transconjugantes. Para ello se añade 15 μ g/ml de cloranfenicol, con objeto de evitar el crecimiento de las células de *E. coli*.

6. Se recupera con un asa de siembra la masa celular de la gota inoculada previamente y se resuspende en 1 ml de PSY sin antibióticos.

7. Por último, con 30 y 200 μ l de la suspensión celular procedente de la etapa anterior se siembran en masa las placas de PSY previamente preparadas. Se incuban a 30°C durante aproximadamente 10-15 días, hasta la aparición de colonias. Posteriormente las colonias son sembradas en placa en estría con

los mismos antibióticos (ahora sin cloranfenicol) para verificarlas posteriormente.

Si el plásmido que deseamos transferir tiene la misma resistencia a antibióticos que la cepa de *E. coli* S17.1, se requerirá de cruces triparentales desde las cepas donadoras derivadas de *E. coli* DH5 α a las cepas de *B. diazoefficiens* empleando una cepa de *E. coli* helper lo cual permite transferir el ADN a las células de *B. diazoefficiens*.

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

Para construir cepas de *B. diazoefficiens* mutantes en un gen mediante delección en fase, se emplearon derivados del plásmido suicida pK18*mobsacB* (Tabla 4.2) que poseen 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 forma que codifican 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 así mantener el mismo marco abierto de lectura). Así se garantiza que con la delección no se generan proteínas aberrantes y, además, no se elimina ningún elemento 5'- o 3'-UTR del transcrito, para evitar efectos polares sobre otros genes.

Para llevar a cabo la construcción de los plásmidos derivados de pK18*mobsacB*, se amplifican por PCR (véase apartado 4.4.7) los fragmentos de ADN que se vayan a requerir en cada construcción, utilizando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (véase apartado 4.4.7). Así mismo, las parejas de oligonucleótidos utilizadas para la amplificación de los fragmentos de ADN contendrán en sus extremos secuencias diana para endonucleasas

de restricción compatibles con la clonación en pK18*mobsacB*. La diana de restricción del extremo 3' del fragmento *up* y del extremo 5' del fragmento *down* debe ser comunes, para que el clonaje en fase de ambos fragmentos seas viable. Mediante perfil de restricción (apartado 4.4.6.1), PCR (apartado 4.4.7) y secuenciación (apartado 4.4.11) se verifica la correcta inserción de ambos fragmentos en el plásmido suicida.

Mediante una estrategia de recombinación doble se deletiona el gen de interés, eliminándolo de la región cromosómica deseada. En este sentido, se emplea la cepa donadora *E. coli* S17.1 con el plásmido de interés, con objeto de introducirlo en la cepa parental *B. diazoefficiens*. A continuación, son seleccionados los clones transconjugantes por resistencia a Km, y posteriormente se transfieren en estría a otra placa de PSY suplementado con Km. Posteriormente, la recombinación simple del plásmido es verificada mediante PCR, comprobando también si ha ocurrido con el fragmento 5' o 3'. A continuación, se lleva a cabo la recombinación doble sembrando los clones en estría en una placa de PSY que contiene sacarosa al 10%. El plásmido pK18*mobsacB* confiere sensibilidad a sacarosa, por lo que únicamente los clones que pierdan el plásmido podrán crecer en presencia de sacarosa (cepa parental o doble recombinación). Una vez aparecen las colonias, se transfieren con una misma punta de pipeta a dos placas independientes de PSY, suplementadas o no con Km. La verificación de la delección del gen, se realiza por PCR en los clones que solo crezcan en ausencia de Km. Así mismo, se llevan a cabo reacciones de PCR con diferentes combinaciones de oligonucleótidos, para mediante secuenciación (apartado 4.4.11), verificar la correcta sustitución del gen de interés.

4.4.16. Tratamiento con *ADNasa* de muestras de ARN

Con la finalidad de eliminar contaminación por ADN de muestras de ARN, se trata con *ADNasa* según se indica en el siguiente protocolo:

1. Preparar la mezcla de reacción:

- Inhibidor de *ARNasas* (Roche®) → 3 µl.
- Tampón de reacción 10X (Invitrogen™) → 20 µl.
- *ADNasal* (Invitrogen™) → 5-10 µl.
- H₂O ultrapura → hasta 200 µl.
- Muestra de ARN → x volumen (100 µg como máximo).

2. Incubar a 37°C durante 60 min (para 5 µl de *ADNasal*; el doble de tiempo para 10 µl) y transferir a hielo.

3. Las muestras ARN limpias de ADN son purificadas con el kit comercial RNAeasy MiniKit (Qiagen®).

4. Añadir 700 µl de tampón RLT suplementado con β-mercaptoetanol en una proporción 1:100, según las instrucciones de la casa comercial, a 200 µl de reacción y mezclar por pipeteo. Añadir 500 µl de etanol 100% y mezclar por pipeteo.

5. A una columna suministrada por el kit se le añaden 700 µl de la mezcla anterior y se coloca sobre un tubo de microcentrífuga de 2 ml. Se centrifuga durante 15 s a 10.000 rpm. Descartar el eluyente y cargar de nuevo la columna con el resto de mezcla que quede, repitiendo la centrifugación y descartando el eluyente.

6. Colocar la columna en un nuevo tubo de microfuga y adicionar sobre la misma 500 µl de tampón RPE (conteniendo etanol). lavar La columna centrifugando 15 s a 10.000 rpm y descartar el eluido.

7. Volver a adicionar 500 μ l de tampón RPE sobre la columna y centrifugar 2 min a 10.000 rpm para que se seque la membrana de gel de sílice de la columna.

8. Colocar la columna en un otro tubo de micrófuga y centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min para eliminar el etanol restante.

9. Con 40 μ l de H₂O ultrapura libre de *ARNasas* se eluye el ARN en un nuevo tubo de microcentrífuga centrifugando durante 1 min a 10.000 rpm. Pipetar el eluido y cargar de nuevo sobre la columna para un nuevo pase de centrifugación igual al anterior para extraer la mayor cantidad posible de ARN de la columna.

10. Cuantificar la concentración de ARN en el NanoDrop (apartado 4.4.5), repartir las muestras en alícuotas de 3 μ g y conservar a -80°C, tras congelar con nitrógeno líquido. Previamente, se toma una alícuota de aproximadamente 1 μ g de ARN para verificar la integridad del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (apartado 4.4.9). Por otra parte, se preservan 0,5 μ g de ARN para comprobar una posible contaminación de ADN de las muestras por PCR.

Para comprobar en muestras de ARN la presencia de ADN, se lleva a cabo una PCR con ADN polimerasa Dream Taq como en casos de PCR de rutina (apartado 4.4.7), asumiendo que el ADN molde es ARN (500 ng totales). Como control positivo de la reacción se utilizan 50 ng de ADN genómico de *B. diazoefficiens* 110spc4 y H₂O ultrapura como control negativo. Los oligonucleótidos empleados para este tipo de comprobación son fixN4_for y fixN4_rev (Tabla 4.3).

4.4.17. Reverso transcripción

Para la obtención de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN total, se realiza una reacción de reverso transcripción. Para ello se emplea la enzima *SuperScriptIV* (Invitrogen™).

1. Cada reacción se realiza en tubos de PCR que contienen 3 µg de ARN total, 2 µl del oligonucleótido aleatorio (150 ng/µl), 2,5 µl de dNTPs (10 mM), 0,3 µl de spike transcripts a la concentración indicada por el fabricante (Afimetrix®) y hasta 20 µl con H₂O ultrapura libre de *ARNasas* (Sigma-Aldrich®). Se incuban a 65°C durante 5 min y se transfieren a continuación a un recipiente con hielo.

2. Se añade por reacción 1,5 µl *SuperScriptIV*, 6 µl de tampón M-MLV 5X, 3 µl de solución de DTT 100 mM (ditiotreitól) y 1 µl de solución inhibidor de ARNase (40 U/µl; Roche®). Se incuba a 23°C 10 min, 52°C 15 min y mantener a 52°C.

3. Refrescar con 1 µl *SuperScriptIV*, e incubar a 52°C 10 min, y 80°C 10 min.

4. Añadir 10 µl de NaOH 1 N preparado con H₂O ultrapura libre de *ARNasas* y tratado con DEPC. Incubar a 65°C 30 min.

5. Añadir 10 µl de HCl 1 N preparado con H₂O ultrapura libre de *ARNasas* y tratado con DEPC, para la neutralización del pH y 5 µl de ácido acético 3 M pH 5,5 hasta que el indicador de pH del tampón PB torne a amarillo.

6. Al igual que en los productos de PCR (apartado 4.4.10.1), se purifica el ADNc.

7. Con el empleo de oligonucleótidos aleatorios se puede cuantificar la concentración de ADN en el NanoDrop (apartado 4.4.5).

4.4.18. Experimentos con microarrays

Para analizar la expresión génica de forma global en la cepa *B. diazoefficiens* 1255 (ver tabla 4.1) y compararla con la cepa parental, se realizaron experimentos de expresión génica utilizando un microarray customizado de *B. diazoefficiens* GeneChip BJAPETHa520090 (Affymetrix®, Santa Clara, CA; Hauser et al., 2007). Para la hibridación, se empleó ADNc fragmentado y marcado en su región 3'. En las publicaciones de Hauser et al., 2007 y Pessi et al., 2007, así como en los apartados 4.4.4, 4.4.16 y 4.4.17, se describen las condiciones de cultivo, extracción de ARN, tratamiento con *ADNasal* y síntesis de ADNc.

Las reacciones de fragmentación y marcaje terminal en 3' se describen a continuación:

Para fragmentar el ADNc se llevó a cabo en siguiente procedimiento:

1. Preparar la mezcla de reacción con un volumen final de 40 μ l.

- Tampón 10X One Phor-All (Amersham Pharmacia Biotech) \rightarrow 3,8 μ l.

- ADNc \rightarrow x μ l (2-2,2 μ g totales).

- *ADNasal* 0,2 U/ μ l* (Invitrogen Ambion™) \rightarrow 0,22 μ l.

- H₂O libre de nucleasas \rightarrow hasta 40 μ l.

2. Incubar la reacción a 37°C durante 2-3 min** (dependiendo del lote de *ADNasal*).

3. Inactivar la *ADNasal* a 98°C durante 10 min e incubar las muestras en hielo hasta análisis.

4. Verificar que el volumen de la reacción de fragmentación es de 30 μl , si está por debajo completar con H_2O libre de nucleasas.

5. Comprobar el resultado de la fragmentación mediante electroforesis corriendo unos 200 ng en gel de agarosa al 2% en TBE 1X (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 veces en TBE 1X 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 *ADNasal* (0,2 U/ μl) se prepara con 1 μl de la enzima concentrada (2 U/ μl) distribuida por el proveedor, 1 μl de tampón 10X One Phor-All y 8 μl de H_2O libre de nucleasas.

** La eficacia enzimática depende del lote por lo que se recomienda, previa a la realización del experimento, llevar a cabo una cinética de fragmentación a distintos tiempos.

Para hibridar el ADNc fragmentado con los microarrays se requiere marcar el extremo 3' previamente según la siguiente metodología:

- Tampón de reacción de transferasa terminal 5X \rightarrow 10 μl .
- Reactivo de marcaje de ADN GeneChip 5 mM (GeneChip[®] DNA Labeling Reagent; Affymetrix[®]) \rightarrow 3 μl .
- Deoxinucleótido transferasa terminal (Terminal Deoxynucleotido Transferase; Promega) \rightarrow 2 μl .
- ADNc fragmentado \rightarrow x μl (1,85-1,95 μg totales).
- H_2O libre de nucleasas \rightarrow hasta 50 μl .

Seguidamente, incubar la reacción a 37°C durante 75 min. La reacción debe detenerse añadiendo 2 µl de EDTA 0,5 M (Tabla 4.6). En este punto, las muestras estarán listas para su hibridación con el GeneChip BJAPETHa520090 (Affymetrix®, Santa Clara, CA, EE. UU.), pudiéndose hacer de forma inmediata, o ser conservadas a -20°C hasta su uso.

Una vez realizadas la hibridación y lectura de señales en el Centro de Investigación del Cáncer (CIC, Salamanca, España), los datos son normalizados, procesados y analizados según la metodología descrita anteriormente (Pessi et al., 2007; Mesa et al., 2008; Torres et al., 2014). La detección, normalización y análisis de las intensidades de la señal se realizaron con el software Affymetrix Expression Console versión 1.4.1 (Affymetrix®, Santa Clara, CA, Estados Unidos). Para el análisis del transcriptoma y análisis comparativos se utilizó el software Console 3.1 (Affymetrix®, Santa Clara, CA, Estados Unidos). Las intensidades normalizadas (algoritmo MAS 5.0) se compararon entre condiciones mediante un análisis ANOVA (*valor p* de ANOVA < 0,05). Solo los genes que pasaron las pruebas estadísticas y donde el cambio en la expresión (medido como *n*-fold change [FC]) fue ≥ 2 o ≤ -2 en las comparaciones entre la cepa parnetal y la cepa *B. diazoefficiens* 1255, se consideraron expresados diferencialmente. La predicción de operones tiene lugar como se describe en publicaciones anteriores (Hauser et al., 2007; Mesa et al., 2008).

4.5. Sobre-expresión y purificación de proteínas

4.5.1. Sobre-expresión y purificación de la proteína FixK₂ mediante el empleo del sistema IMPACT (Intein-Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag)

Los diferentes derivados de la proteína FixK₂ empleada en el desarrollo de esta tesis doctoral se sobre-expresó como proteína recombinante FixK₂-Mxe-Inteína-dominio de unión a quitina (CBD) en células de la cepa de *E. coli* ER2566. Con objeto de determinar las condiciones de máxima expresión se procedió con la metodología que se detalla a continuación:

1. Se transforman células competentes de *E. coli* ER2566 (consúltese tabla 4.1 y apartado 4.4.13) con los plásmidos adecuados (consúltese apartados “capítulo 1” y 5.2.3.1.1). Se siembran 100 µl en una placa de LB con Ap, y el resto de la transformación es utilizada para inocular un matraz con 20 ml de LB suplementado con el mismo antibiótico y se incuba durante toda la noche a 37°C.

2. Al cultivo de 20 ml se le mide la DO600 de una dilución 1/10 del mismo y posteriormente se transfiere el cultivo a un tubo de centrífuga de 50 ml. Seguidamente, se realizan 4 ciclos de lavado con medio LB sin antibióticos. A continuación, el sedimento es resuspendido en 2,5 ml de LB y 2,5 ml de glicerol 100% estéril para la conservación de las células a -20°C.

3. Se alícuota la cantidad necesaria para inocular cultivos de 20 y 500 ml de LB a una DO600 inicial de 0,02.

4. En dos matraces de 20 ml se cultivan las células a una DO600 inicial de 0,02, y se dejan crecer a 37°C hasta alcanzada

una DO600 de 0,3 aproximadamente. Seguidamente, se incuban a 30°C durante 60 min hasta alcanzar una DO600 de 0,6-0,8.

5. Tras tomar alícuotas de 1 ml, se añade a los matraces IPTG (Tabla 4.6) a una concentración final de 0,1 mM. Transcurridas 2 h tras añadir el IPTG se vuelven a tomar alícuotas de 1 ml para un análisis posterior en un gel de PAGE-SDS (apartado 4.3.5). Las alícuotas se centrifugan a 13.000 rpm durante 1 min, se elimina el sobrenadante y se conservan a -20°C.

6. El resto del cultivo de cada matraz (aproximadamente 17 ml) se centrifuga 7 min a 5.500 × *g* y el sedimento es lavado con column buffer (Tabla 4.6). A continuación, en 2 ml de column buffer se resuspende el sedimento con objeto de realizar una prueba de solubilidad. Para ello, se procede a la rotura celular aplicando una presión constante de 120 Mpa con una prensa de French® (SLM Aminco). El proceso se repite 3 veces, y se centrifuga 10 min a 8.000 × *g* a 4°C. Por último, se analizan fracciones de la parte soluble y del sedimento en un gel de PAGE-SDS.

Tras establecer las condiciones de máxima expresión y solubilidad, la proteína se purifica utilizando el sistema IMPACT a partir de cultivos de mayor volumen según se detalla en el protocolo que se describe a continuación.

4.5.1.1. Inducción de las células para la purificación a escala media

1. En un matraz de 2 litros se inoculan 500 ml de medio LB a una DO600 inicial de 0,02, se incuban a 37°C y 170 rpm hasta alcanzar una DO600 de 0,3. A continuación, se incuban a 30°C durante aproximadamente 1 h.

2. Una vez alcanzados unos valores de DO600 de 0,6-0,8 se induce la expresión de la proteína mediante la adición de 0,1 mM de IPTG (Tabla 4.6) y se incuba toda la noche a 16°C.

3. Se centrifuga 7 min a 5.500 × *g* y se lava el sedimento con column buffer (Tabla 4.6). Llegados a este punto, se pueden conservar los sedimentos a -20°C o realizar la purificación.

4.5.1.2. Fraccionamiento celular

1. Las células procedentes de 500 ml de cultivo se resuspenden en 5 ml de column buffer (Tabla 4.6) suplementado con *ADNasa* (20 µg/ml) y 5 µl AESBF (4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride) 100 mM.

2. Se realiza una rotura celular aplicando una presión constante de 120 Mpa con una prensa de French® (SLM Aminco), repitiendo el proceso 3 veces.

3. Con objeto de eliminar las células que no se han roto, se centrifuga 10 min a 8.000 × *g*, 4°C, y el sobrenadante obtenido se centrifuga nuevamente a igualdad de condiciones durante 60 min.

4.5.1.3. Cromatografía de afinidad (Sistema IMPACT)

1. El sobrenadante se lleva a 50 ml diluyendo con column buffer (Tabla 4.6).

2. Antes de la carga de la muestra, es necesario preparar la columna según el siguiente procedimiento:

a. A la columna cromatográfica vacía, se le añade 10 ml de resina de quitina al 50% en etanol (Chitin resin; New England Biolabs®), quedando con un volumen de 5 ml de resina.

b. La columna se lavará con 5 volúmenes de columna (V) de H₂O y se equilibrará con otros 5 V de column buffer (Tabla 4.6).

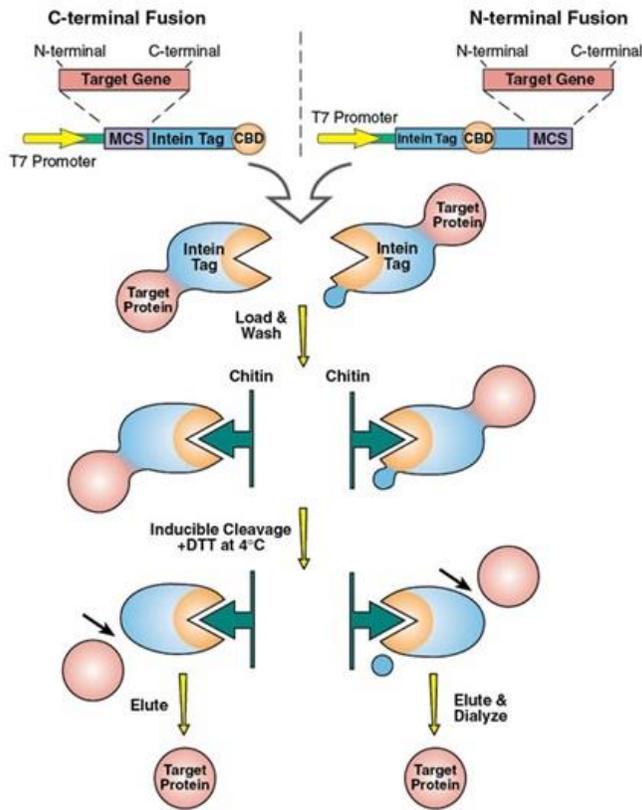


Figura 4.5.1. Sistema IMPACT. Representación esquemática del sistema IMPACT mediante el cual se procede a la purificación de la proteína recombinante FixK₂ sin etiqueta. Imagen obtenida de New England Biolabs (<https://international.neb.com/applications/protein-purification/affinity-purification-and-expression-tags/impact-affinity-tag>).

3. El sobrenadante diluido se carga en la columna con un flujo de 0,5-1 ml por min, haciéndolo pasar al menos 5 veces por la columna.

4. Se lava la columna con 20 V de column buffer (Tabla 4.6).

5. Para escindir la quitina se añaden 3 V de tampón de escisión (column buffer con 50 mM de DTT (Ditiotreitol)), dejándolo fluir hasta que quede 1 ml por encima de la resina. En este punto se cierra el flujo, se tapa la columna y se incuba durante 16 h a temperatura ambiente.

6. Pasadas las 16h, se procede a la apertura de la columna para eluir la proteína (Figura 4.5.1) con 4 V de column buffer (Tabla 4.6), en alícuotas de 0,5 ml. A continuación, se podrá realizar el intercambio de tampón mediante filtración en gel (apartado 4.5.2), o congelarlas en nitrógeno líquido y conservar a -80°C.

4.5.1.4. Regeneración de la columna

Las columnas de quitina pueden ser reutilizadas 4-5 veces para una misma proteína. Para ello, tras la purificación debe ser regenerada, siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

1. Lavar con 10 ml de column buffer (Tabla 4.6), añadiendo SDS al 1%.

2. Lavar con 10 ml de column buffer (Tabla 4.6), a pH 12.

3. Regenerar con 50 ml de NaOH 0,3 M, dejando actuar los primeros 15 ml durante 30 min con tapón cerrado.

4. Lavar con 100 ml de H₂O.

5. Lavar con 15 ml de etanol 20%.

6. La columna se conserva a 4°C con etanol 20%.

4.5.2. Filtración en gel (Columnas PD-10)

Con el propósito de intercambiar el tampón de las proteínas purificadas, para eliminar el exceso de sales se empleó la técnica de cromatografía líquida de exclusión molecular. Este método consiste en pasar la muestra por una columna que contiene una matriz de dextrano, con un tamaño de poro que permite que las moléculas de mayor tamaño fluyan a mayor velocidad entre los huecos de la matriz, y que las de menor tamaño sean retenidas o ralentizadas al pasar por poros más pequeños formados por el polímero de dextrano. Se utilizaron las columnas comerciales PD-10 (GE Healthcare), 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. Las indicaciones proporcionadas con las columnas recomiendan el siguiente procedimiento:

1. Cortar el extremo de la punta de la columna y retirar la tapa superior, fijar la columna en un soporte y dejar que gotee el líquido que viene en la columna para mantener la matriz hidratada.
2. Añadir 25 ml del tampón de elución con el que deseemos intercambiar la muestra, en nuestro caso happy buffer (Tabla 4.6) para equilibrar la columna.
3. Añadir un máximo de 2,5 ml de muestra y dejar eluir hasta su absorción completa.
4. Añadir, en 12 fracciones de 0,5 ml, 6 ml de tampón de elución, recogiendo cada alícuota de 0,5 ml en tubos independientes de micrófuga, donde eluye la proteína con el nuevo tampón.

5. Posteriormente, se mide la concentración proteica de cada fracción (ver apartado 4.3.2), seleccionando aquellas que presentan mayor concentración para experimentos posteriores.

Dado que la columna puede reutilizarse para una misma proteína, se puede proceder a su reconstitución, haciendo pasar a través de la misma 20 ml de H₂O_d, y a continuación 20 ml de etanol 20%. Por ultimo cerrar la columna con etanol 20% y conservar a 4°C.

4.6. Ensayos de transcripción e interacción Proteína-ADN

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

La técnica de transcripción *in vitro*, se utilizó para analizar en cada uno de los derivados de la proteína FixK₂ recombinante purificada, la capacidad de transcribir la diana del operón *fixNOQP*. Con esta técnica, se analiza la transcripción desde la región promotora genuina del gen en estudio. Para este ensayo se necesita UTP marcado radiactivamente con α -³²P, ADN molde libre de ARNasas, proteína FixK₂ purificada y ARN polimerasa de *B. diazoefficiens*.

4.6.1.1. Preparación de ADN molde

Como ADN molde se ha usado el plásmido pRJ8816 que alberga el promotor del operón *fixNOQP* (Mesa et al., 2005), que en ensayos de IVT da lugar a un transcrito dependiente de FixK₂ de 243 nucleótidos en presencia de ARN polimerasa de *B. diazoefficiens*, y un transcrito de 107 nucleótidos independiente a la presencia de la proteína FixK₂.

Para la preparación de las muestras, se aisló ADN del plásmido pRJ8816 mediante el empleo de Midipreps (apartado 4.4.2.2.2) y a continuación, para eliminar una posible contaminación por

ARNasas que pudieran interferir en la reacción de transcripción, se preparó el ADN según se especifica en el siguiente protocolo:

1. Tomar 1 µg de ADN y completar hasta un volumen de 500 µl con H₂O ultrapura (Sigma-Aldrich®).

2. Adicionar 500 µl de biofenol y agitar en vórtex 5 min.

3. Centrifugar 14.000 rpm, 10 min, 4°C y pasar la fase acuosa a un nuevo tubo de microcentrífuga.

4. Añadir 1 V de cloroformo (450 µl) y agitar en vórtex 5 min.

5. Centrifugar a 14.000 rpm, 10 min, 4°C y transferir a un nuevo tubo de microcentrífuga la fase acuosa superior.

6. Añadir 2,5 V (1 ml) de etanol 100% frío. Añadir también 1/10 V (40 µl) de acetato sódico 3 M, pH 5,2 invirtiendo el tubo tres veces.

7. Incubar a -20°C durante una noche o a -80°C durante 1h para precipitar el ADN.

8. Seguidamente, centrifugar el tubo durante 1 h a 14.000 rpm, 4°C.

9. Tras la centrifugación, se retira el etanol y se lava el sedimento con etanol 70%, sin resuspenderlo.

10. Centrifugar 10 min, 14.000 rpm, 4°C y retirar completamente el etanol con cuidado con ayuda de una pipeta.

11. Dejar secar el sedimento 20-30 min a temperatura ambiente.

12. Resuspender en 20 µl de H₂O ultrapura. Para terminar, se cuantifica la concentración de ADN (apartado 4.4.5) con el NanoDrop.

El ARN puede degradarse por ARNasas durante el ensayo de IVT, por este motivo se utiliza material de vidrio esterilizado en horno Pasteur a 180°C. Los tubos de centrifuga se adquieren libres de ARNasas. Por otra parte, el material de plástico es autoclavado cubierto por papel de aluminio para reducir la posibilidad de contaminación. Los reactivos (etanol, cloroformo, biofenol) se destinan de forma específica para este ensayo y en caso de ser soluciones acuosas son tratadas con H₂O DEPC o se realizan diluciones en H₂O libre de ARNasas (Sigma-Aldrich®).

4.6.1.2. Reacción de transcripción

Para realizar una reacción de transcripción es necesario mezclar en un tubo de centrifuga los siguientes reactivos:

- Tampón de IVT 5X (Tabla 4.6) → 4 µl.
- ARN polimerasa de *B. diazoefficiens* → 1,5 µg totales en la reacción.
- Inhibidor de ARNasas (40 U/µl) → 0,5 µl.
- ADN circular (≈700 ng/ul) → 1 µl.
- NTPs (ATP, GPT, CTP y UTP, 10 mM cada uno) → 2 µl.
- Proteína purificada FixK₂ → x µl (0,25, 0,5, 1,25 y 2,5 µM).
- *UTP α⁻³²P [*Uridine 5'-triphosphate*, [α⁻³²P]-50 mM Tricine (pH 7,6) *Shipped in lead Shipped on dry ice*. 800Ci (29,6 TBq)/mmol ; PerkinElmer®](10 µCi/µl) → 0,1 µl.
- H₂O libre de ARNasas (Sigma-Aldrich®) → hasta 20 µl.

* UTP α⁻³²P debe añadirse a la reacción en el laboratorio de radiactividad, en el cual se realizarán el resto de pasos a partir de esta fase.

Tras mezclar todos los reactivos, el procedimiento continúa de la siguiente forma:

1. Incubar la reacción durante 30 min a 37°C. Posterior a la incubación parar la reacción poniendo las muestras en hielo.

2. Añadir 180 µl de H₂O libre de ARNasas (Sigma-Aldrich®), 20 µl de acetato potásico 3M pH 5,2, 200 µl de biofenol y mezclar por inversión manualmente.

3. Seguidamente, centrifugar durante 5 min a 12.000 rpm. Recoger la fase superior acuosa y añadir a un tubo de centrifuga que contiene 500 µl de etanol 100% frío.

4. Precipitar el ARN a -20°C durante al menos una noche. A continuación, centrifugar durante 1 h a 13.000 rpm y eliminar el sobrenadante.

5. Lavar el sedimento con etanol al 70% (200 µl), centrifugar 10 min, 14.000 rpm, 4°C y retirar nuevamente el etanol.

6. Secar 20-30 min a temperatura ambiente y resuspender el sedimento en 8 µl de solución Sanger (Tabla 4.6). Calentar la resuspensión a 90°C durante 2 min.

7. Cargar en un gel de secuenciación 4 µl de la muestra (apartado 4.6.1.4). Preservar otros 4 µl para repetir el gel si fuera necesario, o emplearlos para comparar muestras en otro gel.

4.6.1.3. Marcadores de ARN

La generación de marcadores de tamaño se realiza utilizando fragmentos de ADN lineales que den lugar a transcritos de longitud conocida:

- *ADN lineal (≈700 ng/ul) → 1 µl.

- Tampón de IVT 5X (Tabla 4.6) → 4 µl.
- Inhibidor de ARNasa (40 U/ µl) → 0,5 µl.
- NTPs (ATP, GTP, CTP, 10 mM cada uno) → 1 µl.
- UTP 100 µM → 2,4 µl.
- ARN polimerasa del fago T3 (100 nM; Thermo Fisher Scientific®) → 3 µl.
- **UTP α -³²P [*Uridine 5'-triphosphate*, [α -³²P]-50 mM *Tricine* (pH 7,6) *Shipped in lead Shipped on dry ice*. 800Ci (29,6 TBq)/mmol (PerkinElmer®) (10 µCi/µl)] → 1 µl.
- H₂O libre de ARNasa (Sigma-Aldrich®) → hasta 20 µl.

* El ADN lineal procede del plásmido pRJ8816, digerido con las enzimas *Bst*XI y *Bgl*II, respectivamente, obteniendo fragmentos de 286 y 180 nucleótidos destinados como marcadores moleculares.

** UTP α -³²P debe añadirse a la reacción en el laboratorio de radiactividad, en el cual se realizarán el resto de pasos a partir de esta fase.

Tras la reacción de IVT, el procesado de las muestras es similar a lo indicado en el apartado anterior, a excepción de que los sedimentos se resuspenden de forma individual en 100 µl de solución Sanger y se cargan 3 µl en el gel. Pueden conservarse a durante 3 meses a -20°C.

4.6.1.4. Electroforesis en gel de secuenciación urea/acrilamida

Para detectar los transcritos de ARN generados en reacciones de IVT se realiza una electroforesis en geles desnaturizantes de poli(acrilamida) al 6% y urea 7 M en TBE 1X. Para tal fin se sigue el protocolo detallado a continuación.

1. Preparar la mezcla del gel, con: 75 g de urea, 22,5 ml de una mezcla de acrilamida:bisacrilamida 40% (19:1; VWR), 15 ml de TBE 10X (Tabla 4.6) y completar con H₂O-DEPC (Tabla 4.6) hasta 150 ml.

2. Disolver la urea y la acrilamida en un baño a 37°C, en agitación. La solución es filtrada al vacío utilizando filtros Stericup[®] (Millipore[®]) y almacenada a 4°C para su uso posterior. Tomar 40 ml de la mezcla del gel, y previo a verter entre los cristales, añadir APS elaborado en fresco (400 µl; Tabla 4.6) y TEMED 6 M (40 µl).

3. Para la elaboración del gel se necesitan dos cristales tratados con xileno por la cara en contacto con el gel. Deben limpiarse meticulosamente con alcohol y ser colocados en contacto por la cara xilenizada, dejando entre ellos un espacio generado por unos separadores de plástico. Fijar ambos cristales con pinzas y colocar en un soporte en un ángulo de 20°. Verter la mezcla del gel y por último colocar el peine entre ambos en la parte superior, para dar lugar a la generación de los pocillos.

4. Tras la polimerización del gel, previamente a la carga de muestras, debe ser calentado. Para tal fin se hace pasar corriente eléctrica (40 V) durante 1 h, en tampón TBE 0,5X.

5. Una vez que el gel alcanza 50°C de temperatura, detectable por un indicador de temperatura que porta uno de los cristales, limpiar los pocillos con una jeringa que contenga TBE 0,5X, para eliminar la urea. A continuación, cargar muestras y marcadores. Aplicar la misma corriente a la empleada en la etapa anterior y dejar correr por 2 h. Pasado ese tiempo el azul de bromofenol de la solución Sanger llega a la parte final del gel.

6. Al finalizar la electroforesis, separar los cristales y transferir el gel a una lámina de papel Whatman[®] 3MM. Cubrir con un papel

film y secar durante 2 h a 80°C en un secador de geles conectado a una bomba de vacío.

7. Para terminar, colocar el gel seco en contacto con una placa amplificadora Phosphor-Screen GP de 35 X 43 cm de Molecular Dynamics. La placa deberá haber sido neutralizada con luz durante 15 min.

8. Transcurrido un mínimo de 24 h de exposición, la placa se revela mediante un equipo Phospho-Imager (Molecular Dynamics), para detectar las señales radiográficas.

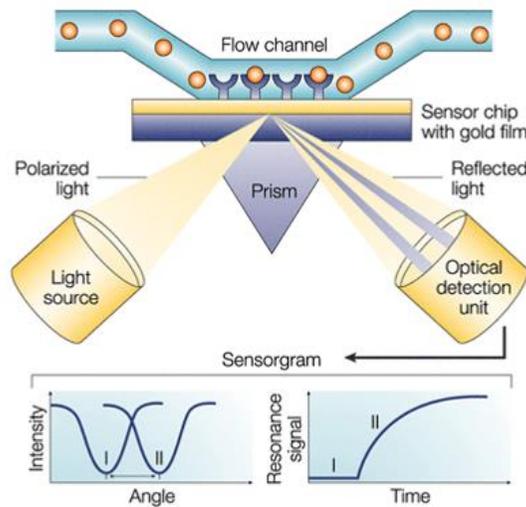
4.6.2. Resonancia de plasmón de superficie (Biacore)

Los ensayos de unión de proteína FixK₂ purificada a la caja genuina FixK₂ presente en la región promotora del operón *fixNOQP*, se han llevado a cabo mediante la técnica de resonancia de plasmón de superficie (RPS) en un Biosensor Biacore™ X100 (GE Healthcare). Estos ensayos precisan del empleo de un chip con matriz de dextrano carboximetilado con estreptavidina (SA), que permite la inmovilización de ADN de doble cadena biotinilado. La técnica y los análisis de los datos crudos se han llevado a cabo en el Servicio de Proteómica y Bioquímica del Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD), Sevilla, España.

La técnica se basa en la interacción de un analito, en nuestro caso diferentes derivados de la proteína FixK₂, con un ligando fijado en el chip, provocando cambios en la resonancia de plasmón de superficie de la lámina de oro inferior del chip, cuantificada como el cambio en el ángulo de la difracción de un haz de luz reflejado en la lámina de oro (Figura 4.6.1).

Antes de llevar a cabo la técnica se necesitan diversas soluciones, que deben ser filtradas y desgaseadas previo a su uso.

A parte de la proteína FixK₂ purificada (analito; apartado 4.5.1), se necesitan sintetizar las regiones promotoras de doble cadena de ADN biotiniladas (ligando). Para ello, deben anillarse oligonucleótidos complementarios de unas 30 pb suministrados por la casa comercial Sigma-Aldrich® (secuencias de oligonucleótidos en la Tabla 4.3), considerando que el oligonucleótido reverso (Rev) es el marcado con biotina (Biot) en su región 5', quedando en el centro del oligonucleótido la caja FixK₂ de interés (*fixNOQP*).



Nature Reviews | Drug Discovery

Figura 4.6.1. Esquema gráfico de la configuración de un biosensor SPR. El sistema SPR detecta cambios en el índice de refracción en las inmediaciones de la capa superficial del chip sensor. El ángulo de refracción dependerá de la masa de material en la superficie., cambiando (de I a II en el diagrama inferior izquierdo) cuando las biomoléculas se unen a la superficie y cambian la masa de la capa superficial. Este cambio en el ángulo de resonancia se puede controlar de forma no invasiva en tiempo real como un gráfico de la señal de resonancia (proporcional al cambio de masa) frente al tiempo.

El anillamiento de oligonucleótidos se realiza según la metodología que se detalla a continuación:

1. Los oligonucleótidos For y Rev resuspendidos en tampón de inmovilización (Tabla 4.6) a una concentración de 100 μ M se mezclan en una proporción 10:1 (For:Rev-Biot), siendo la concentración final del oligonucleótido biotinilado 10 μ M.

2. La mezcla es calentada a 100°C 10 min y se deja enfriar a temperatura ambiente hasta alcanzar 25°C de temperatura.

Posteriormente, se realiza la inmovilización del promotor biotinilado de doble cadena en el chip según se describe a continuación:

- Se diluye en tampón de inmovilización (Tabla 4.6) a una concentración final de 1 nM.

- Se realizan tres lavados del chip con tampón de acondicionamiento (Tabla 4.6), durante 60 s a un flujo de 10 μ L/min, seguido de la inyección de DNA hasta alcanzar unas 50 RU de inmovilización sólo en la célula 2.

- Seguidamente se realizó un lavado extra con tampón de lavado (Tabla 4.6).

Con este protocolo se inmovilizaron finalmente 63 RU de ADN, esperando obtener una R_{max} de 177.

Finalizada la fijación del ligando, se realizan los experimentos de interacción de la proteína FixK₂ (analito) con el promotor de *fixNOQP* (ligando) en tampón de desarrollo Biacore (Tabla 4.6). Para ello, la proteína FixK₂ es inyectada en ambas células con un flujo de 40 μ l/min y 120 s de contacto, seguidos de 120 s de disociación, a una temperatura constante de 25°C. El analito se diluye en tampón de desarrollo Biacore (Tabla 4.6) a concentraciones variables en función del derivado de FixK₂ en

estudio, aunque el rango de concentraciones siempre se mueve entre 62,5 y 1,8 nM, inyectando aleatoriamente, con al menos un duplicado a baja concentración después de uno a concentración elevada.

Para regenerar la superficie del chip se realizan inyecciones de SDS al 0,2% a 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ durante 30 s. Cada ensayo cinético se repite al menos tres veces.

Los datos de interacción se analizan mediante el software de Evaluación Biacore™ X100 (GE Healthcare). Las constantes cinéticas (K_a , K_d , KD) se calculan, siempre que sea 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 es verificado por chi cuadrado (χ^2) y para el control de calidad de cada ensayo se requirieron los siguientes parámetros: transferencia de masa (t) $>10^8$, porcentaje de $\chi^2/R_{\text{max}} < 5\%$ y U-valor <25 . En los casos en que 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.

4.6.3. Ensayo de cambio en la corrida electroforética (EMSA)

El ensayo de cambio en la corrida electroforética o EMSA (electrophoretic mobility shift assay) es una técnica que se utilizó

con el fin de investigar el grado de interacción y estabilidad existente entre los derivados de C183S-FixK₂ (proteína parental) y C183D-FixK₂ con ADN. Dependiendo del grado de migración en el carril del gel electroforético, se puede determinar si existe o no interacción, dado que un fragmento de ADN interaccionando con proteínas tiende a recorrer menos distancia a través del gel en el mismo tiempo. Esta técnica está basada en los trabajos de Garner y Revzin, 1981, y Fried y Crothers, 1981.

Para llevar a cabo la técnica, se emplearon 15 µl de reacciones que contenían 10 ng de fragmento de PCR purificado de 90 pb que abarca la región promotora del operón *fixNOQP* (Tabla 4.3), y diferentes concentraciones de proteína, de 0 a 12 µM, en tampón IVT modificado (Tabla 4.6). La reacción se incubó durante 30 min a temperatura ambiente, y a continuación, se mezclaron con un sexto volumen de tampón de carga EMSA (Tabla 4.6) y se cargaron en un gel de poliacrilamida al 6 % no desnaturizante 0,5X Tris-borato EDTA (TBE). Tras realizar una electroforesis durante 40 min a 180 V, los geles se incubaron en una solución 1X SYBR™ Gold (Invitrogen™, Waltham, MA, EE. UU.) en 0,5X TBE durante 30 min. Finalmente, las señales inducidas por UV fueron detectadas por un sistema Gel Doc XR+ (Bio-Rad®, California, CA, EE. UU.) y cuantificadas con el software Quantity One® e Image Lab™ (Bio-Rad®, California, CA, EE. UU.).

4.7. Caracterización molecular *in silico* de la proteína FixK₂

4.7.1. Análisis de las relaciones intra-intermoleculares en la proteína FixK₂

Con objeto de analizar tanto el número como el tipo de interacciones existentes entre residuos de un mismo monómero (intramolecular) o entre monómeros enfrentados de un dímero (intermolecular), se

llevó a cabo un estudio *in silico* mediante el empleo de diversas herramientas bioinformáticas.

En primer lugar, las estructuras proteicas a analizar son descargadas de la base de datos Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>), para posteriormente ser analizadas meticulosamente con el software PyMOL® (PyMOL Molecular Graphics System 2.2.3). En esta etapa, se estudia la naturaleza química de los residuos proteicos en estudio, así como las posiciones espaciales dentro de la estructura, gracias a la interfaz gráfica del programa. Posteriormente, una vez seleccionados los residuos aminoacídicos de interés, la estructura proteica es cargada en el programa bioinformático BIOVIA Discovery Studio Visualizer® (v20.1.0.19295). Con este software, se pueden analizar las interacciones existentes entre aminoácidos, y también modelizar nuevos derivados proteicos con mutaciones en lugares de interés. Así mismo, el sistema permite seleccionar los dominios de la estructura a analizar, añadiendo u omitiendo secciones de interés, como por ejemplo proteína en complejo con ADN, dímero, monómero, fragmentos, etc. (Figura 4.7.1, paneles A, B, C y D respectivamente). A continuación, el programa es configurado para cuantificar interacciones intramoleculares e intermoleculares. En ambos casos se analiza la tipología química de enlace (puente de hidrógeno, electrostático, hidrofóbico, entre otros), tanto para interacciones favorables, desfavorables o insatisfechas (para más información consúltese: <https://www.3ds.com/products-services/biovia/products/molecular-modeling-simulation/biovia-discovery-studio/>).

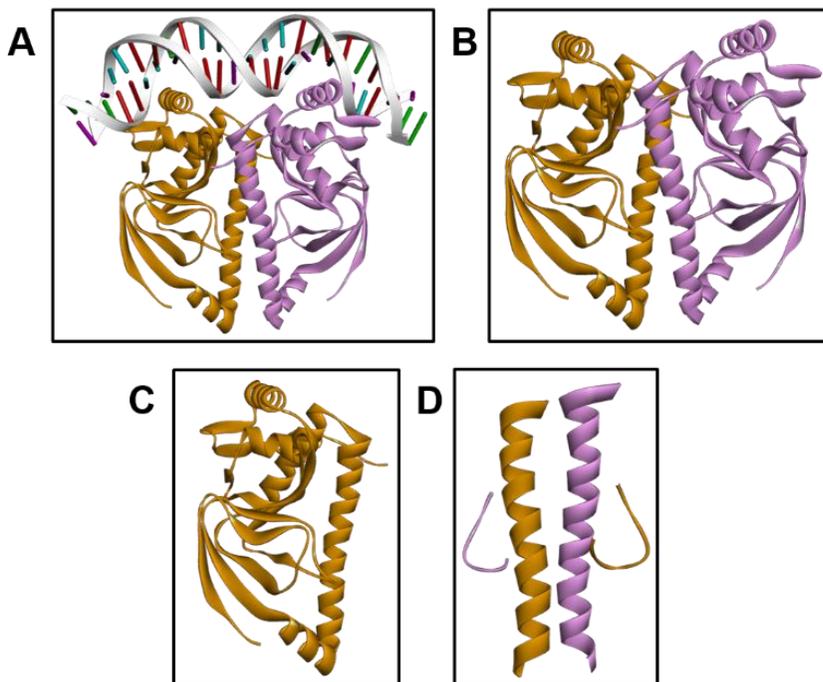


Figura 4.7.1. Selección de dominios de interés de la proteína FixK₂ para el estudio de sus interacciones moleculares. Las imágenes muestran la selección de dominios de la proteína FixK₂ utilizada en este trabajo, para el análisis de interacciones moleculares entre residuos estructurales. Proteína FixK₂ en complejo con ADN (A), proteína FixK₂ sin ADN (B), monómero de FixK₂ (C), fragmentos correspondientes a la hélice de dimerización de FixK₂ (D). Monómero A en color naranja. Monómero B en color magenta. Estructura descargada de Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/structure/4i2o>). Modelización y análisis realizado mediante el software BIOVIA Discovery Studio Visualizer® (v20.1.0.19295).

Una vez realizado el análisis, el sistema permite visualizar gráficamente las relaciones químicas presentes a todos los niveles y, además, proporciona datos cuantitativos referidos a las

interacciones entre residuos e incluso átomos (distancia, direccionalidad de enlace, tipología, átomo donador, átomo aceptor, ángulos, etc.).

En una última etapa, los datos proporcionados por el sistema son cuidadosamente analizados, con la finalidad de estudiar la relevancia de cada residuo objeto de estudio en las interacciones globales de la estructura, así como las variaciones resultantes como consecuencia del intercambio de aminoácidos (mutaciones) en posiciones de interés. Finalmente, se elaboran manualmente tablas comparativas de derivados, en las que se cuantifican y describen las diferencias en las relaciones químicas intramoleculares e intermoleculares, entre el conjunto de residuos estudiados, lo que permite una visión detallada de las consecuencias de una mutación determinada en la estructura de la proteína.

4.7.2. Modelización molecular proteína-ligando

4.7.2.1. Puesta a punto de la estructura cristalina de FixK₂

La estructura secundaria de la proteína FixK₂ en complejo con ADN (Bonnete et al., 2013a) fue descargada de la base de datos Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>; ID:4i2o), la cual fue procesada con el software MOE® (Molecular Operating Environment 2016) con objeto de proporcionar un sentido físico como consecuencia de las moléculas presentes en la red cristalina, pH del entorno, resultado de la técnica empleada para su cristalización (difracción de rayos X) y análisis estructural (Figura 4.3.1).



Figura 4.3.1. Estructura secundaria de FixK₂. FixK₂ en complejo con ADN visualizada con PyMOL® (PyMOL Molecular Graphics System 2.2.3) para su análisis estructural con MOE® (Molecular Operating Environment 2016), obtenida mediante difracción de rayos X (Bonnete et al., 2013a). Ambos monómeros del complejo se visualizan en verde. ADN en parte superior de la imagen.

4.7.2.2. Obtención de puntos farmacofóricos mediante pyMDMix

El lanzamiento con pyMDMix (Python 2.7.3 version) se realizó según el protocolo estándar disponible en el grupo del Dr. Xavier Barril (Grupo de Biología Computacional y Diseño de Fármacos, Universidad de Barcelona; <http://www.ub.edu/bl/>), llevándose a cabo mediante simulaciones independientes de interacción entre la proteína y moléculas de agua, etanol y acetato de amonio respectivamente (Figura 4.3.2). Se descargaron las librerías requeridas por el sistema y la proteína fue procesada mediante dos supercomputadoras (Barcelona Supercomputing Center, BSC). Se

realizó un primer procesado con moléculas de agua y etanol, y en paralelo con otro supercomputador se procesaron las moléculas de acetato de amonio. Ambos procesos se realizaron con una monitorización constante de los parámetros temperatura-presión según protocolo.

Una vez alineadas las trayectorias de cada uno de los solventes, se obtuvieron las afinidades existentes en diferentes regiones de la proteína, definiéndose así, los puntos farmacofóricos polares, apolares, aniónicos y catiónicos, esenciales para hallar los posibles lugares de interacción proteína-ligando que resultan en un complejo estable.

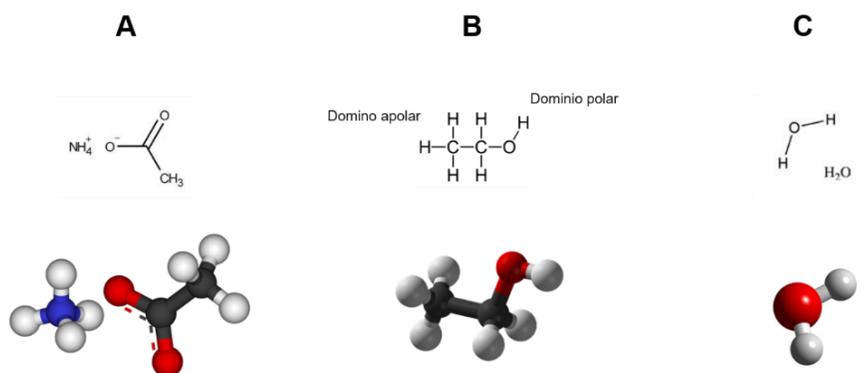


Figura 4.3.2. Solventes utilizados para la obtención de puntos farmacofóricos. Solventes utilizados durante el lanzamiento con pyMDMix (Python 2.7.3 version) mediante simulaciones independientes para la obtención de puntos farmacofóricos en la estructura de FixK₂. Iones de acetato de amonio con polos eléctricos positivo y negativo para la detección de puntos farmacofóricos aniónicos y catiónicos (A). Moléculas de etanol para definir zonas polares y apolares (B). Moléculas de agua como control de solvatación (C).

4.7.2.3. Acoplamiento de alto rendimiento y detección virtual con rDock®

En modelado molecular, es un método que predice la conformación preferida de una molécula al unirse a otra para formar un complejo estable. La orientación puede ser usada para predecir la fuerza de asociación o la afinidad de enlace (funciones de puntuación o *scoring*).

Cuando ligando y proteína ajustan su conformación para lograr el mejor acople se conoce como encaje inducido.

Son necesarias tres etapas: (1) Definición del sistema; (2) Generación de la cavidad y (3) *Docking*.

4.7.2.3.1. Definición del sistema

Con objeto de definir los parámetros de restricción de archivos de entrada del receptor, solventes, ligandos, y términos de restricción externa que se agregarán a la función de puntuación total (por ejemplo, restricción de cavidad y restricción farmacofórica), se procedió conforme a las indicaciones descritas según el protocolo habitual rDock® (<http://rdock.sourceforge.net/>; versión LGPLv3).

4.7.2.3.2. Generación de la cavidad

Para la definición de la cavidad fue utilizado el método “ligando de referencia” según las indicaciones del protocolo standard rDock® (<http://rdock.sourceforge.net/>; versión LGPLv3). El método del ligando de referencia proporciona una opción mucho más fácil para definir un volumen de acoplamiento de un tamaño dado alrededor del modo de unión de un ligando conocido, y es particularmente apropiado para experimentos de validación automatizados a gran escala. Una vez asignada una cavidad, se definieron los puntos farmacofóricos de interés tal como se ha descrito anteriormente.

4.7.2.3.3. Acoplamiento dinámico o *Docking* y procesado bioinformático de ligandos

La realización del *docking* se llevó a cabo según el modelo “acoplamiento restringido por farmacóforo” definido en el protocolo habitual rDock® (<http://rdock.sourceforge.net/>; versión LGPLv3). En este modelo las posiciones de cada ligando están sesgadas para ajustarse a los puntos farmacóforos definidos por el usuario. Dicho sesgo se introduce mediante el uso de una restricción de penalización externa, que penaliza las posturas de acoplamiento que no coinciden con las restricciones del farmacóforo.

Los paquetes de ligandos fueron descargados de las bases de datos de dominio público PMN (Plant Metabolic Network; <https://plantcyc.org/>) y MetaCyc Metabolic Pathway Database (<https://metacyc.org/>), con un total de 51.000 moléculas procedentes de plantas de Soja, Rizobios y otros procariotas. Cada metabolito fue filtrado mediante rDock® (<http://rdock.sourceforge.net/>; LGPLv3 version) según el protocolo descrito en el paso anterior, analizando un total de 50 posiciones posibles dentro de la cavidad y seleccionando las posiciones con mejor puntuación “InterScore”*, “IntraScore**” y “ScoreRestr***”.

* InterScore: es el principal término de interés en rDock® (<http://rdock.sourceforge.net/>; LGPLv3 version), ya que representa la puntuación de interacción proteína-ligando (o ARN-ligando).

$$S^{inter} = W_{vdw}^{inter} \cdot S_{vdw}^{inter} + W_{polar}^{inter} \cdot S_{polar}^{inter} + W_{repul}^{inter} \cdot S_{repul}^{inter} + W_{arom}^{inter} \cdot S_{arom}^{inter} + W_{solv} \cdot S_{solv} + W_{rot} \cdot N_{rot} + W_{const}$$

**IntraScore: representa la energía relativa de la conformación del ligando y el ajuste espacial a la conformación de la cavidad.

$$S^{intra} = W_{vdw}^{intra} \cdot S_{vdw}^{intra} + W_{polar}^{intra} \cdot S_{polar}^{intra} + W_{repul}^{intra} \cdot S_{repul}^{intra} + W_{dihedral}^{intra} \cdot S_{dihedral}^{intra}$$

*** ScoreRestr: sanciones por restricción externa. Espacio del metabolito ocupado en la cavidad (mejor cuanto más se ajuste a 0).

4.7.2.4. Desacoplamiento dinámico, *Dynamic Undocking* o *Duck*

El desacoplamiento dinámico o *DUck* (Ruiz-Carmona et al., 2017), requirió de soportes informáticos (software y hardware) específicos, tal como un entorno operativo molecular MOE® (Molecular Operating Environment 2016), paquete de dinámica molecular AMBER (Amber y AmberTools, versión 16), visor molecular PyMOL® (PyMOL Molecular Graphics System 2.2.3), software "R" (<https://www.r-project.org/>) y scripts públicos de *DUck*. También se utilizó Linux o MAC como sistemas operativos para preparaciones de *DUck*, además de un sistema operativo basado en Linux para la paralelización y GPUs en simulaciones MD (*DUck* es compatible con los sistemas de colas SGE y SLURM). El análisis mediante *Dynamic Undocking*, permite analizar la energía necesaria para romper la interacción proteína-ligando (W_{QB} , trabajo necesario para romper un contacto nativo clave, alcanzando un estado cuasi ligado) de cada uno de los candidatos seleccionados.

Para ello se precisa la identificación del átomo con el cual se establece el principal enlace de hidrógeno con el ligando, por ello el átomo de referencia debe poder interactuar de esta manera con todos los ligandos a analizar. Además, uno de los pasos más importantes es la preparación del sistema y selección de fragmentos. El "fragmento" es un subconjunto mínimo de residuos que preserva el medio ambiente local alrededor del enlace de hidrógeno clave. La selección de residuos es esencial para el resultado exacto del desacoplamiento dinámico, por lo que es requerida una inspección visual muy cuidadosa, dado que un exceso de residuos ralentiza el cálculo pudiendo impedir que el

ligando salga de la cavidad, lo que da como resultado valores de W_{QB} muy altos que no reflejan la fuerza del enlace de hidrógeno.

4.8. Pruebas de infección de plantas de soja y análisis fisiológicos

Con objeto de comprobar los efectos fenotípicos en condiciones de vida simbiótica de la mutación C183D, que interviene en la regulación postraduccional por oxidación de la proteína FixK₂ (véase apartado introducción), se llevaron a cabo experimentos de inoculación en plantas de soja con diferentes cepas de *B. diazoefficiens* como se describe en Tortosa et al., 2021. Para la correcta realización de estos experimentos, fueron necesarias dos cepas bacterianas como control de simbiosis, por un lado, la cepa silvestre *B. diazoefficiens* 110spc4, utilizada como control positivo, y por otro lado la cepa *B. diazoefficiens* 9043 ($\Delta fixK_2$) utilizada como control negativo. Así mismo, fueron empleadas 6 plantas por tratamiento y tiempo de cosecha (25 y 32 días). Dichos experimentos sirvieron para determinar, a diferentes tiempos de cultivo, parámetros fisiológicos relacionados tanto con el crecimiento de los brotes, como con la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (para más información consúltese apartado 4.3), tales como el peso seco de los brotes (SDW), contenido en nitrógeno de los brotes (N), número de nódulos por planta (NN), peso seco de nódulos por planta (NDW) y peso seco de nódulos por nódulo (NDW/NN), y contenido en leghemoglobina (Lb).

4.8.1. Acondicionamiento y germinación de semillas

En primer lugar, las semillas de soja (*Glycine max* L. Merr., cv. Williams 82, cosecha de octubre de 2011), fueron esterilizadas superficialmente según el protocolo que se detalla a continuación:

1. Manteniendo condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar, sumergir las semillas en alcohol absoluto durante 5 min en agitación manual continua.

2. Desechar el alcohol y volver a sumergir las semillas en una solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂ 30%) durante 15 min en agitación manual continua.

3. Desechar el contenido en peróxido de hidrógeno y realizar diez lavados con H₂O_d estéril.

Una vez finalizada la etapa de esterilización, las semillas deben conservarse en condiciones estériles y húmedas, para inmediatamente después, proceder con la etapa de germinación de las mismas. Para ello, se requerirá la preparación previa de placas de Petri con medio estéril agar-agua (15 g/l). Una vez preparadas las placas de germinación y finalizado el tratamiento de las semillas, se colocan 10-12 semillas tratadas por placa, y se almacenan en una bandeja opaca cubierta, con objeto de evitar el paso de la luz y la pérdida de humedad. Las semillas se incuban a 30°C durante las 48 h previas a la inoculación bacteriana, periodo durante el cual, se desarrollan las radículas, que para una inoculación óptima no deberán superar 1 cm de longitud.

4.8.2. Cultivos de *B. diazoefficiens*

Las diferentes cepas de *B. diazoefficiens* son cultivadas en condiciones óxicas en medio PSY suplementado con los antibióticos adecuados, a 30°C y 170 rpm durante 4-5 días, hasta alcanzar la fase estacionaria (DO600~1). A continuación, los cultivos celulares se someten a dos ciclos de lavado con una solución estéril de NaCl al 0,9 %. Posteriormente se preparan suspensiones bacterianas con la misma solución estéril de NaCl al

0,9 %, con una DO600 final de 0,5 (~105 células ml⁻¹), que servirán como inoculante.

4.8.3. Inoculación de plantas de soja

Previa a la inoculación de semillas de soja con las diferentes cepas de *B. diazoefficiens*, fue necesaria la preparación del sustrato de siembra. Para ello, se prepararon y esterilizaron con ayuda de una autoclave, macetas con una capacidad de 250 ml que contenían vermiculita estéril y 50 ml de solución de medio Jensen modificado libre de nitrógeno (Tabla 4.6) según se especifica en Tortosa et al., 2021. Posteriormente en condiciones de esterilidad, fue sembrada una semilla por maceta, a una profundidad aproximada de 1 cm de la superficie, e inoculada con 1 ml de la suspensión bacteriana preparada anteriormente a una DO600 final de 0,5. Así mismo, algunas semillas fueron inoculadas con 1 ml de la solución de NaCl al 0,9 % estéril, como control negativo de contaminación. Tanto la parte inferior como la superior de las macetas fueron tapadas con placas de Petri estériles para evitar posibles contaminaciones durante el proceso emersión de los cotiledones en la germinación epigea.

Es importante mencionar, que transcurridas aproximadamente 48 h desde la inoculación, y tras la emersión de los cotiledones, las placas de Petri colocadas en la parte superior de las macetas deben ser retiradas para permitir un adecuado crecimiento de las plántulas.

4.8.4. Condiciones de cultivo y cosechado de plantas de soja

Las plantas de soja inoculadas, son cultivadas en condiciones controladas, según se especifica en Tortosa et al., 2021, en ciclos diurnos/nocturnos de 16-8 h, a 26-22°C respectivamente y densidad de flujo de fotones de fotosíntesis de 180 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, realizando un primer riego a las 72 h con 50 ml de medio Jensen

modificado, continuando con 50 ml de agua desionizada estéril cada 48 h, hasta la cosecha a los 25 y 32 días.

Para la cosecha, las plantas de soja son extraídas de las macetas limpiando las raíces cuidadosamente de los restos de sustrato y extremando las precauciones para evitar la rotura o pérdida de raíces secundarias y nódulos. A continuación, se separa la parte aérea de la planta (brote) de la parte radicular (raíz), así como los nódulos presentes en la misma, para posteriores análisis. Así mismo, con objeto de descartar posibles contaminaciones por otros rizobios, deben aislarse bacteroides de los nódulos y comprobar mediante secuenciación (apartados 4.2.4 y 4.4.11 respectivamente). De igual modo, debe verificarse la ausencia de nódulos en las plantas sin inocular utilizadas como control negativo de contaminación.

4.9. Métodos bioinformáticos

Los soportes bioinformáticos, software, bases de datos y técnicas computacionales utilizadas en el desarrollo de este trabajo son los siguientes:

MOE® (Molecular Operating Environment 2016)

Plataforma de software de descubrimiento de fármacos que integra visualización, modelado y simulaciones. Versión 2016. Para más información consulte <https://www.chemcomp.com/Products.htm>.

pyMDMix

Módulo de Python (versión Python 2.7.3) con interfaz de usuario que tiene como objetivo utilizar la metodología MDmix aplicada en el campo del descubrimiento computacional de fármacos, para facilitar la identificación de puntos de interacción de alta afinidad sobre sistemas macromoleculares mediante simulaciones de

dinámica molecular utilizando mezclas de solventes como condiciones de solvatación. Para más información consulte <http://mdmix.sourceforge.net/>.

rDock® LGPLv3 version

Conjunto de herramientas de línea de comandos para acoplamiento de alto rendimiento (Acoplamiento dinámico o *Docking*) y detección virtual de ligandos similares a fármacos a objetivos como proteínas y ARN. Para más información consulte <http://rdock.sourceforge.net/>.

Desacoplamiento dinámico, *Dynamic Undocking* o *Duck*

Herramientas computacionales utilizadas para investigar el modo de unión de un ligando o examinar virtualmente una biblioteca de supuestos aciertos. El desacoplamiento dinámico (*DUck*), requiere de soporte informático (software y hardware) específico, tal como un entorno operativo molecular MOE® (Molecular Operating Environment; versión 2015 o superior), paquete de dinámica molecular AMBER (Amber y AmberTools, versión 16), visor molecular PyMOL® (PyMOL Molecular Graphics System 2.2.3), software “R” (<https://www.r-project.org/>) y scripts públicos de *DUck*. También se utiliza Linux o MAC como sistemas operativos para preparaciones de *DUck*, además de un sistema operativo basado en Linux para la paralelización y GPUs en simulaciones MD (*DUck* es compatible con los sistemas de colas SGE y SLURM). Para más información consulte <http://www.ub.edu/bl/undocking/>.

PyMOL® (PyMOL Molecular Graphics System 2.2.3)

Visor molecular de código abierto apropiado para producir imágenes 3D de alta calidad de moléculas pequeñas y de macromoléculas biológicas. Para más información consulte <https://pymol.org/2/>.

VMD® (Visual Molecular Dynamics 1.9.3)

Programa de interfaz gráfica de visualización molecular para mostrar, animar y analizar grandes sistemas biomoleculares utilizando gráficos 3D y secuencias de comandos integradas. Para más información consulte <https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>.

RCSB PDB (Protein Data Bank)

Base de datos bajo el dominio público y de uso libre de la estructura tridimensional de las proteínas y ácidos nucleicos generalmente obtenidos mediante cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear. Para más información consulte <https://www.rcsb.org/>.

PMN (Plant Metabolic Network)

Amplia red de bases de datos de vías metabólicas de plantas que contienen información y análisis computacionales sobre los genes, enzimas, compuestos, reacciones y vías involucradas en el metabolismo primario y secundario de las plantas. Para más información consulte <https://www.plantcyc.org/>.

MetaCyc Metabolic Pathway Database

Base de datos de vías metabólicas involucradas en el metabolismo primario y secundario, así como metabolitos, reacciones, enzimas y genes asociados, dilucidadas experimentalmente de todos los dominios de la vida con 2937 vías de 3295 organismos diferentes. Para más información consulte <https://metacyc.org/>.

Rhizobase

Base de datos del genoma para Rizobios. Para más información: <http://genome.kazusa.or.jp/rhizobase/Bradyrhizobium>.

BIOVIA Discovery Studio Visualizer® (v20.1.0.19295)

Software para el análisis y modelado de estructuras y secuencias proteicas. Para más información consulte <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>.

FinchTV® (versión 1.4.0)

Herramienta bioinformática para visualización y trabajo con secuencias de ADN. Para más información consulte <https://digitalworldbiology.com/FinchTV>.

Clone Manager® (Professional Edition 9)

Programa informático para la simulación de clonajes, restricciones y mapeo gráfico de plásmidos. Para más información consulte https://www.scied.com/pr_cmpro.htm.

AMBER

Conjunto de programas de simulación biomolecular que consta de varios paquetes desarrollados de forma independiente (Amber y AmberTools, versión 16). Para más información consulte <https://ambermd.org/>; <https://ambermd.org/doc12/Amber16.pdf>.

SnapGene Viewer® (versión 4.2.6)

SnapGene Viewer es un software revolucionario que permite a los biólogos moleculares crear, explorar y compartir archivos de secuencias de ADN con abundantes anotaciones de hasta 1 Gbp de longitud. Para más información consulte <https://www.snapgene.com/snapgene-viewer/>.

VideoMach® (versión 5.15.1)

Potente herramienta para la edición de vídeo. Este programa posibilita crear vídeos en formato MPEG, AVI, FLIC y HAV en los que

se puede incluir vídeos en varios formatos, imágenes (JPG, GIF, PCX, TIF, BMP) y música (MP3 y WAV). Dispone de una gran cantidad de filtros para mejorar la imagen o aplicarle efectos de conversión a blanco y negro, solarización, cambios de color, cortar partes del vídeo, rotar, etc. Para más información consulte <https://videomach.uptodown.com/windows>.

MareNostrum4 (Barcelona Supercomputing Center, BSC)

MareNostrum es una supercomputadora basada en procesadores Intel Xeon Platinum, bastidores informáticos Lenovo SD530, un sistema operativo Linux y una interconexión Intel Omni-Path. Para más información consulte <https://www.bsc.es/es/marenostrum/marenostrum>.

Quantity One® (versión 4.6.9) Bio-Rad®

Programa de adquisición, análisis y cuantificación de imagen de geles obtenidas por equipos de Bio-Rad (Bio-Rad®).

Image Lab™ (versión 6.0) Bio-Rad®

Programa de análisis de imagen de geles (Bio-Rad®).

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

Programa de alineamiento de secuencias de ADN, ARN o proteínas, basado en la base de datos del NCBI.

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)

Colección de bases de datos en línea, que contiene información de genómica y rutas metabólicas.

Biacore™ X100 (GE Healthcare)

Software de Evaluación y análisis de los datos de interacción obtenidos en ensayos SPR.

Affymetrix Expression Console versión 1.4.1 (Affymetrix®)

Detección, normalización y análisis de las intensidades de la señal en experimentos con microarrays.

Console 3.1 (Affymetrix®)

Análisis del transcriptoma y análisis comparativos en experimentos con microarrays.

5

RESULTADOS

Capítulo 5.1

Fine-tuning modulation of oxidation-mediated posttranslational control of *Bradyrhizobium diazoefficiens* FixK₂ transcription factor

Sergio Parejo, Juan J. Cabrera, Andrea Jiménez-Leiva, Laura Tomás-Gallardo, Eulogio J. Bedmar, Andrew J. Gates y Socorro Mesa

Versión modificada del artículo publicado en la revista *International Journal of Molecular Sciences* 23: 5117,
<https://doi.org/10.3390/ijms23095117>

5.1. Fine-tuning modulation of oxidation-mediated posttranslational control of *Bradyrhizobium diazoefficiens* FixK₂ transcription factor

5.1.1. Abstract

FixK₂ is a CRP/FNR-type transcription factor that plays a central role in a sophisticated regulatory network for the anoxic, microoxic and symbiotic lifestyles of the soybean endosymbiont *Bradyrhizobium diazoefficiens*. Apart of the balanced expression of the *fixK₂* gene under microoxic conditions (induced by the two-component regulatory system FixLJ and negatively auto-repressed), FixK₂ activity is post-translationally controlled by proteolysis, and by oxidation of a singular cysteine residue (C183) near its DNA-binding domain.

To simulate permanent oxidation of FixK₂, we replaced C183 for aspartic acid. This semi-conservative replacement (due to both its size and charge) would mimic FixK₂ overoxidation (sulfenic/sulfenic acid cysteine derivatives). Purified C183D FixK₂ protein showed both low DNA binding and *in vitro* transcriptional activation from a genuine FixK₂ target, i.e., the promoter of the *fixNOQP* operon, required for respiration under symbiotic conditions. However, in a *B. diazoefficiens* strain coding for C183D FixK₂, expression of a *fixNOQP*'-*lacZ* fusion was similar to that in the wild type, when both strains were grown microoxically. The C183D FixK₂ encoding strain also showed a wild-type phenotype in symbiosis with soybeans, and increased *fixK₂* gene expression levels and FixK₂ protein abundance in cells. These two latter observations together with a global transcriptional profile of the microoxically cultured C183D FixK₂ encoding strain suggest the existence of a finely tuned regulatory strategy to counterbalance the oxidation-mediated inactivation of FixK₂ *in vivo*.

5.1.2. Strains and plasmids construction

A *B. diazoefficiens* strain that encodes a C183D FixK₂ protein variant was constructed using a markerless mutagenesis approach based on the *sacB*-based methodology (Schäfer et al., 1994; Cabrera et al., 2016). Firstly, C183 in FixK₂ was exchanged by aspartic acid

using site-directed mutagenesis and plasmid pRJ8848 as template, and oligonucleotides *fixK₂_mut59* and *fixK₂_mut60*, yielding plasmid pMB1250. A 1.843-kb *Bam*HI/*Xba*I fragment from pMB1250 was then cloned into the corresponding sites of the pBBR1MCS-2 vector thus resulting in plasmid pMB1251. Next, a 3.965-kb *Not*I fragment from pMB1251 was inserted into the linearized *Not*I pRJ9041 plasmid, to give rise plasmid pMB1256. This plasmid was subsequently cut with *Bgl*II, and recirculation of a 4.974-kb fragment yielded plasmid pMB1254. Finally, to construct plasmid pMB1255, a 1.849-kb *Bam*HI fragment derived from plasmid pMB1254 was cloned into the suicide vector pK18*mobsacB*. Plasmid pMB1255 was then transferred to *E. coli* S17.1 cells which were employed in biparental conjugation with *B. diazoefficiens* wild type. Single recombination transconjugants were selected by kanamycin resistance, followed by double recombination selection by sucrose resistance as described elsewhere (Cabrera et al., 2016). The genomic organization of the resulting markerless strain encoding a C183D FixK₂ derivative (strain 1255) was verified by PCR and sequencing using specific primers (Table 4.3).

To express and purify an untagged C183D FixK₂ protein variant, the intein-mediated purification with an affinity chitin-binding tag (IMPACT) methodology (New England Biolabs [NEB]) was employed. For that purpose, a 727-bp PCR-amplified fragment from pMB1251 with the oligonucleotides *fixK₂_mut19* and *fixK₂_mut58* was restricted with *Nde*I and *Spe*I and subsequently cloned in frame into the pTXB1 vector (NEB), thus resulting in plasmid pMB1253. This plasmid expresses a C183D FixK₂ derivative fused at its C-terminal region with the *Mxe* GyrA-Intein-chitin binding domain (CBD) under the control of the T7 promoter. The correctness of plasmid pMB1253 sequence was verified by sequencing with suitable primers (Table 4.3).

To construct *B. diazoefficiens* C183D FixK₂ encoding strains harboring either a *fixNOQP*'-'*lacZ* or a *fixK₂*'-'*lacZ* translational fusion, plasmids pRJ3603 and pMB1109 (Table 4.3) were transferred from *E. coli* S17.1 cells via biparental conjugation into the chromo-

some of the 1255 strain. Transconjugants were selected by tetracycline resistance and further verified by PCR and sequencing, yielding strains 1255-3603 and 1255-1109 expressing *fixNOQP'*-*lacZ* and *fixK₂'*-*lacZ* fusions, respectively.

5.1.3. Assessing the impact of C183D exchange in FixK₂ on *in vitro* transcription activation activity and protein-DNA interaction ability

Transcriptional regulation mediated by the FixK₂ protein is affected, among other factors, through an oxidation-mediated posttranslational control (reviewed Fernandez et al., 2016). The C183 residue in FixK₂ plays a central regularity role because it is sensitive to ROS, giving rise to overoxidized species of the protein, i.e., sulfenic, sulfinic and sulfonic acid derivatives. In order to mimic FixK₂ overoxidation, we performed a cysteine to aspartic acid replacement and subsequent functional analyses of the C183D FixK₂ protein variant. In this context, its performance was compared with that of the genuine FixK₂ protein (Bonnet et al., 2011), and with that of a C183S FixK₂ derivative, which is oxidation resistant (Cabrera et al., 2021). All these proteins were previously purified as untagged variants using the IMPACT methodology (NEB)

The ability of the C183D FixK₂ protein to activate transcription *in vitro* in collaboration with *B. diazoefficiens* RNAP was monitored in a multiple-round IVT activation assay using the template plasmid pRJ8816, which harbors the *fixNOQP* operon promoter cloned upstream of the *B. diazoefficiens* *rrn* transcriptional terminator (Figure 5.1.1) (Mesa et al., 2005). Importantly, this plasmid allows simultaneous analysis of both FixK₂-dependent (*fixNOQP* transcript, 243 nt) and FixK₂-independent (control transcript, 107 nt) transcriptional responses elicited by *B. diazoefficiens* RNAP (Figure 5.1.1). The FixK₂ protein efficiently activated transcription at 0.5 μM (Figure 5.1.1, lane 2), which increased at higher concentrations (Figure 5.1.1, lanes 3 and 4). In contrast, the C183D FixK₂ derivative triggered low levels of transcription from the *fixNOQP* promoter even when 2.5 μM of the protein was present in the reaction (Figure 5.1.1, lane 7). However,

the C183S FixK₂ variant showed higher levels of transcription activation activity than the FixK₂ protein, reaching saturation at 0.5 μM (Figure 5.1.1, lane 8).

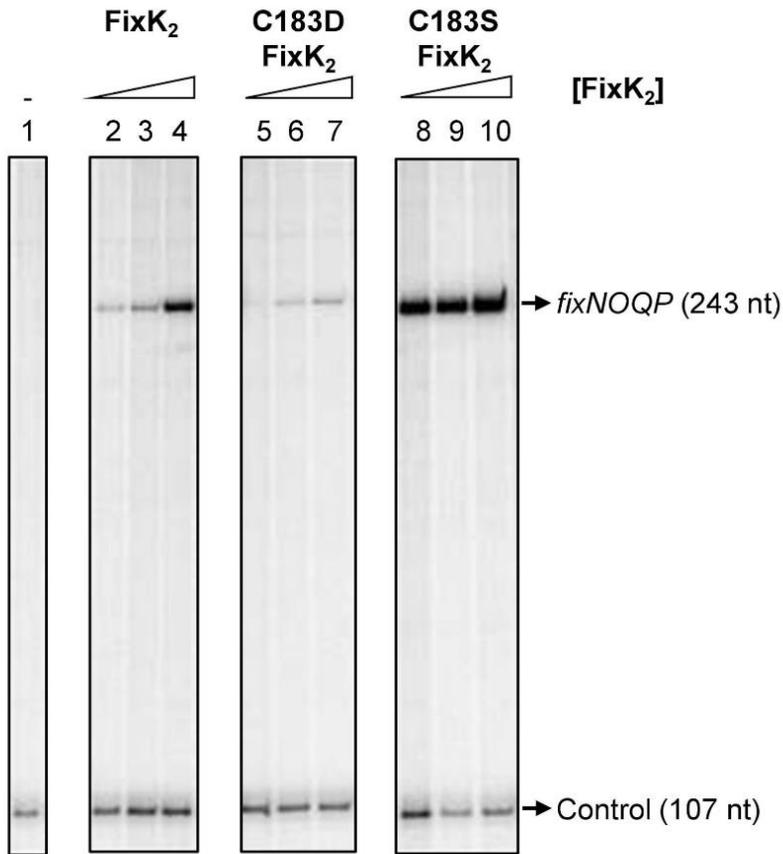


Figure 5.1.1. IVT activation from the *fixNOQP* promoter mediated by different FixK₂ protein derivatives. Plasmid pRJ8816 harboring the *fixNOQP* promoter cloned upstream of the *B. diazoefficiens* *rrn* transcriptional terminator was employed as template for multiple-round IVT activation assays with *B. diazoefficiens* RNAP holoenzyme. A series of concentrations of FixK₂ protein variants were added to the reactions: lane 1, no protein (-); lanes 2, 5, and 8, 0.5 μM; lanes 3, 6, and 9, 1.25 μM; lanes 4, 7, and 10, 2.5 μM. The positions of the *fixNOQP* transcript and the FixK₂-independent transcript (used as control for the experiments) are depicted

on the right. Each panel refers to different sections of the same gel. Shown are the results of a typical experiment which was performed at least twice. nt, nucleotides.

Since FixK₂ belongs to the CRP/FNR-type transcription factor family, which act as functional dimers, the solution oligomeric state of C183D FixK₂ was analyzed by SEC and compared to those of native FixK₂ and the C183S FixK₂ derivative (Figure 5.1.2). These experiments were performed to determine whether the diminished transcription efficiency of the C183D FixK₂ protein variant could be attributed to an altered oligomeric state. Importantly, prior to SEC, each protein derivative preparation was analyzed by denaturing sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and showed a purity over ~95% for the band that corresponds to the predicted molecular mass of FixK₂ (~25.6 kDa) (Figure 9.1.1). During non-denaturing individual SEC experiments for the three protein variants, chromatographic elution profiles showed a concentration-dependent behavior with retention volumes ranging from the apparent molecular weight of the dimer (~52 kDa) to that of the monomer (~26 kDa) (Figure 5.1.2), as previously described for the N-terminally tagged wild-type protein (Mesa et al., 2005). The three proteins showed a monomer-dimer equilibrium; however, the proportion of the dimeric fraction with respect to the monomeric fraction was higher for the native FixK₂ protein (Figure 5.1.2A) compared to C183S FixK₂ and C183D FixK₂ (Figure 5.1.2B and 5.1.2C, respectively) at similar concentrations. The reason of this difference might be related to the susceptibility of the wild-type derivative to form disulfide bridges via C183. However, C183S FixK₂ (Figure 5.1.2B) and C183D FixK₂ (Figure 5.1.2C), that are devoid of cysteine residues both showed similar monomer-dimer profiles despite their contrasting performance in transcriptional activation assays from the *fixNOQP* promoter. Therefore, the impaired IVT activation activity observed for the C183D FixK₂ derivative is unlikely to be solely related to different oligomeric behavior.

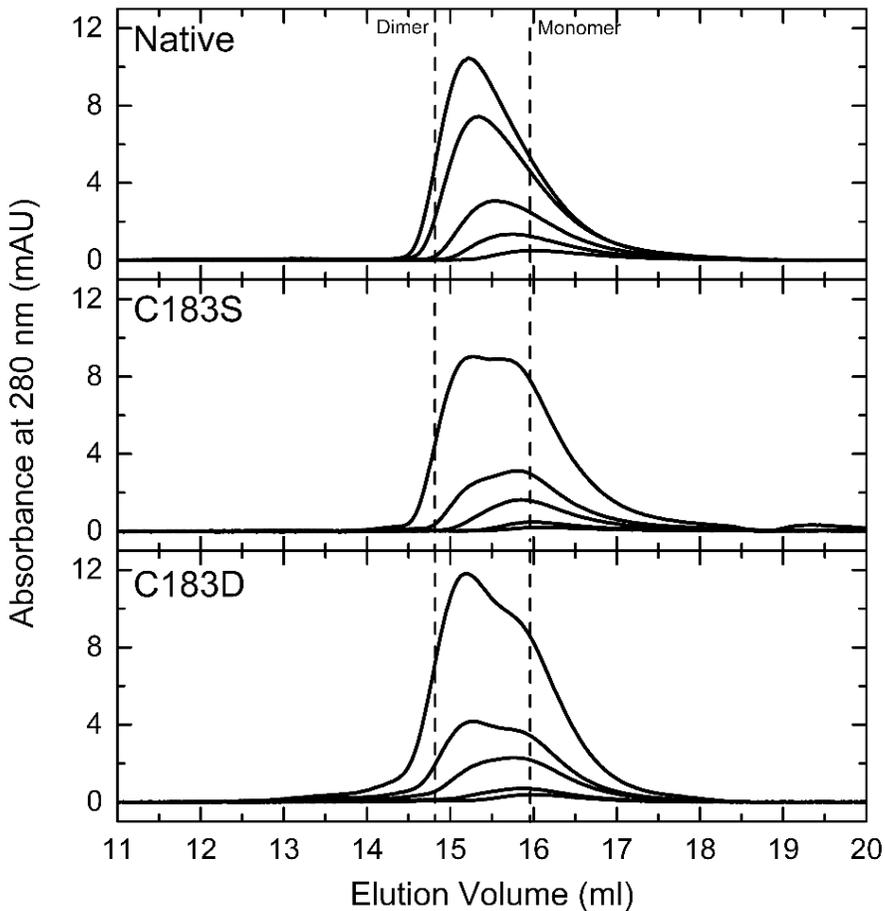


Figure 5.1.2. Comparative SEC of native FixK₂ and C183S, and C183D FixK₂ variants at different protein concentrations. Elution profiles were monitored at 280 nm following chromatography of FixK₂ loaded at 2.5, 5, 10, 20 and 30 μ M (A); C183S FixK₂ at 2.5, 5, 10, 20, and 40 μ M (B); and C183D FixK₂ at 2.5, 5, 10, 20, and 40 μ M (C). The dashed lines show the calculated elution volume for the theoretical M_w of the monomeric (~26 kDa) and dimeric forms (~52 kDa).

To evaluate whether or not the C183D mutation in FixK₂ affects the DNA-binding capacity of the protein, EMSAs were performed. Target DNA for these experiments was generated by PCR amplification of the promoter region of the *fixNOQP* operon. We found that

a FixK₂-DNA complex was readily detected when 0.25 μM of C183S FixK₂ protein was included in the reaction (Figure 5.1.3A, gel at the top). However, a concentration at least 16-fold higher (i.e., 4 μM) of the C183D FixK₂ protein was required to detect any interaction with DNA (Figure 5.1.3A, gel at the bottom), as determined by free-DNA disappearance, since the protein-DNA complexes apparently did not enter the gel at such protein concentration of this protein. Furthermore, a similar DNA mobility shift with each individual protein was only detected at a concentration about 32-fold higher of the C183D FixK₂ protein (8 μM) with respect to the C183S FixK₂ variant (0.25 μM) (Figure 5.1.3A), again determined by equivalent free-DNA disappearance.

The DNA binding properties of the C183D FixK₂ variant was also determined by employing SPR methodology (Figure 5.1.3B). In these assays, the FixK₂ box located within the *fixNOQP* promoter was immobilized on a streptavidin (SA) sensor chip and the binding kinetics and affinity were analyzed by monitoring the response in RU vs. time. In line with the EMSA results, purified C183D FixK₂ interacted poorly with DNA (Figure 5.1.3B). Further, neither affinity nor kinetic parameters could be calculated as they were out of Biacore range and non-specific interactions were detected at high protein concentrations. This was in contrast with the results of a previous study performed with the C183S FixK₂ derivative which showed that FixK₂-DNA interaction takes place at the nanomolar range and fitted well to a kinetic model for interaction of one protein dimer per DNA molecule (Cabrera et al., 2021).

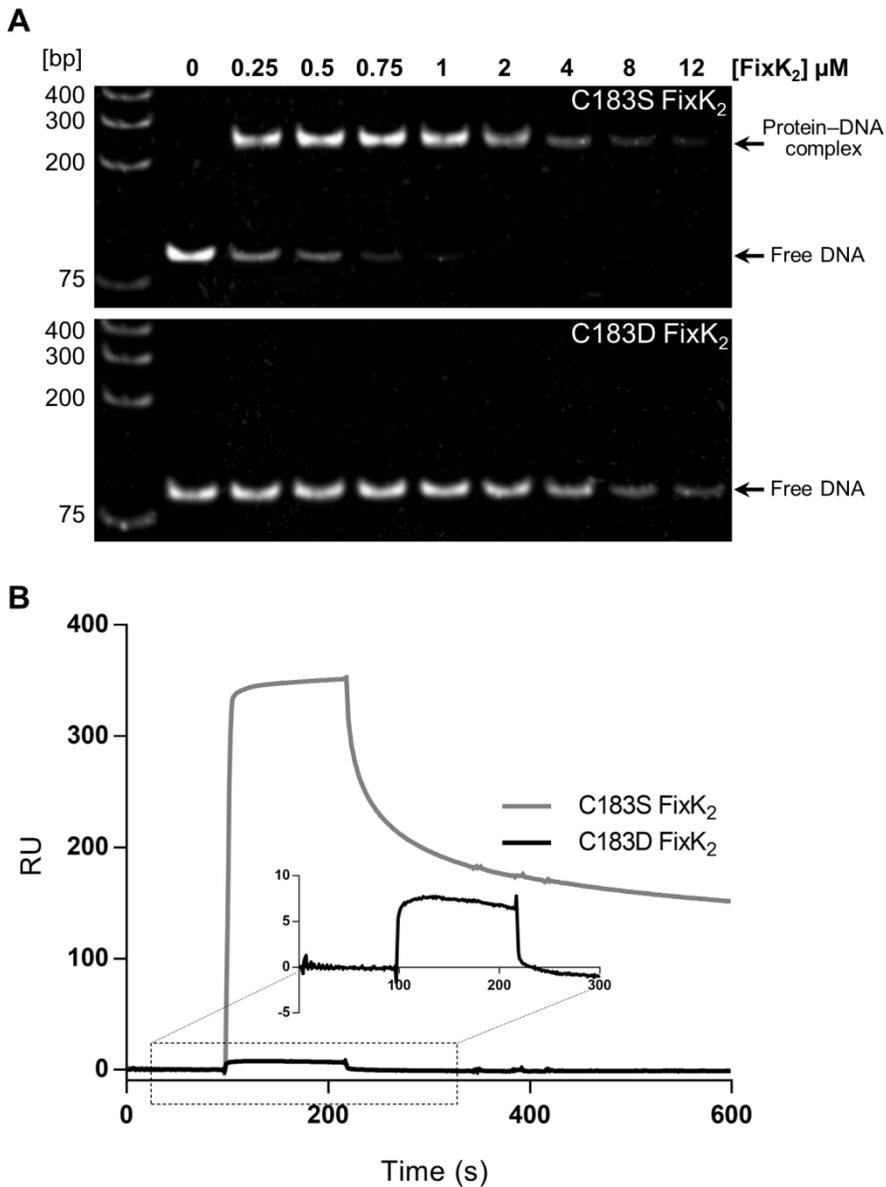


Figure 5.1.3. *In vitro* interaction of C183S and C183D FixK₂ derivatives with the *fixNOQP* promoter tested by EMSA (A) and surface plasmon resonance (SPR) (B) approaches. (A) A 90-bp PCR fragment containing the FixK₂-box at 20 nM was incubated with increasing concentrations (0 to 12 μM) of FixK₂ protein variants indicated at the top of each gel. Lower bands show free DNA, while upper bands correspond to the protein-DNA

complexes. The molecular marker GeneRuler™ 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) is shown on the first lane. (B) A biotinylated double-stranded oligonucleotide containing the FixK₂ box from the *fixNOQP* promoter was immobilized on a streptavidin (SA) sensor chip by biotin-streptavidin binding. The sensorgrams with the relative RU of the interaction with DNA of C183S and C183D FixK₂ protein variants at 250 nM are shown. Data of the C183D FixK₂ protein did not allow to calculate any kinetic/affinity parameters.

5.1.4. *In vivo* effects of C183 to aspartic acid replacement in FixK₂

To determine the effect of substituting C183 to aspartic acid in FixK₂ in a cellular context we performed a series of *in vivo* experiments. Firstly, we measured β -Galactosidase activity of a chromosomally integrated *fixNOQP*'-*lacZ* fusion in a *B. diazoefficiens* strain encoding C183D FixK₂ (C183D-*fixK*₂) compared to the wild-type and Δ *fixK*₂ strains, both used as controls (Figure 5.1.4). All strains were cultured under microoxic conditions (0.5% O₂) for 48 h. An induction of about 600 Miller Units (MU) was observed in the wild type, while, as expected, only basal levels were detected in the Δ *fixK*₂ strain (Figure 5.1.4). However, expression of the *fixNOQP*'-*lacZ* in the C183D-*fixK*₂ strain was similar to that observed for wild-type cells, suggesting that *in vivo* other mechanisms counterbalance the impaired transcriptional output of the C183D FixK₂ protein observed *in vitro*.

Since FixK₂ also directly or indirectly regulate expression of genes involved in the denitrification process in *B. diazoefficiens* (Mesa et al., 2008; Bueno et al., 2017; Torres et al., 2017), we investigated whether the C183D mutation in FixK₂ affects denitrifying growth (anoxia with nitrate as terminal respiratory electron acceptor) (Figure 5.1.5). Again, the C183D-*fixK*₂ strain showed growth profiles that were similar to the wild type rather than the Δ *fixK*₂ strain where denitrifying growth is abolished.

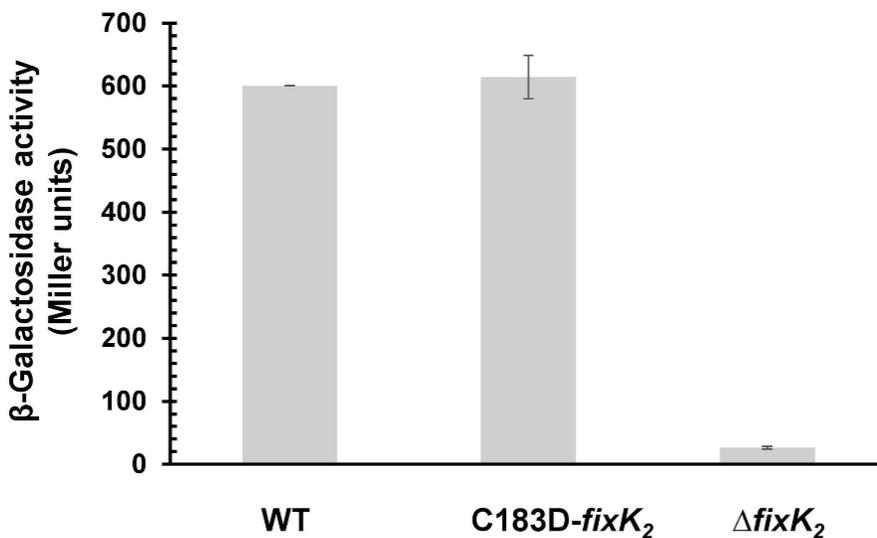


Figure 5.1.4. Expression data for a chromosomally integrated *fixNOQP'*-*lacZ* fusion in different *B. diazoefficiens* backgrounds. Wild-type, the C183D-*fixK*₂ and Δ *fixK*₂ strains were cultivated 48 h microoxically (0.5% O₂). β -Galactosidase values are means \pm standard errors of a representative experiment performed with two parallel cultures assayed in quadruples. The experiment was repeated at least twice. WT, wild type.

The *fixNOQP* operon, employed as archetypical target to monitor FixK₂ activity (Mesa et al., 2005) encodes the *cbb*₃ high-affinity terminal oxidase, required for bacterial respiration within root nodules. To investigate the ability of C183D FixK₂ to support the plant-endosymbiotic interaction, we performed plant infection tests with soybeans inoculated with the wild type, and the C183D-*fixK*₂ and Δ *fixK*₂ strains at two time-points: at 25 dpi, when maximal nitrogen fixation activity has been observed, and at 32 dpi, which corresponds to a late bacteroidal development stage (Pessi et al., 2007).

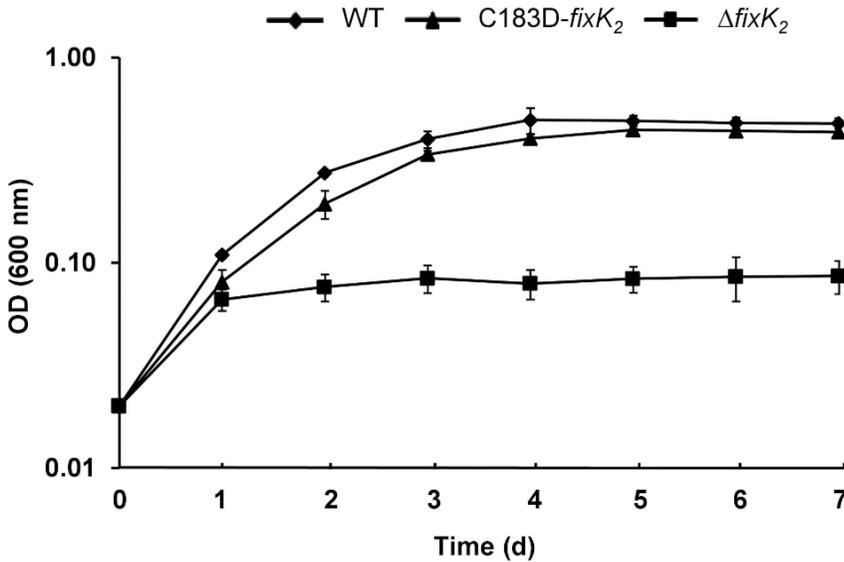


Figure 5.1.5. Denitrifying growth of the *B. diazoefficiens* C183D-*fixK*₂ strain (triangles). Wild type (WT, diamonds) and Δ*fixK*₂ (squares) were used as controls. Cells were grown anoxically with nitrate. Values ± standard errors are the mean of a representative experiment carried out with three parallel cultures. At least three replicates of the experiment were done.

As shown in Table 5.1.1, no significant phenotypic differences, neither at 25 nor at 32 dpi were observed in the C183D-*fixK*₂ strain compared to the wild type with regard to several parameters relevant for plant-endosymbiotic efficacy, such as shoot dry weight (SDW), nitrogen shoot content (N), nodule number per plant (NN), nodule dry weight per plant (NDW), dry weight per nodule (NDW/NN), and leghemoglobin content in nodules (Lb). This contrasted with the phenotype of the plants inoculated with the Δ*fixK*₂ strain, in which N, NDW/NN and Lb values were severely diminished (Table 5.1.1), which it is in line with previous studies (Cabrera et al., 2021; Nellen-Anthamatten et al., 1998).

Table 5.1.1. Symbiotic phenotype of different *B. diazoefficiens* strains on soybean plants. Shoot dry weight (SDW), nitrogen shoot content (N), nodule number per plant (NN), nodule dry weight per plant (NDW), dry weight per nodule (NDW/NN), and leghemoglobin content in nodules (Lb) were determined at 25 and at 32 days post-inoculation (dpi). WT, wild type.

Parameters	WT	$\Delta fixK_2$	C183D- $fixK_2$
25 dpi			
SDW (g)	(0.54 ± 0.13)	(0.59 ± 0.10)	(0.47 ± 0.11)
N (mg)	(12.60 ± 4.0)	(4.90 ± 1.2)	(12.20 ± 3.90)
NN	(38.30 ± 4.5)	(34.50 ± 3.5)	(32.20 ± 6.70)
NDW (mg)	(38.67 ± 7.58)	(16.83 ± 1.94)	(32.50 ± 6.63)
NDW/NN (mg)	(1.03 ± 0.24)	(0.49 ± 0.03)	(1.03 ± 0.22)
Lb (mg Lb · g NFW ⁻¹)	(11.83 ± 0.59)	(0.11 ± 0.02)	(10.08 ± 0.35)
32 dpi			
SDW (g)	(0.92 ± 0.14)	(0.68 ± 0.13)	(0.77 ± 0.01)
N (mg)	(18.60 ± 5.90)	(5.00 ± 1.30)	(21.00 ± 5.80)
NN	(31.30 ± 13.60)	(50.70 ± 13.60)	(27.80 ± 4.00)
NDW (mg)	(38.17 ± 5.04)	(25.33 ± 6.31)	(32.83 ± 4.96)
NFW/NN (mg)	(1.44 ± 0.65)	(0.50 ± 0.05)	(1.21 ± 0.28)
Lb (mg Lb · g NFW ⁻¹)	(11.51 ± 0.24)	(0.15 ± 0.02)	(11.23 ± 0.71)

Shown are the average values ± standard deviation of one representative experiment out of at least three repetitions ($n = 6$ plants per strain at harvest point).

5.1.5. Appraisal of the impact of the C183D mutation on a wider FixK₂-mediated control landscape

In order to reconcile and further understand the *in vitro* and *in vivo* results obtained with C183D FixK₂, which suggest that in cells, other mechanisms may compensate for the low DNA-binding capacity and IVT activation activity of the modified protein, a series of additional assays were performed. Firstly, we analyzed the abundance of FixK₂ by Western blot of crude extracts from cells grown under microoxic free-living conditions and from soybean bacteroids (Figure 5.1.6A and B, respectively). Steady-state levels of FixK₂ were about 2-3-fold higher in the C183D- $fixK_2$ strain than in the wild type (Figure 5.1.6A, lane 2 vs. lane 1). A similar profile was also observed in soybean bacteroids extracted from nodules at 25 and at 32 dpi (Figure 5.1.6B, lanes 2 and 4 vs. lanes 1 and 3, respectively).

Based on these results, we also monitored whether the C183D FixK₂ modification affected the expression of the *fixK₂* gene itself. Here, we measured β -Galactosidase activity from a *fixK₂'-lacZ* fusion integrated into the chromosome of the *B. diazoefficiens* C183D-*fixK₂* strain when cultivated microoxically (Figure 5.1.6C). In line with the increased levels of FixK₂ protein observed in the immunodetection experiments, expression of *fixK₂* was around 3-fold higher in the C183D-*fixK₂* strain compared to those values observed in wild-type cells. This induction profile for the *fixK₂'-lacZ* fusion was similar to that observed in the Δ *fixK₂* strain (Figure 5.1.6C; (Nellen-Anthamatten et al., 1998; Reutimann et al., 2010; Fernandez et al., 2016)) and therefore indicated that de-repression of *fixK₂* auto-regulation also occurred in the C183D-*fixK₂* strain.

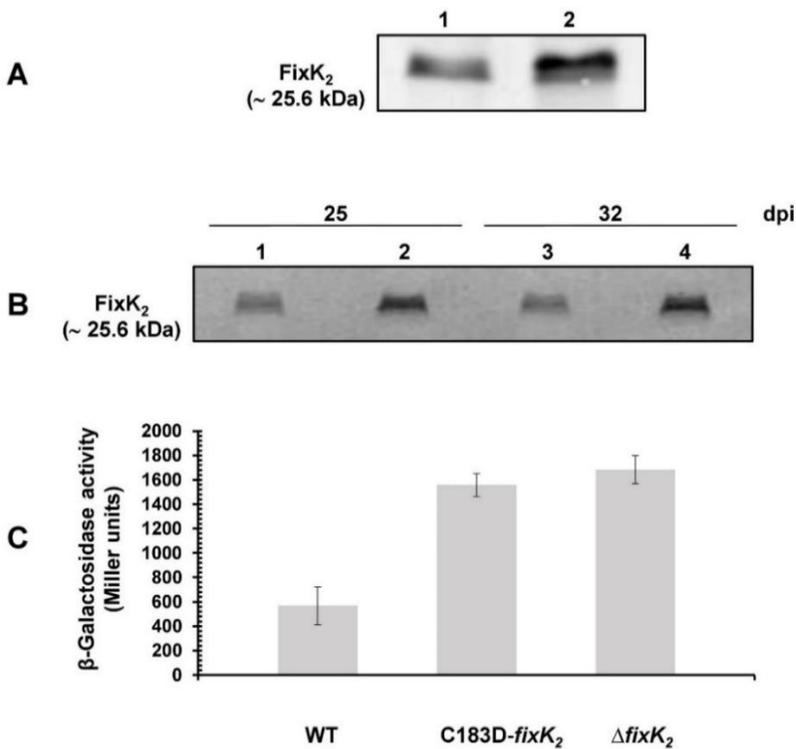


Figure 5.1.6. Expression of *fixK₂* at protein (A and B) and transcriptional (C) levels. Steady-state levels of FixK₂ protein in cells cultivated

under microoxic free-living conditions (A) and in soybean bacteroids collected at 25 and 32 dpi (B). Immunodetection was performed with a polyclonal FixK₂ antibody (Mesa et al., 2009). (A) 60 μg of crude extract of wild-type (lane 1) and C183D-*fixK*₂ strains (lane 2) both cultivated microoxically (0.5 % O₂). (B) 10 μL of soybean bacteroid crude extract of wild-type (lanes 1, and 3) and C183D-*fixK*₂ strains (lanes 2, and 4). Apparent molecular mass of FixK₂ is shown on the left. Representative results of at least three independent biological replicates are shown. (C) β-Galactosidase activity from a chromosomally integrated *fixK*₂'-*lacZ* fusion in *B. diazoefficiens* wild-type, C183D-*fixK*₂ and Δ*fixK*₂ strains. Cells were cultivated 48 h microoxically (0.5% O₂). Values are the means ± standard errors of a typical experiment performed with two parallel cultures assayed in quadruples. The experiment was repeated at least twice. WT, wild type.

In order to examine whether other more global mechanisms could be involved in the C183D FixK₂ phenotype *in vivo*, a global transcriptional analysis of the *B. diazoefficiens* C183D-*fixK*₂ strain was performed and compared with that of the wild type, both grown under microoxic conditions. For that purpose, we employed the well-validated *B. diazoefficiens* custom-made GeneChip (Hauser et al., 2007). This comparative transcriptomic profile showed that 104 genes showed a differential expression in the C183D-*fixK*₂ strain, with 26 genes being upregulated and 78 genes downregulated (Table 9.1.1, Datasheet A; Figure 5.1.7). As expected, we found the *fixK*₂ gene within the group of upregulated genes and a relative change of fivefold was observed. However, among the downregulated genes in the C183D-*fixK*₂ strain background, a series of *bona fide* FixK₂-activated targets such as *fixNOQP*, *fixGHIS*, and *napEDABC* were not present. Similarly, the expression of genes encoding other CRP/FNR-type transcription factors under positive control of FixK₂ (i.e., *nnrR*, *fixK*₁, *bll2109*, *bll3466*) did not change.

The comparison of the C183D-*fixK*₂ strain profile with the previously published transcriptional data of the Δ*fixK*₂ strain under microoxic conditions (Mesa et al., 2008) revealed a partial overlap between both groups of genes (Figure 5.1.7). In particular, while 54 genes mainly represented by hypothetical and unknown proteins,

were specific for the C183D-*fixK*₂ strain profile (Table 9.1.1, Datasheet B), a further group of 50 genes were present in both profiles (Figure 5.1.7; Table 9.1.1, Datasheet C). Of this subset, 47 genes were downregulated (i.e., activated by FixK₂), and specifically, 37 of them are organized into 26 transcriptional units with each harboring a putative FixK₂ binding site (Figure 5.1.7; Table 5.1.2). Furthermore, it includes 10 genes belonging to the set defined as putative direct FixK₂ targets (Mesa et al., 2008), and in particular the *hspC2*, *ppsA*, *phaC2*, *hemN*₂, and *bsr7087* genes, which were previously validated by IVT activation assays (compiled by Cabrera et al., 2021; Table 5.1.2). These observations demonstrate that expression of certain FixK₂-dependent targets is not counterbalanced in the C183D-*fixK*₂ strain background.

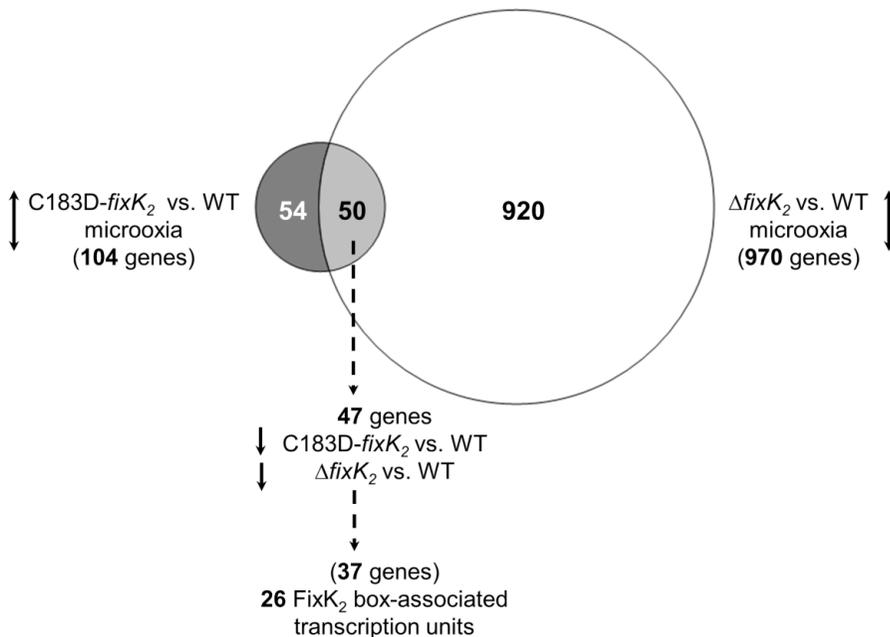


Figure 5.1.7. Workflow of microarray data analyses of the C183D-*fixK*₂ strain. Labels of the comparisons between specific transcription profiles are depicted alongside the circles. The total number of differentially expressed genes are indicated in parentheses. Up-down arrows refer to decreased and increased gene expression. The group of genes with differential expression in the C183D-*fixK*₂ strain (dark grey circle, left) showed

an overlap of 50 genes (light grey circle, middle) with those in $\Delta fixK_2$ strain (white circle, right; (Mesa et al., 2008)), both grown microoxically (0.5% O₂) and compared with the wild type grown in the same conditions. Within the overlap, 47 genes showed downregulated expression in both the C183D-*fixK*₂ and $\Delta fixK_2$ strains, which includes 37 genes organized in mono, or polycistronic transcriptional units that harbor a putative FixK₂ box within the promoter region (26 putative transcriptional units, see Table 5.1.2).

Table 5.1.2. List of the 37 genes belonging to 26 putative FixK₂ box-associated transcription units whose expression is downregulated in both the C183D-*fixK*₂ and Δ *fixK*₂ strains in comparison to the wild type (WT), both cultured microoxically (0.5% O₂).

Query ^a	FC (C183D- <i>fixK</i> ₂ vs. WT) ^b	FC (Δ <i>fixK</i> ₂ vs. WT) ^c	Locus_tag ^d	Gene name ^e	Product ^f	Position ^g	Motif ^h	Predicted operon structure ⁱ
blI0330	-2.4	-11.0	Bdiaspc4_01315	-	DNA-binding response regulator	-106	TTGACCTGG ATCAA	-
blI0818	-2.1	-9.3	Bdiaspc4_03880	-	hypothetical protein	-66	TTGATCCCG GTCAA	-
blR1289	-3.2	-23.1	Bdiaspc4_06390	-	oleate hydratase	-37	TTGATCCAG CGCAA	-
blI2517	-3.2	-10.2	Bdiaspc4_12930	-	acetate/propionate family kinase			-
blI2518	-2.6	-10.0	Bdiaspc4_12935	-	phosphoketolase family protein	-89	TTGACCTCA CGCAA	blI2518- blI2517
blI3115	-9.6	-30.6	Bdiaspc4_16100	-	MBL fold metallo-hydrolase			-
blI3117	-2.4	-6.6	Bdiaspc4_16110	-	thymidine phosphorylase family protein	-74	ATGATCTGG GTCAA	blI3117- blI3116- blI3115
blR3815	-2.2	-7.6	Bdiaspc4_19720	-	HAD family hydrolase	-287	TTGACGTAT CGCAA	-
blR4240	-3.1	-25.1	Bdiaspc4_22005	-	pyridoxamine 5'-phosphate oxidase family protein	-69	TTGAGGTGC ATCAA	blR4240- blR4241

Query ^a	FC (C183D- fixK ₂ vs. WT) ^b	FC (ΔfixK ₂ vs. WT) ^c	Locus_tag ^d	Gene name ^e	Product ^f	Position ^g	Motif ^h	Predicted operon structure ⁱ
blr4241	-2.9	-83.3	Bdiaspc4_22010	-	cytochrome <i>c</i>			-
blr4412	-3.2	-20.7	Bdiaspc4_22980	-	translational machinery protein	-38	TTGACCTGC GTCAA	-
blr4634	-2.8	-20.2	Bdiaspc4_24260	-	efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit	-75	TTGACCTAG CGCAA	-
blr4635	-2.5	-29.4	Bdiaspc4_24265	groL5, groEL5	chaperonin GroEL	-150	TTGCCGTAG GTCAA	-
blr4637	-2.6	-111.5	Bdiaspc4_24275	hspC2	Hsp20/alpha crystallin family protein	-86	TTGAGCAAA ATCAA	-
blr4644	-3.2	-20.9	Bdiaspc4_24320	-	universal stress protein	-72	TTGATTCG GTCAA	-
blr4645	-2.8	-10.6	Bdiaspc4_24325	-	host attachment protein	-69	TTGATCGGG ATCAA	-
blr4652	-3.1	-95.2	Bdiaspc4_24370	-	nitroreductase	-48	TTGATCGAC ATCAA	blr4652- blr4653- blr4654
blr4653	-2.8	-16.8	Bdiaspc4_24375	dnaJ	J domain-containing protein			-
blr4654	-2.8	-30.0	Bdiaspc4_24380	-	hypothetical protein			-
blr4655	-2.5	-14.2	Bdiaspc4_24385	ppsA	phosphoenolpyruvate synthase	-47	TTGACCTGC CTCAA	-
bsr6066	-4.0	-92.6	Bdiaspc4_31980	-	hypothetical protein	-105	TTGACCTGT CTCAA	bsr6066- blr6067

Query ^a	FC (C183D- <i>fixK₂</i> vs. WT) ^b	FC (Δ <i>fixK₂</i> vs. WT) ^c	Locus_tag ^d	Gene name ^e	Product ^f	Position ^g	Motif ^h	Predicted operon structure ⁱ
blf6067	-2.7	-20.9	Bdiaspc4_31985	-	phage holin family protein			-
blf6073	-3.5	-27.9	Bdiaspc4_32015	<i>phaC2</i>	probable poly-beta-hydroxybutyrate polymerase	-81	TTGATGCA GCTCAA	-
blf6074	-2.7	-90.9	Bdiaspc4_32020	-	CBS domain-containing protein	-143	TTGAGCTG CATCAA	-
blf6525	-2.1	-7.7	Bdiaspc4_34395	-	hypothetical protein	-22	TTGATCTG CATCAA	-
blf7086	-2.3	-97.1	Bdiaspc4_37390	<i>hemN₂</i>	oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase	-140	TTGCGCGA GCGCAA	-
bsr7087	-3.2	-53.8	Bdiaspc4_37395	-	hypothetical protein	-115	TTGCGCTC GCGCAA	bsr7087- blf7088
blf7088	-2.2	-8.1	Bdiaspc4_37400	-	copper chaperone PCu(A)C			-
blf7345	-2.9	-16.8	Bdiaspc4_38745	-	hypothetical protein	-76	TTGATCCG CATCAA	-
blf7986	-2.1	-5.6	Bdiaspc4_42230	-	HlyD family efflux transporter periplasmic adaptor subunit			-
blf7987	-2.5	-17.4	Bdiaspc4_42235	-	ABC transporter permease			-
blf7988	-3.3	-33.1	Bdiaspc4_42240	-	ABC transporter ATP-binding protein	-66	CTGATCTA AATCAA	blf7988- blf7987- blf7986

Query ^a	FC (C183D- <i>fixK</i> ₂ vs. WT) ^b	FC (Δ <i>fixK</i> ₂ vs. WT) ^c	Locus_tag ^d	Gene name ^e	Product ^f	Position ^g	Motif ^h	Predicted operon structure ⁱ
bll7989	-2.6	-5.3	Bdiaspc4_42245	mat	methionine adenosyltransferase	-203	TTGAGCCAA TGCAG	-
bll7990	-3.2	-19.7	Bdiaspc4_42250	-	hypothetical protein			-
bll7991	-2.8	-22.8	Bdiaspc4_42255	-	isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase family protein			-
bsl7992	-2.7	-23.0	Bdiaspc4_42260	-	DUF2933 domain-containing protein	-59	TTGATCTGC GTCAA	bsl7992- bll7991- bll7990
bll7993	-2.8	-8.5	Bdiaspc4_42265	-	hypothetical protein	-60	TTGAGGGAT TGCAA	-

^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). Direct *FixK*₂ targets as defined in (Mesa et al., 2008) or validated by IVT are shaded in grey.

^b Fold change (FC) values of gene expression in the C183D-*fixK*₂ strain in comparison to the WT, both grown under microoxic conditions.

^c FC values of gene expression in cells of Δ *fixK*₂ in comparison to wild-type cells, both grown under microoxic conditions; (Mesa et al., 2008).

- ^d Nomenclature of *B. diazoefficiens* 110s_{pc4} genes according to the NCBI annotation (GenBank acc. # CP032617); (Fernandez et al., 2019).
- ^e Gene name according to the NCBI annotation with modifications (boldfaced) (GenBank acc. # CP032617); (Fernandez et al., 2019).
- ^f Protein/gene product according to the NCBI annotation with modifications (boldfaced) (GenBank acc. # CP032617); (Fernandez 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 Operon structure prediction as previously described; (Mesa et al., 2008).

Capítulo 5.2

Caracterización del dominio de dimerización de la proteína FixK₂

5.2. Caracterización del dominio de dimerización de la proteína FixK₂

5.2.1. Introducción

En la estructura de FixK₂, los residuos 128-154 de la proteína forman parte de la hélice αC probablemente implicada en la interacción hidrofóbica entre monómeros entre las posiciones *a* y *d* de una espiral heptamérica (Bonnet et al., 2013a). Según se ha comentado anteriormente, FixK₂ pertenece a la familia de factores transcripcionales bacterianos de tipo CRP/FNR, que activan la transcripción de sus dianas en colaboración con la ARN polimerasa mediante la unión en forma de dímero a una secuencia conservada localizada en la región promotora de las mismas (Körner et al., 2003). Experimentos de cromatografía de exclusión molecular, descritos por Mesa y colaboradores (2005), indicaron que el estado oligomérico de la proteína FixK₂ tiene un perfil de monómero-dímero en función de la concentración de la proteína. Hay que destacar que la mutación individual en varios residuos de la hélice de dimerización de la proteína FNR de *E. coli* dio lugar a derivados inactivos (Moore y Kiley, 2001). También se ha descrito la importancia de dichos residuos para la actividad de las proteínas CooA de *R. rubrum* (Kerby et al., 2003) y CRP de *E. coli* (Passner et al., 2000), donde al igual que en FNR, la mutación de residuos en las posiciones *a* y *d*, dan lugar a alteraciones tanto en la estabilidad como en la capacidad de interacción con ADN de ambas proteínas.

Por tanto, la caracterización del dominio de dimerización de la proteína FixK₂ es de crucial importancia para avanzar en el conocimiento de la relación estructura-función de la misma y, en consecuencia, comparar su mecanismo molecular con el de otras proteínas de tipo CRP/FNR.

5.2.2. Análisis *in silico* del dominio de dimerización de la proteína FixK₂

Con el fin de analizar las similitudes de la hélice de dimerización de FixK₂ con respecto a otros miembros de la familia de factores trans-

cripciones CRP/FNR, se empleó el programa bioinformático PyMOL® versión 2.2.3. De esta manera se comparó la secuencia de FixK₂ con las proteínas CooA de *R. rubrum* sin efector y CRP de *E. coli* unida a AMPc depositadas en la base de datos PDB (<https://www.rcsb.org/>) (Figura 5.2.1, panel A). Se observó que las proteínas analizadas constaban de dos monómeros y que dimerizan a lo largo de sus hélices C (α C), las cuales se sitúan próximas a los dominios de unión a efector correspondientes. A excepción de FixK₂, las estructuras de estas dos proteínas no eran simétricas, especialmente en el caso de CooA (Figura 5.2.1, panel A). En dicha comparativa no se pudo incluir la proteína FNR de *E. coli* ya que su estructura no está aún disponible.

Por tanto, a continuación, el estudio se focalizó en el análisis de la similitud entre las posiciones *a* y *d* de las hélices α C de las cuatro proteínas de interés (Figura 5.2.1, panel B): FixK₂ de *B. diazoefficiens* (aminoácidos 128-152), FNR de *E. coli* (aminoácidos 137-161), CooA de *R. rubrum* (aminoácidos 106-130) y CRP de *E. coli* (aminoácidos 110-134). El alineamiento de las secuencias de la hélice de dimerización reveló que las posiciones *a* y *d* estaban bastante conservadas y que en su mayoría eran aminoácidos hidrofóbicos. En el caso de FixK₂, se correspondían con los residuos V128, A131, W135, L142, A145, M149 y L152 de la proteína, con la excepción del residuo T138, el cual es polar.

A continuación, se llevó a cabo un análisis *in silico* de las interacciones intermoleculares existentes entre los monómeros de la proteína FixK₂, con un enfoque específico en los planos axiales *a* y *d* de monómeros enfrentados, mediante el soporte bioinformático BIOVIA Discovery Studio Visualizer® (versión 20.1.0.19295) (Figura 5.2.2). Mediante este análisis se determinó el número y tipo de interacciones favorables (como enlaces electrostáticos, enlaces de carbono, puentes de hidrógeno y enlaces hidrofóbicos), así como desfavorables (aceptor-aceptor, donador-donador y estérico) (Tabla 9.2.1).

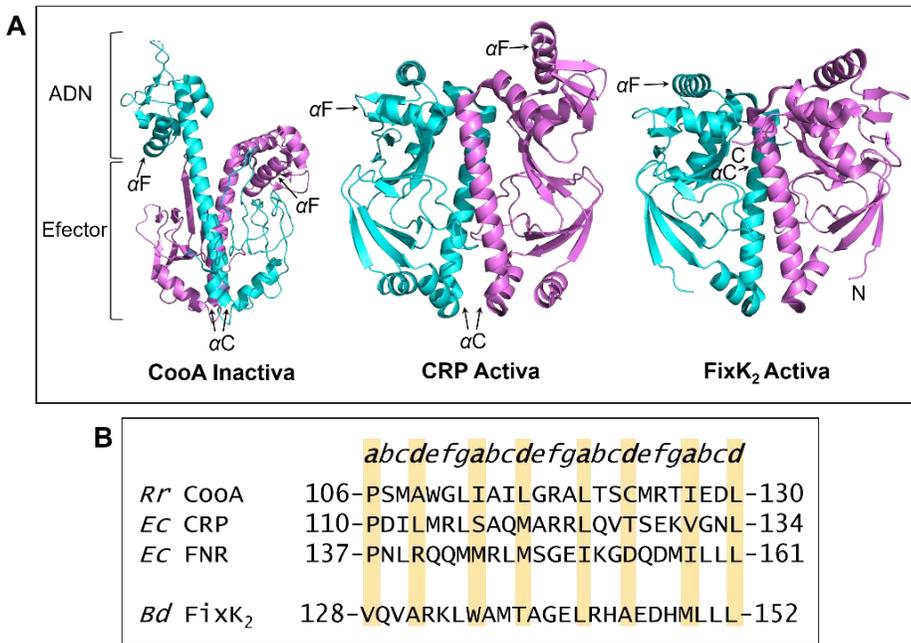


Figura 5.2.1. Comparación de las proteínas CooA, CRP, FNR y FixK₂.

A: Estructuras de CooA sin efector de *R. rubrum* a la izquierda (número de acceso 1FT9), CRP de *E. coli* unida a cAMP en el centro (número de acceso 1G6N) y FixK₂ de *B. diazoefficiens* a la derecha (número de acceso 4I2O). Cada proteína consta de dos monómeros, coloreados en turquesa y rosa, que dimerizan a lo largo de las hélices αC , situadas en la proximidad de los dominios de unión a efector. En estas representaciones, los dominios de unión al ADN están situados en la parte superior de cada estructura (indicado en el lado izquierdo de la figura). Las posiciones de las hélices que interactúan específicamente con el ADN se indican como αF . B: Alineamiento de residuos de las hélices αC de las proteínas CooA, CRP, FNR y FixK₂. Las posiciones *a* y *d* de la hélice de dimerización se indican en negrita. Los residuos de dichas posiciones en la secuencia de las proteínas están sombreados en amarillo. Los números de acceso de las proteínas se corresponden a la base de datos PDB. *Rr*, *R. rubrum*; *Ec*, *E. coli*; *Bd*, *B. diazoefficiens*. Adaptado de Kerby et al., 2003.

En este análisis, además de las interacciones observadas entre los residuos enfrentados de la hélice de dimerización, resultaron de gran interés los aminoácidos E141 y E146, dado que, aunque se

encontraban en posiciones diferentes al plano *a* y *d* de la espiral heptamérica, es decir, en los planos *e* y *g*, sí proporcionaban interacciones negativas intermoleculares entre ambos monómeros (Figura 5.2.2).

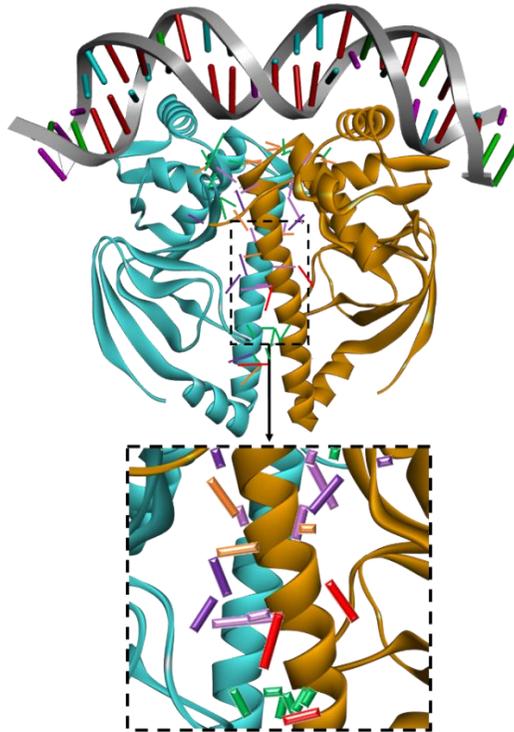


Figura 5.2.2. Representación tridimensional de las interacciones intermoleculares existentes entre los monómeros de FixK₂. Las líneas coloreadas conectan los residuos implicados en las interacciones (rojo: desfavorable; naranja: electroestático; verde: enlace de hidrógeno; magenta y violeta: hidrofóbico). Molécula extraída de la base de datos PDB (código de acceso 4I2O). Análisis procesado con BIOVIA Discovery Studio Visualizer® versión v20.1.0.19295.

5.2.3. Mutagénesis funcional del dominio de dimerización de FixK₂

A continuación, se llevó a cabo un estudio funcional, tanto *in vivo* como *in vitro* de los aminoácidos posiblemente relevantes en la dimerización de FixK₂ en cuanto al estado oligomérico de la proteína, su capacidad de interactuar con ADN y actividad. Para ello, en primer lugar, los residuos de interés se intercambiaron por alanina mediante mutagénesis puntual dirigida. Dicho aminoácido, al no poseer carga, presenta escasa reactividad y, además, debido a su pequeño tamaño, causa en menor medida posibles interacciones moleculares por impedimento estérico. Por lo que es el aminoácido de selección para estudios de mutagénesis funcional.

De los 8 residuos localizados en la interfaz de la hélice de dimerización αC de FixK₂ (Figura 5.2.1, panel B), para realizar el intercambio a alanina, se descartaron los aminoácidos en las posiciones 131 y 145 ya que presentan una alanina en la proteína nativa, así como los dos residuos más distales de la hélice de dimerización, es decir V128 y L152, dada la reducida importancia en estudios anteriores con proteínas ortólogas (Kerby et al., 2003). Por tanto, para ese estudio se seleccionaron las posiciones W135, T138, L142 y M149 de la hélice αC . También se consideraron los residuos E141 y E146 identificados en los estudios de modelización realizados previamente (Figura 5.2.2), que indican su posible papel en la estabilización de las hélices de los monómeros y, en consecuencia, en las interacciones intermoleculares (Figura 5.2.3, panel A y B). Las mutaciones en estos seis residuos conducirían, según la predicción, a alteraciones tanto en el número como en la tipología de interacciones intermoleculares, con una disminución de enlaces favorables en el caso de los planos *a* y *d*, y desfavorables en los planos *e* y *g* (Tabla 6.2.1).

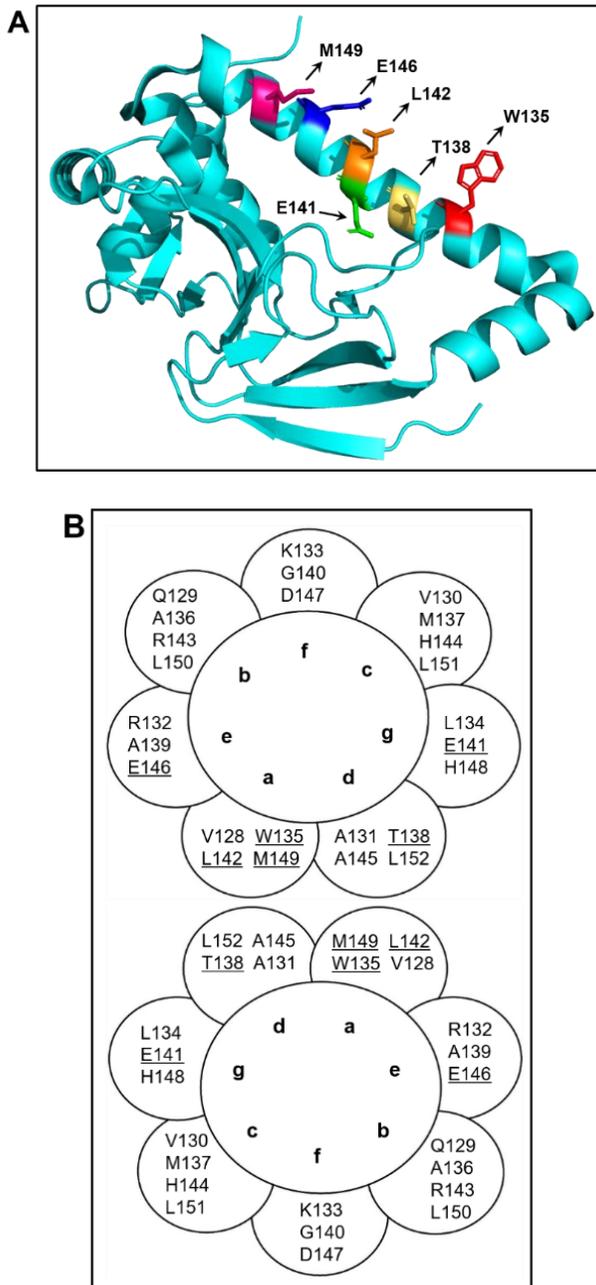


Figura 5.2.3. Mutaciones en el dominio de dimerización de FixK₂. A: Estructura terciaria de la hélice de dimerización de un monómero de FixK₂

en la que puede observarse la posición espacial de los residuos seleccionados para el estudio de mutagénesis funcional (imagen procesada con PyMOL® versión 2.2.3). B: Representación esquemática de un modelo de rueda de la hélice de dimerización de FixK₂ suponiendo que cada vuelta de hélice estándar tiene 3,5 residuos. Se subrayan los residuos seleccionados para mutagénesis a alanina, tanto los localizados en los planos *a* y *d*, así como los situados en las cadenas *e* y *g*.

5.2.3.1. Construcción de derivados de FixK₂ con intercambio a alanina de residuos relevantes

Para la construcción de plásmidos que expresen diferentes derivados con cambios en la hélice de dimerización de FixK₂ se empleó la técnica de mutagénesis puntual dirigida, usando como molde de ADN el plásmido pRJ8848 que codifica un derivado C183S FixK₂ (Figura 5.2.4) y diferentes parejas de oligonucleótidos específicos para cada mutación (Tabla 4.3). El derivado C183S FixK₂ es insensible a oxidación por lo que, de esta manera, se evita la formación de dímeros por puentes de disulfuro que pudieran interferir en los resultados de determinación de estado oligomérico (apartado 5.2.4.2). Por tanto, para facilitar la nomenclatura de los derivados que se obtuvieron en este estudio se eliminó el prefijo “C183S” en los apartados subsiguientes. De esta manera, se obtuvieron los plásmidos pMB1265, pMB1266, pMB1272, pMB1271, pMB1270 y pMB1268 (Figura 5.2.4) que codifican las variantes de FixK₂ con intercambios W135A, T138A, E141A, L142A, E146 y M149 respectivamente, cuya secuencia fue verificada mediante secuenciación con los oligonucleótidos fixK2_4 y fixK2_12 (Tabla 4.3).

Estos plásmidos, una vez verificados por secuenciación, se emplearon como molde para la construcción de plásmidos que expresan derivados FixK₂-Mxe-Inteína-dominio de unión a quitina (CBD), de plásmidos para complementación *in trans* de una cepa Δ fixK₂ de *B. diazoefficiens* y la construcción de cepas de *B. diazoefficiens* con mutaciones puntuales en los residuos de interés.

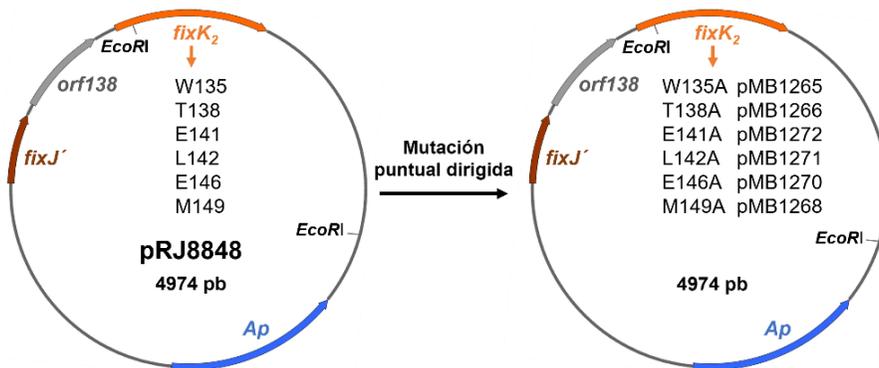


Figura 5.2.4. Esquema de la construcción de los plásmidos pMB1265, pMB1266, pMB1272, pMB1271, pMB1270 y pMB1268. Se indica la estrategia de construcción a partir del plásmido pRJ8848 que codifica un derivado C183S FixK₂, mediante mutagénesis puntual dirigida con oligonucleótidos específicos. Los residuos W135, T138, E141, L142, E146 y M149 de FixK₂ se intercambiaron por alanina.

5.2.3.1.1. Construcción de plásmidos que expresan derivados FixK₂-Mxe-Inteína-CBD

Para expresar y purificar derivados de FixK₂ con mutaciones en el dominio de dimerización como proteínas recombinantes en células de *E. coli* se empleó el sistema IMPACT. Como se ha indicado en apartados anteriores (apartado 4.5.1), en esta metodología, se fusiona en fase en su extremo 3' de forma individual el gen *fixK₂* que expresa las diferentes versiones de la proteína, a una secuencia de ADN que codifica una etiqueta de inteína unida al dominio de unión a quitina (CBD) presente en el vector pTXB1 (Figura 5.2.5, panel A). De esta manera, se obtienen proteínas recombinantes sin aminoácidos extra ya que la etiqueta de inteína-CBD se escinde durante el proceso de purificación.

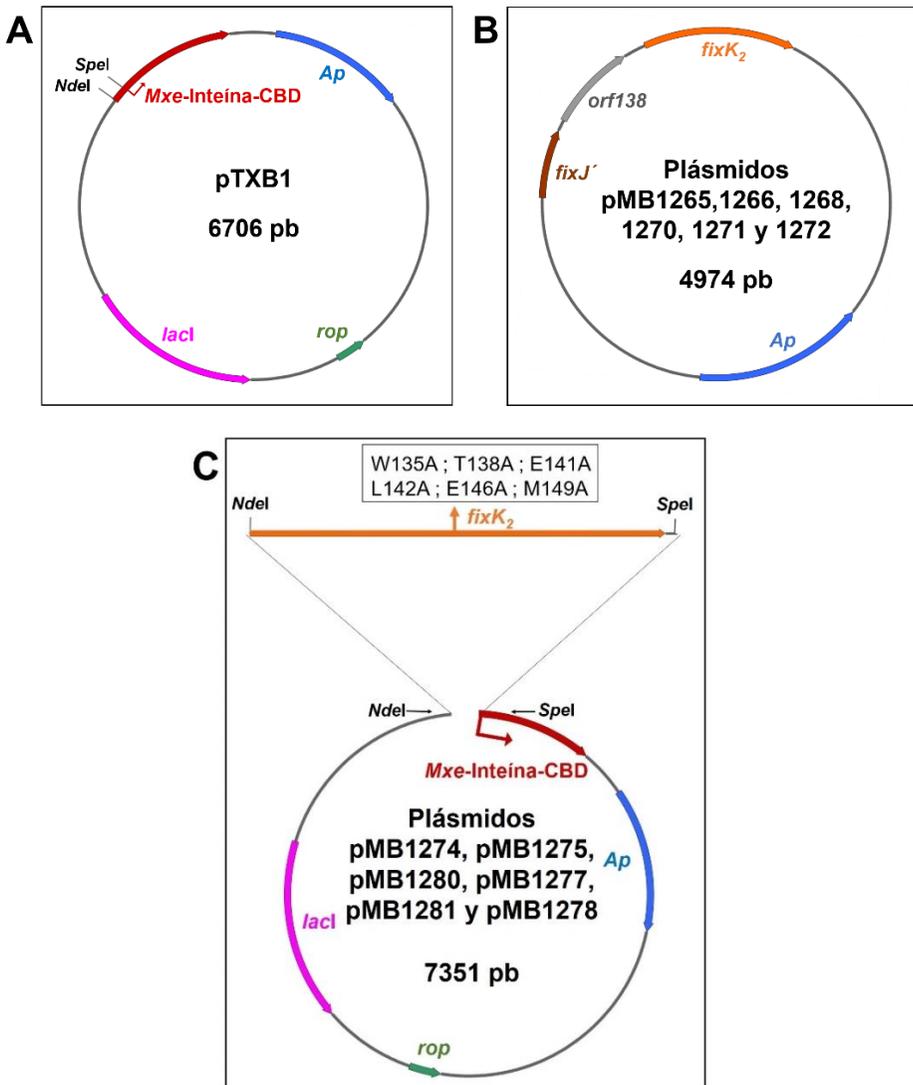


Figura 5.2.5. Estrategia de construcción de plásmidos de expresión de derivados *FixK₂-Mxe-Inteina-CBD*. A: Mapa del plásmido pTXB1 (vector) en el que se indican las dianas de restricción *NdeI*/*SpeI* para la clonación. B: Mapa de los plásmidos pMB1265, pMB1266, pMB1268, pMB1270, pMB1271 y pMB1272, de los cuales se obtienen los fragmentos *NdeI*/*SpeI* de 715 pb con las diferentes versiones del gen *fixK₂*. C: Mapa de los plásmidos pMB1274, pMB1275, pMB1280, pMB1277, pMB1281 y pMB1278

pMB1278 que expresan derivados de FixK₂ unidos en su extremo carboxilo terminal al motivo de inteína-CBD bajo el control del promotor T7.

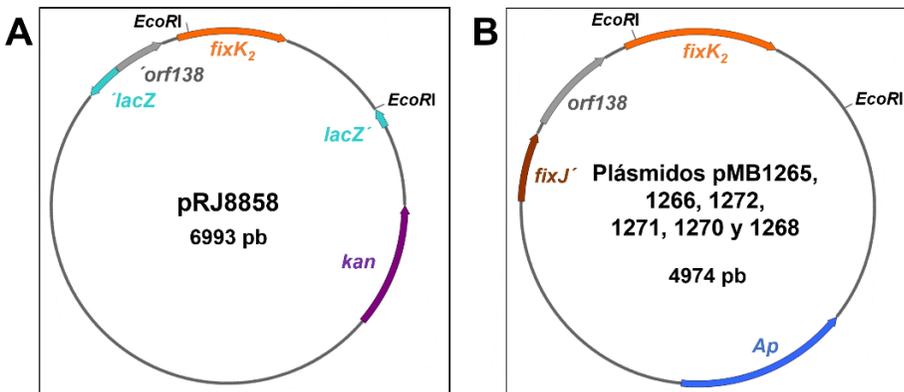
Por tanto, en primer lugar, para clonar en fase en el vector pTXB1 las distintas variantes del gen *fixK₂*, se amplificaron mediante PCR con los oligonucleótidos *fixK₂_mut19* y *fixK₂_mut58*, fragmentos de ADN de 727 pb con extremos *NdeI* y *SpeI*. Como molde se emplearon los plásmidos pMB1265, pMB1266, pMB1272, pMB1271, pMB1270 y pMB1268 (Figura 5.2.5, panel B), que portan las mutaciones W135A, T138A, E141A, L142A, E146A y M149A en el gen *fixK₂*, respectivamente (Tabla 4.2). Dichos productos de PCR, una vez digeridos con las enzimas *NdeI* y *SpeI* se ligaron a un fragmento de 6,636 kb procedente del vector pTXB1 cortado con las mismas enzimas. Los clones resultantes se analizaron mediante perfil de restricción con combinaciones de diferentes enzimas y finalmente, aquellos seleccionados, se secuenciaron con los oligonucleótidos T7 y *ptxb1_2* para verificar la existencia de las mutaciones correctas en la hélice de dimerización y de la fusión en fase con la inteína-CBD, así como para descartar posibles mutaciones no deseadas que afecten a la correcta expresión de la proteína. De esta manera se obtuvieron los plásmidos pMB1274, pMB1275, pMB1280, pMB1277, pMB1281 y pMB1278 (Figura 5.2.5, panel C) que se emplearon para transformar células competentes de *E. coli* ER2566 para la sobre-expresión y purificación de los distintos derivados de la proteína FixK₂.

5.2.3.1.2. Construcción de plásmidos para complementación *in trans* de una cepa Δ *fixK₂* de *B. diazoefficiens*

Puesto que los genes *fixNOQP* se consideran la diana modelo de FixK₂, para analizar el efecto de las diferentes mutaciones en la hélice de dimerización de la proteína sobre su actividad en células de *B. diazoefficiens*, se analizó la expresión de una fusión *fixNOQP-lacZ* en una cepa Δ *fixK₂* complementada *in trans* con plásmidos que expresan las diferentes versiones de la proteína. Para tal fin, se emplearon los plásmidos pMB1265, pMB1266, pMB1272, pMB1271,

pMB1270 y pMB1268 (Apartado 5.2.3.1.1) que codifican las variantes W135A FixK₂, T138A FixK₂, E141A FixK₂, L142A FixK₂, E146A FixK₂ y M149A FixK₂ respectivamente, los cuales se digirieron con la enzima *EcoRI*, y los fragmentos de 1,314 kb resultantes se insertaron en el plásmido pRJ8858 (Tabla 4.2), cortado y linearizado con la misma enzima, para dar lugar a los plásmidos pMB1282, pMB1283, pMB1287, pMB1285, pMB1288 y pMB1286 (Figura 5.2.6). Tras el clonaje, los candidatos seleccionados se verificaron mediante PCR con combinaciones de oligonucleótidos específicos que hibridan en regiones internas y externas al inserto. En concreto, se emplearon las combinaciones de oligonucleótidos *fixK2_3/fixK2_12* y *T3/fixK2_12* (Tabla 4.3). Así mismo, se verificaron mediante secuenciación con los oligonucleótidos *T7* y *fixK2_7*.

Una vez verificados, los plásmidos obtenidos se transfirieron mediante conjugación biparental desde células competentes de *E. coli* S17.1 a las cepas 110*spc4*-1121 (Δ *fixK*₂) y 110*spc4*-1121-3603 (Δ *fixK*₂ con la fusión *fixNOQP*'-'*lacZ*). La presencia de los plásmidos en los transconjugantes se verificó mediante PCR con los mismos oligonucleótidos utilizados para la construcción. Se seleccionó un candidato para cada derivado que se empleó en experimentos subsiguientes.



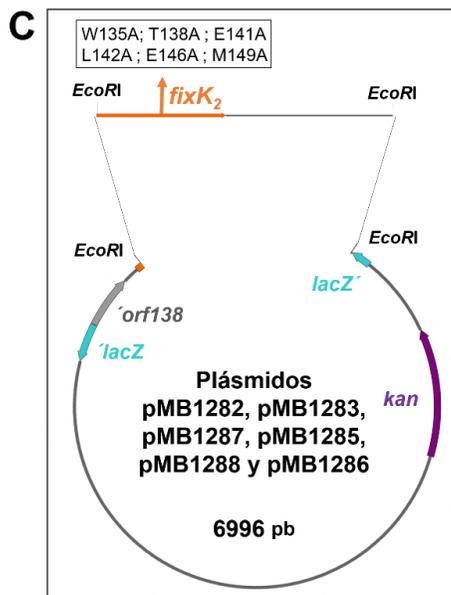


Figura 5.2.6. Estrategia de construcción plásmidos para complementación *in trans* de una cepa $\Delta fixK_2$ con la fusión $fixP'$ - $lacZ$. A: Mapa del plásmido pRJ8858 (vector) en el que se indican las dianas de restricción *EcoRI* para la clonación. B: Mapa de los plásmidos pMB1265, pMB1266, pMB1272, pMB1271, pMB1270 y pMB1268, de los cuales se obtienen los fragmentos *EcoRI* de 1314 pb con las diferentes versiones del gen *fixK₂*. C: Mapa de los plásmidos pMB1282, pMB1283, pMB1287, pMB1285, pMB1288 y pMB1286.

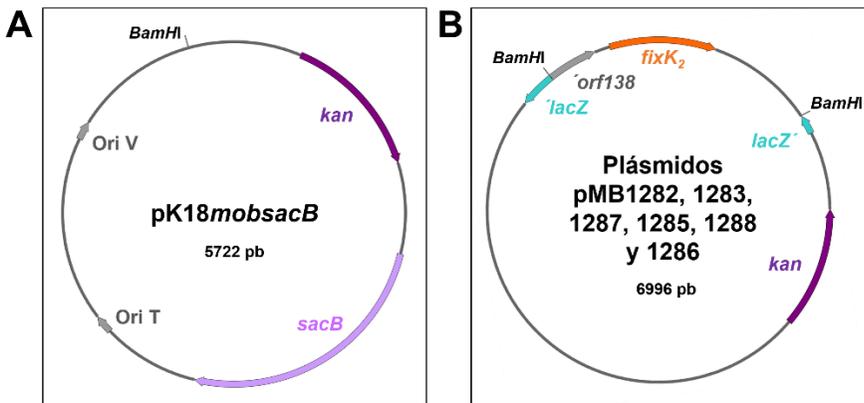
5.2.3.1.3. Construcción de cepas de *B. diazoefficiens* con mutaciones puntuales en el gen *fixK₂*

La construcción de cepas de *B. diazoefficiens* que codifican los diferentes derivados de FixK₂ con mutaciones en la hélice de dimerización se llevó a cabo mediante la técnica de mutagénesis sin marcador descrita por Schäfer et al. (1994) e implementada en nuestro grupo de investigación (Cabrera et al., 2016) (apartado 4.4.16). Para ello, los plásmidos pMB1282, pMB1287, pMB1285, pMB1288 y pMB1286 que codifican los derivados W135A FixK₂, E141A FixK₂,

L142A FixK₂, E146A FixK₂ y M149A FixK₂ respectivamente, se digirieron con la enzima *Bam*HI, y el fragmento de 1,849 Kb resultante se ligó con un fragmento de 5,722 Kb procedente del plásmido pK18*mobsacB* digerido con la misma enzima. De esta manera se obtuvieron los plásmidos pMB1295, pMB1298, pMB1296, pMB1299 y pMB1297, respectivamente (Figura 5.2.7). No se consideró necesaria la construcción de una cepa codificante del derivado T138A FixK₂ dado que en ensayos *in vitro* (apartado 5.2.4) no se detectaron diferencias significativas con respecto a la proteína parental.

Se seleccionaron diversos candidatos para cada uno de los derivados y la inserción correcta de los insertos se analizó mediante PCR con los oligonucleótidos Kan1 y M13rev. Finalmente, se verificó la secuencia de los mismos mediante secuenciación con los oligonucleótidos T7 y fixK2_7.

Una vez verificados, se transfirió un candidato de cada derivado a células competentes de *E. coli* S17.1, que a su vez se utilizaron como donadoras en conjugaciones biparentales con la cepa de *B. diazoefficiens* 8855 que codifica C183S FixK₂ (véase tabla 4.1). Tras la conjugación se seleccionaron aquellos transconjugantes que crecieron en presencia de kanamicina, en los cuales, *a priori*, había tenido lugar un fenómeno de recombinación simple (cointegrados) (Figura 5.2.8, paneles A y B).



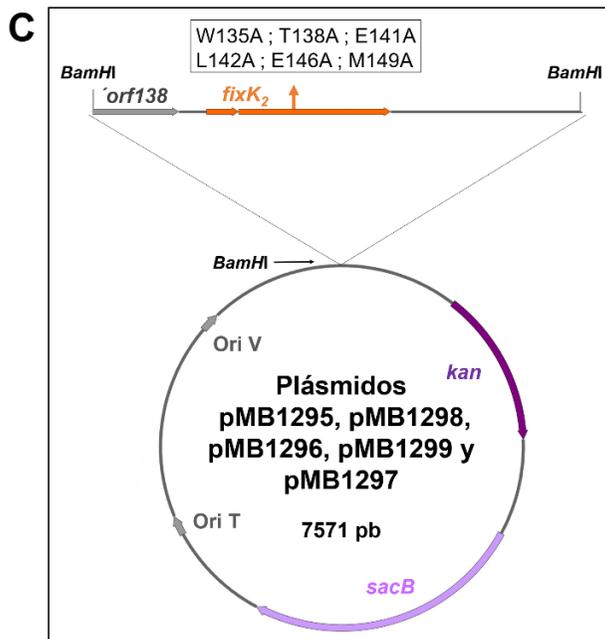
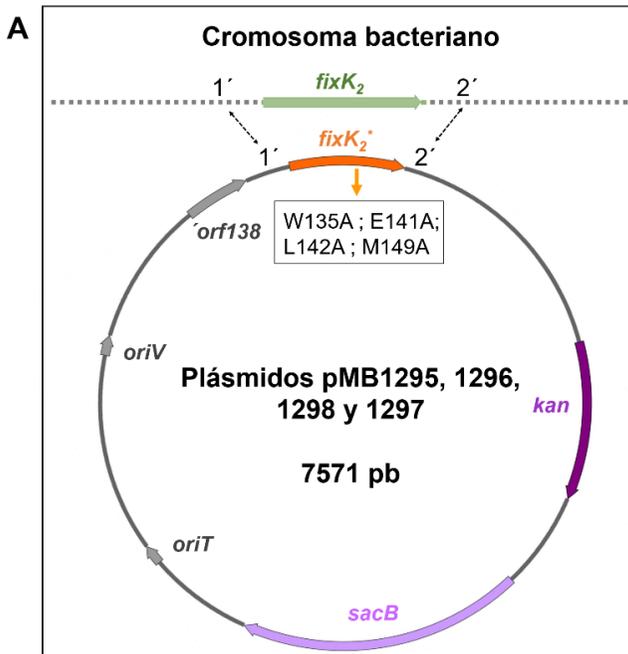


Figura 5.2.7. Esquema de la estrategia de construcción de los plásmidos pMB1295, pMB1298, pMB1296, pMB1299 y pMB1297. A: Mapa del plásmido pK18*mobsacB* (vector) en el que se indica la diana de restricción *Bam*HI para la clonación. B: Mapa de los plásmidos pMB1282, pMB1283, pMB1287, pMB1285, pMB1288 y pMB1286, de los cuales se obtienen los fragmentos *Bam*HI de 1849 pb con las diferentes versiones del gen *fixK*₂. C: Mapa de los plásmidos pMB1295, pMB1298, pMB1296, pMB1299 y pMB1297.

Para su verificación, se realizó un cribado mediante PCR con los oligonucleótidos *fixK2_8* (que hibrida en el cromosoma bacteriano) y M13for (que hibrida en el ADN plasmídico), de manera que se amplificaría un fragmento de 1,934 kb únicamente en células recombinantes (Figura 5.2.8, panel B). Posteriormente, los clones seleccionados se sembraron en presencia de sacarosa con el objeto de forzar la segunda recombinación, en la cual, en la cepa mutante, se reemplaza la copia parental del gen *fixK*₂, y se eliminan los genes de la kanamicina y *sacB* (Figura 5.2.8, panel C). Las colonias que crecieron se sembraron en estría en placas de PSY suplementadas

o no con kanamicina y se eligieron aquellas sensibles a este anti-biótico, lo que correspondería con el genotipo esperado de la cepa mutante o a la reversión a la cepa parental.

Los clones elegidos se verificaron mediante secuenciación con el oligonucleótido *fixK2_4* de productos de PCR 1,943 kb presentes en la cepa silvestre y en la doble recombinante (pero no en los coin-tegrados) resultado de la amplificación con los oligonucleótidos *fixK2_8* y *fixK2_9* (Figura 5.2.8). Se seleccionó un candidato por cepa que codifica cada uno de los seis derivados de la proteína *FixK2* para los experimentos subsiguientes. No se pudo obtener la cepa que codifica el derivado E146A *FixK2*.



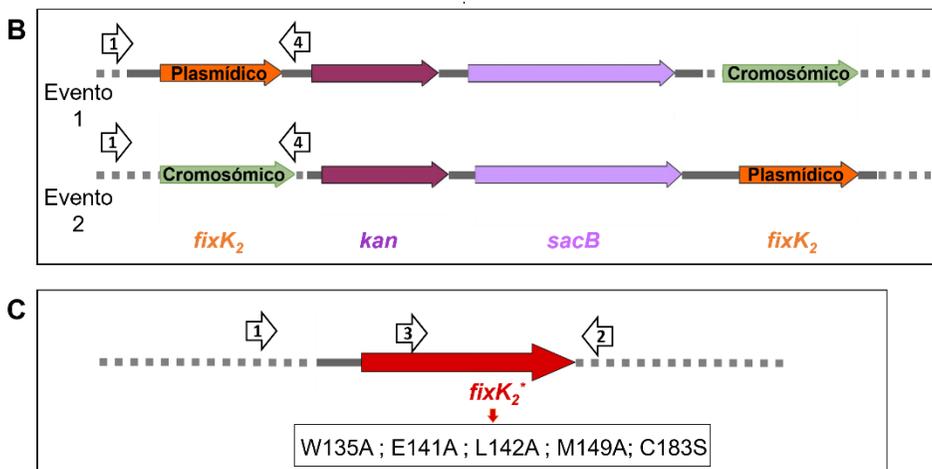


Figura 5.2.8. Representación esquemática de la construcción de las cepas 1295, 1296, 1297 y 1298 de *B. diazoefficiens*. A: Intercambio de la copia parental del gen *fixK₂* del cromosoma (indicado en verde) por el de la copia que codifica los derivados W135A, E141A, L142A y M149A (indicado en naranja con asterisco), en los plásmidos pMB1295, pMB1296, pMB1298 y pMB1297 respectivamente. B: En la primera recombinación se obtienen dos tipos de cointegrados (evento 1 y evento 2) dependiendo del lugar en donde ocurra la recombinación (1' o 2' respectivamente, panel A). C: La segunda recombinación en presencia de sacarosa, puede dar lugar a la situación original (cepa parental) o a la cepa mutante (mostrada en la figura). Flecha verde, gen *fixK₂* silvestre; flecha naranja, gen *fixK₂* con mutaciones puntuales (*fixK₂**), flecha roja, gen *fixK₂* con mutaciones puntuales integradas en el cromosoma bacteriano tras segundo evento de recombinación. Las flechas numeradas como 1, 2, 3 y 4 hacen referencia a las posiciones donde hibridan los oligonucleótidos *fixK₂_8*, *fixK₂_9*, *fixK₂_4* y M13for respectivamente, utilizados para verificación mediante PCR del doble recombinante.

5.2.4. Caracterización *in vitro* de derivados de FixK₂

5.2.4.1. Expresión y purificación de derivados FixK₂-Mxe-Inteína-CBD

Los cultivos de células de *E. coli* ER2566 transformadas individualmente con los plásmidos pMB1274, pMB1275, pMB1280,

pMB1277, pMB1281 y pMB1278 se incubaron a 37°C hasta que alcanzaron una DO_{600nm} de 0,3 (alrededor de 2 h). Seguidamente, las células se incubaron a 30°C durante 1 h hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,6-0,8. En ese momento, se tomó una alícuota de 1 ml de los cultivos y a continuación, se adicionó 0,1 mM de IPTG. Tras la incubación de las células a 16°C durante 12 h, se tomó otra alícuota de 1 ml y el resto de células se recogieron por centrifugación a 5.500 x g durante 7 minutos. El análisis de los lisados de los cultivos antes y después de la adición de IPTG en PAGE-SDS reveló que una concentración de 0,1 mM en el medio es suficiente para inducir la expresión de los diferentes derivados de FixK₂ (Figura 5.2.9).

Para cada lote de purificación de cada una de las proteínas se emplearon 500 ml de cultivo de *E. coli* ER2566 con los plásmidos pMB1274, pMB1275, pMB1277, pMB1278, pMB1280 y pMB1281.

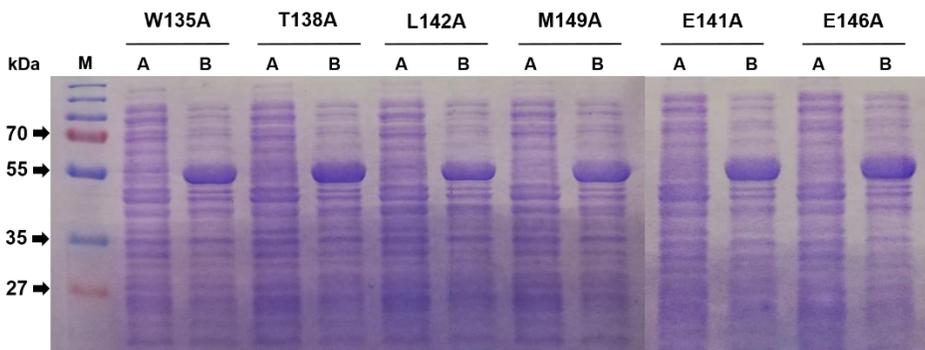


Figura 5.2.9. Sobre-expresión de derivados de la proteína FixK₂-Mxe-Inteína-CBD. Las células de *E. coli* ER2566 con los plásmidos pMB1274, pMB1275, pMB1277, pMB1278, pMB1280 y pMB1281 (en orden según la figura) se cultivaron a 30°C durante 2 h. Tras añadir 0,1 mM de IPTG, se lisaron, se realizó una electroforesis PAGE-SDS, y posteriormente, el gel fue teñido con azul de Coomassie. Se tomó una alícuota del cultivo previo a la inducción por IPTG (carriles A) y otra alícuota después de 2 h de incubación con IPTG donde se puede observar la banda de aproximadamente 53,4 kDa correspondiente a los derivados FixK₂-Mxe-Inteína-CBD (carriles B). El primer carril corresponde al marcador molecular de proteínas (M) *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific). El tamaño molecular, en kDa, y la posición de las proteínas marcadoras se indican en el margen izquierdo de la figura.

Tras el fraccionamiento celular (para más detalles véase el apartado 4.5.1 de materiales y métodos), se diluyó el sobrenadante con *column buffer* (Tabla 4.6), el cual se cargó sobre la columna, empaquetada con resina de quitina. Seguidamente, 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 aminoácidos extra, mientras que la inteína junto con el CBD quedan adheridos a la matriz de quitina de la columna. La elución de la proteína pura sin etiqueta se llevó a cabo en fracciones de 0,5 ml de *column buffer*. Finalmente, se intercambié este tampón con *happy buffer* mediante el empleo de columnas PD-10 (con matriz de Sephadex G-25M). De esta manera se obtuvieron las proteínas correspondientes a una banda de aproximadamente 25,6 kDa con una pureza del 97% (Figura 5.2.10) y un rendimiento de entre 3 y 12 mg/litro de cultivo.

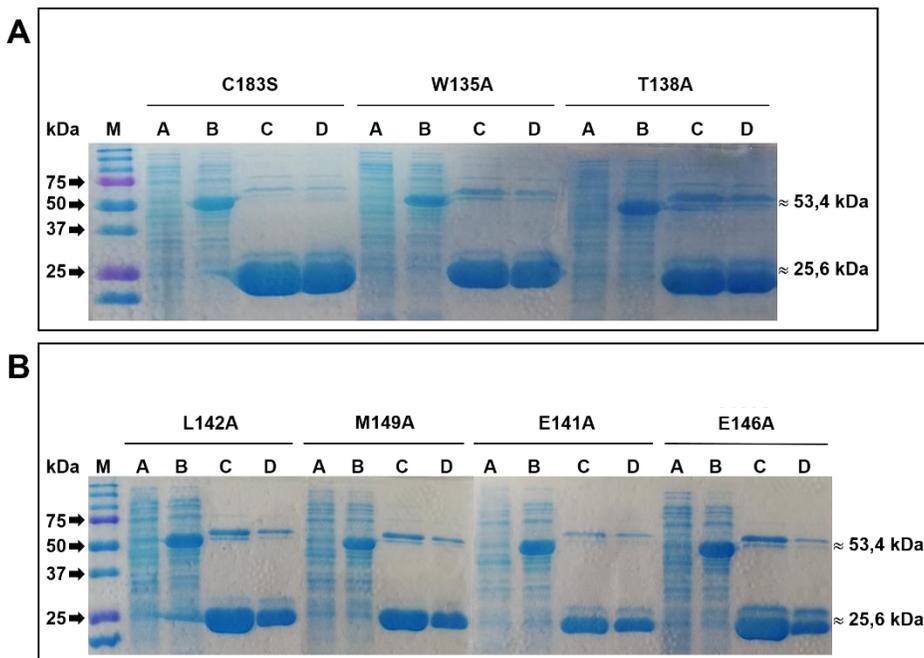


Figura 5.2.10. Análisis en PAGE-SDS de distintas etapas de la purificación de los derivados de proteína FixK₂ con el sistema IMPACT. Las células de *E. coli* ER2566 portadoras de los plásmidos de expresión

de proteínas FixK₂-Mxe-Inteína-CBD 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. Los carriles A y B representan lisados celulares antes y después de la inducción con IPTG respectivamente. La escisión con DTT y posterior elución de FixK₂ con *column buffer* se muestra en los carriles C. Las soluciones de proteína en *happy buffer* se muestran en los carriles D. En el margen derecho de la figura se indican las bandas de 53,4 kDa y 25,6 kDa correspondientes a las proteínas FixK₂-Mxe-Inteína-CBD y FixK₂ purificada, respectivamente. El primer carril corresponde a marcador molecular de proteínas (M) *Precision Plus Protein WesternC Standards* (BIO-RAD). El tamaño molecular, en kDa, y la posición de las proteínas marcadoras se indican en el margen izquierdo de la figura.

5.2.4.2. Determinación del estado oligomérico de los derivados de FixK₂

Tal y como se ha comentado anteriormente, los miembros de la familia de factores transcripcionales bacterianos de tipo CRP/FNR, a la que pertenece FixK₂, activan la transcripción de sus genes diana mediante la unión a la región promotora de los mismos en forma de dímero. Por lo que suscita interés analizar, mediante cromatografía de exclusión molecular, cómo la sustitución a alanina de los residuos W135, T138, E141, L142, E146 y M149 en FixK₂ afecta al estado oligomérico de la proteína.

Para ello, en primer lugar, se realizó una curva de calibración (Figura 9.1.2) con diferentes proteínas de tamaños moleculares conocidos, empleando una columna Superdex 200 10/300 GL con parámetros de concentración de proteínas, volumen y presión de la columna y velocidad de flujo definidos (véase apartado 4.3.11). Estos resultados permitieron determinar un volumen de elución aproximado correspondiente a las masas moleculares de FixK₂ tanto en forma de monómero (25,6 kDa) como de dímero (53,4 kDa) que se correspondieron con 15,9 ml y 14,8 ml, respectivamente. A continuación, se procedió a analizar, bajo las mismas condiciones analíticas, diferentes concentraciones de cada derivado de proteína (2,5,

5, 10, 20 y 40 μM) por duplicado. El derivado C183S FixK₂ se empleó como proteína de referencia, ya que al no ser susceptible a oxidación (Bonnet et al., 2013a), resulta idóneo para el análisis del estado oligomérico bajo condiciones de atmósfera no controlada. Los datos obtenidos fueron normalizados y procesados informáticamente para su correcta interpretación (véase apartado 4.3.11).

La proteína de referencia mostró un perfil de elución dependiente de la concentración tal como se observó en ensayos previos (Mesa et al., 2005). De hecho, a una concentración por debajo de 40 μM hay una prevalencia de elución en forma de monómero (Figura 5.2.11, panel A). El perfil de elución de los distintos derivados resultó también ser dependiente de la concentración, si bien, su estado oligomérico, en cuanto al equilibrio monómero-dímero, difiere del de la proteína de referencia, y depende, a su vez, de la mutación introducida. En el caso de los derivados con intercambios W135A, L142A, E146A y M149A (Figura 5.2.11, paneles B, E, F y G), la proporción de monómero fue mayoritaria en cualquiera de las concentraciones analizadas, especialmente para los derivados W135A y L142A, donde la presencia de dímero fue prácticamente ausente en todos los ensayos. El derivado T138A (Figura 5.2.11, panel C), mostró un perfil de elución similar al de la proteína de referencia. Por otra parte, y a diferencia de los casos anteriormente mencionados, el derivado E141A, mostró un perfil cromatográfico radicalmente diferente (Figura 5.2.11, panel D), en el cual se observó una prevalencia en forma de dímero por encima de una concentración de 10 μM . Sin embargo, por debajo de esa concentración, el derivado E141A eluyó principalmente como monómero.

La naturaleza asimétrica y amplia de los picos (perfil de cola) presente en todos los derivados, sugiere que alguna fracción de la población de la forma dimérica se disocia mientras se desplaza a través de la columna. La variación de los distintos parámetros experimentales (presión, flujo, volumen de muestra, etc.) no dieron lugar a resultados con picos más simétricos (datos no mostrados), tal como se ha descrito en estudios anteriores (Mesa et al., 2005).

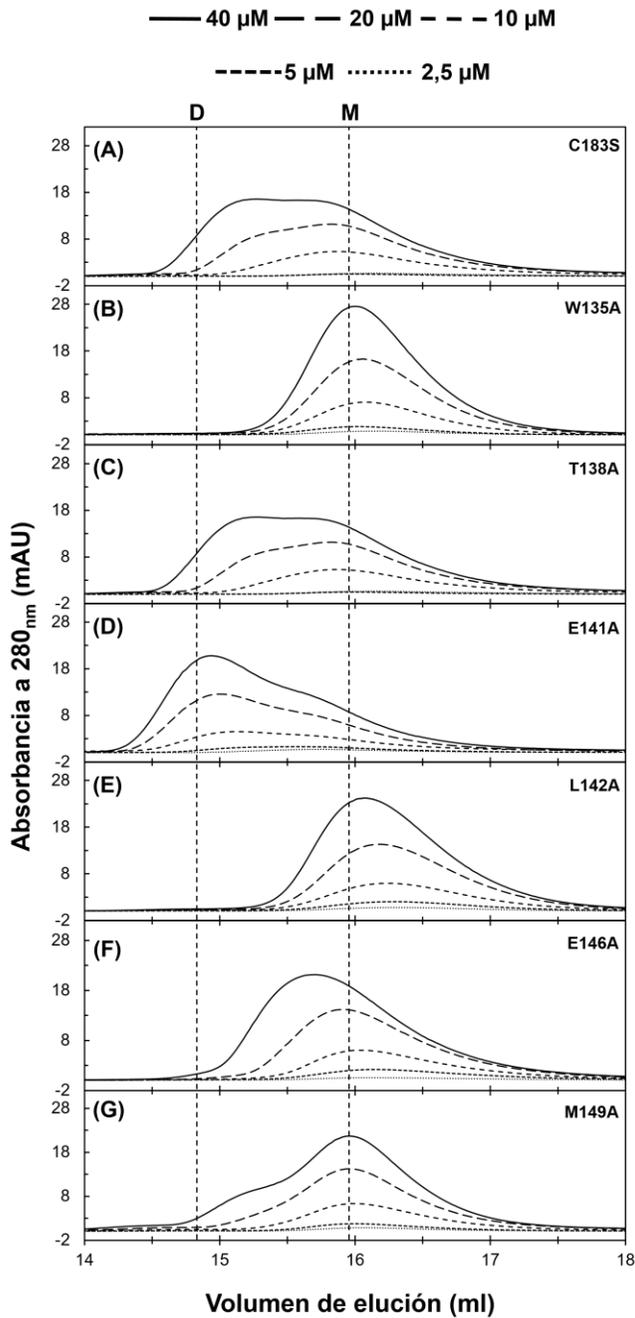


Figura 5.2.11. Análisis del estado oligomérico de diferentes derivados de FixK₂ por cromatografía de exclusión molecular. Se muestran los cromatogramas del perfil de elución en una columna Superdex™ 200

10/300 GL de diferentes concentraciones de las proteínas analizadas en base a la absorbancia a 280 nm. Las líneas verticales discontinuas indican el volumen de elución de las fracciones dimérica (D, a la izquierda) y monomérica (M, a la derecha), según los estándares utilizados para la calibración. C183S (A), W135A (B), T138A (C), E141A (D), L142A (E), E146A (F) y M149A (G). Las concentraciones de las proteínas (5-40 μ M) se indican en la parte superior de la figura. mAU: unidades de absorbancia.

5.2.4.3. Efecto de las mutaciones en la hélice de dimerización en la capacidad de interactuar con ADN de FixK₂

La capacidad interactuar con ADN de los distintos derivados de FixK₂ con mutaciones en la hélice de dimerización se analizó mediante resonancia de plasmones de superficie (RPS). Esta metodología, permite estudiar interacciones moleculares a tiempo real, de manera que se obtienen parámetros tanto de afinidad, como de asociación y disociación de complejos moleculares.

Con el fin de realizar los experimentos de RPS, se inmovilizaron, en un biosensor de estreptavidina (Sensor Chip SA), oligonucleótidos de doble cadena que contenían la caja FixK₂ presente en el promotor del operón *fixNOQP* (apartado 4.6.2). Seguidamente, se analizó la respuesta (unidades de resonancia [UR]) en función del tiempo obtenidas al pasar un rango de concentraciones de los distintos derivados de proteína FixK₂ purificada (Figura 5.2.12). Igual que en los ensayos anteriores, se empleó como proteína de referencia el derivado C183S FixK₂.

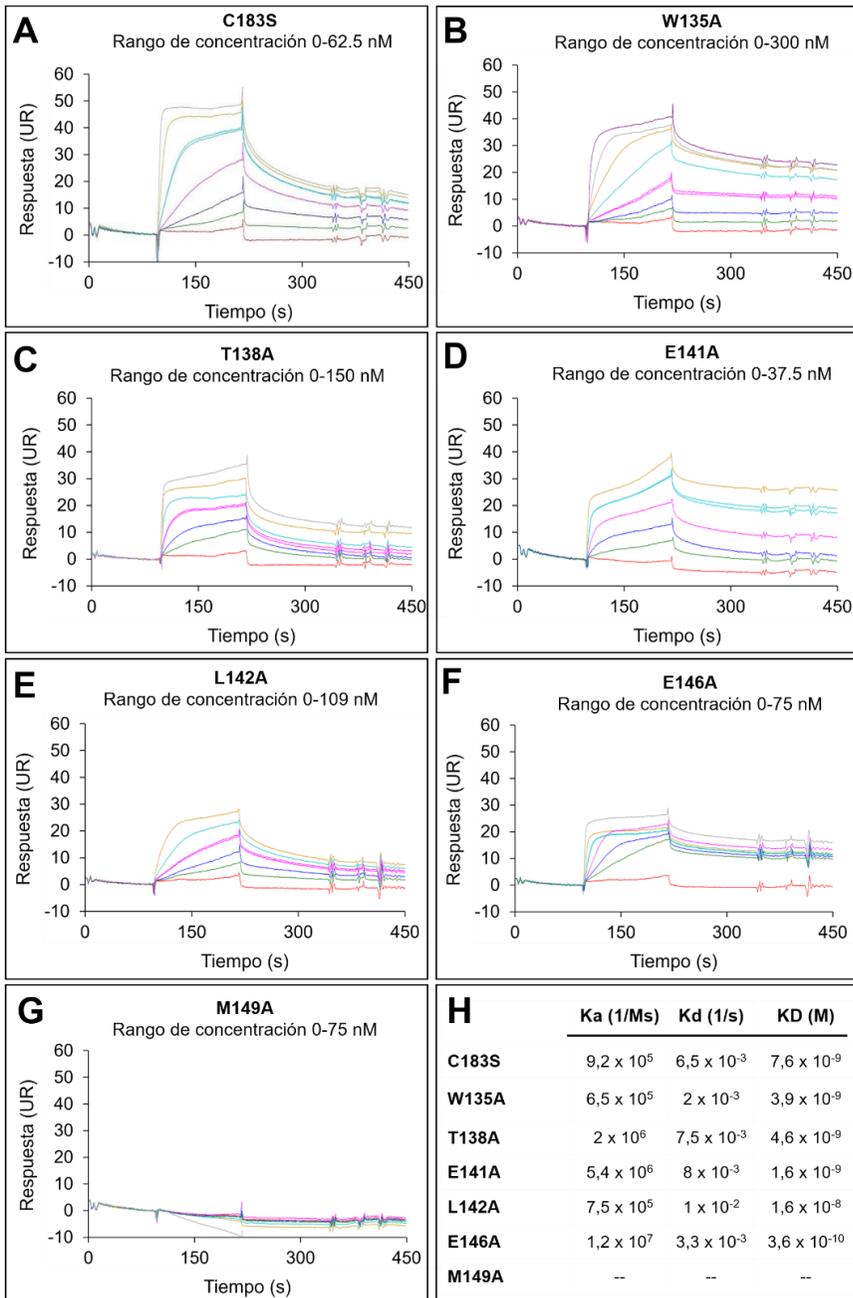


Figura 5.2.12. Interacción de los derivados de FixK₂ con mutaciones en la hélice de dimerización con la caja FixK₂ presente en el promotor de los genes *fixNOQP*. Mediante RPS se analizó la interacción que se

produce al pasar un flujo de distintas concentraciones de los derivados de la proteína FixK₂, desde el segundo 100 hasta 4 min. Se obtiene un sensorgrama donde se representan las unidades de respuesta (UR) en función del tiempo (s), a fin de analizar el grado de afinidad de las proteínas al promotor modelo *fixNOQP*, así como determinar las constantes de asociación y disociación del complejo proteína-ADN. Como control se utilizó la proteína C183S FixK₂ (A). Los derivados analizados fueron: W135A (B); T138A (C); E141A (D); L142A (E); E146A (F); M149A (G). Constantes de asociación (K_a), disociación (K_d) y afinidad (K_D) calculadas mediante un modelo cinético 1:1 (proteína dimérica:ADN de doble cadena) (H). En la parte superior de cada sensorgrama se indica el nombre de cada una de las proteínas, así como el rango de concentraciones empleado en cada experimento.

En los sensorgramas obtenidos, la proteína de referencia C183S FixK₂ interaccionó de forma específica con la caja modelo *fixNOQP* (Figura 5.2.12, panel A), con una constante de afinidad (K_D) de $7,6 \times 10^{-9}$ M y unas constantes de asociación (K_a) y de disociación (K_d) de $9,2 \times 10^5$ M⁻¹ s⁻¹ y $6,5 \times 10^{-3}$ s⁻¹, respectivamente, de acuerdo a un modelo cinético de interacción de un dímero de proteína por molécula de ADN, lo cual está en línea con resultados publicados anteriormente en nuestro grupo de investigación (Cabrera et al., 2021).

Los perfiles de interacción con ADN de los diferentes derivados de FixK₂ con mutaciones en la hélice de dimerización, mostraron una variabilidad en relación a las constantes de afinidad, asociación y disociación (Figura 5.2.12, paneles B-H). Los derivados W135A, T138A y E141A mostraron una afinidad por ADN ligeramente mejor que la de la proteína de referencia, mientras que, con excepción del derivado W135A, se disocian más rápidamente de ADN. Sin embargo, en el caso de los derivados T138A y E141A, la constante de asociación se vio ligeramente mejorada, a diferencia de aquella de la proteína con intercambio W135A en el que la asociación con ADN es ligeramente inferior. En cuanto al derivado L142A presentó menor afinidad por ADN con una asociación más lenta y disociación

más rápida que las de la proteína parental. Curiosamente, el derivado E146A mostró una mejor constante de afinidad ($3,6 \times 10^{-10}$ M) por el promotor *fixNOQP*, además de una mejor constante de asociación ($1,2 \times 10^7$ M⁻¹ s⁻¹) y una disociación más lenta ($3,3 \times 10^{-3}$). Esto contrasta con el comportamiento del derivado E141A. Finalmente, a diferencia de todo lo descrito, el derivado M149A fue incapaz de interactuar con la caja FixK₂ modelo (Figura 5.2.12, panel G), dado que no alcanza los parámetros de calidad, las unidades máximas de respuesta (UR) esperadas, ni permite calcular las constantes según un modelo cinético o de afinidad *steady-state*.

5.2.4.4. Ensayos de IVT de derivados de FixK₂ sobre la transcripción del promotor *fixNOQP*

Para determinar la actividad de estas proteínas *in vitro*, se realizó un análisis de la capacidad de activar la transcripción del promotor modelo *fixNOQP* en colaboración con la ARN polimerasa de *B. diazoefficiens* en ensayos de IVT en presencia de distintas concentraciones de la batería de de proteínas recombinantes purificadas (0.25, 0.5, 1.25 y 2.5 μM de dímero). En estos experimentos, se detectan dos tipos de transcritos, uno control de 107 nt e independiente de FixK₂, y otro de 243 nt y específico para el promotor *fixNOQP* (Figura 5.2.13), mientras que en ausencia de proteína solo se detecta el transcrito control (Figura 5.2.13, carril 1). Es importante indicar que, la intensidad del transcrito específico cuando se empleó la proteína parental C183S FixK₂ (Figura 5.2.13, carriles 2-5), se toma como referencia para determinar la capacidad para activar la transcripción de los diferentes derivados.

En el caso de los derivados W135A FixK₂, E141 FixK₂, y L142A FixK₂ con intercambios a alanina en las posiciones 135, 141 y 142, se observó una considerable reducción en la intensidad del transcrito dependiente de FixK₂ (Figura 5.2.13, carriles 6-8; 12-14; 15-17), en comparación a aquellas bandas específicas obtenidas con la proteína de referencia, independientemente de la concentración empleada. Estos resultados se relacionan con una disminución de transcripción mediada por la proteína FixK₂ debido a la mutación introducida. Este efecto fue aún más acusado en el derivado M149A

FixK₂ (Figura 5.2.13, carriles 22-24) ya que intensidad de la banda del transcrito específico fue alrededor el 20% del correspondiente al de la proteína parental cuando se empleó una concentración de 2,5 μM (Figura 5.2.13, carril 24 en comparación con el carril 5).

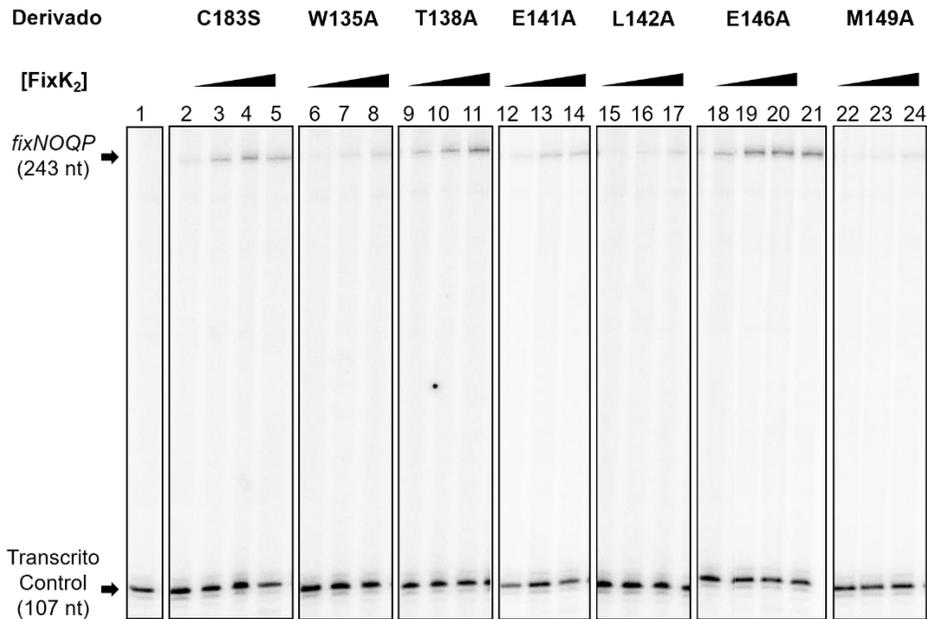


Figura 5.2.13. Transcripción del promotor *fixNOQP* mediado por diferentes derivados de FixK₂. Se llevaron a cabo ensayos de activación de la transcripción *in vitro* (IVT) en ronda múltiple del promotor del operón *fixNOQP* clonado en la parte 5' de un terminador transcripcional en el plásmido pRJ9519 con cantidades crecientes de distintas variantes de proteína FixK₂ purificadas que se indican en la parte superior de cada panel y ARN polimerasa de *B. diazoefficiens*. Las reacciones se incubaron a 37°C durante 30 minutos. En el margen izquierdo de la figura se indican los tamaños de los transcritos control y dependientes de FixK₂. Carril 1: Sin proteína; carriles 2 y 18: 0,25 μM; carriles 3, 6, 9, 12, 15, 19 y 22: 0,5 μM; carriles 4, 7, 10, 13, 16, 20 y 23: 1,25 μM; carriles 5, 8, 11, 14, 17, 21 y 24: 2,5 μM. nt, nucleótidos.

Por el contrario, la proteína T138A FixK₂ presentó unos niveles de actividad equiparables a los de la proteína de referencia (Figura

5.2.13, carriles 9-11), e incluso la intensidad del transcrito específico inducido por una concentración de 2,5 μM de la proteína fue ligeramente superior (Figura 5.2.13, carril 11 en comparación con el carril 5). Finalmente, cuando se empleó el derivado E146A FixK₂ (Figura 5.2.13, carriles 18-21) hubo un incremento en la intensidad del transcrito específico con respecto a la proteína parental y, además, se alcanzó la saturación a una concentración de 0,5 μM .

5.2.5. Caracterización *in vivo*

5.2.5.1. Ensayos con derivados de la cepa ΔfixK_2 complementados *in trans*

5.2.5.1.1. Efecto de las mutaciones en la hélice de dimerización de FixK₂ sobre la expresión de los genes *fixNOQP*

El operón *fixNOQP*, que codifica la oxidasa de alta afinidad por oxígeno *ccb*₃, necesaria para la respiración del bacteroide en el ambiente microóxico de los nódulos, es la diana directa modelo de la proteína FixK₂ (Mesa et al., 2005; Cabrera et al., 2021). Por ello, con el objeto de analizar si el intercambio a alanina de los aminoácidos seleccionados en la hélice de dimerización afectan o no a la actividad de la proteína FixK₂ en células de *B. diazoefficiens*, se determinó la actividad β -galactosidasa de una fusión *fixNOQP*'-'*lacZ* en la cepa ΔfixK_2 complementada con los plásmidos pMB1282, pMB1283, pMB1287, pMB1285, pMB1288 y pMB1286 cultivada en condiciones microóxicas. Como controles se incluyeron: (i) la cepa ΔfixK_2 con el vector pBBR1MCS-2, con el objeto de excluir cualquier artefacto en la actividad β -galactosidasa debido a la presencia del mismo; (ii) la cepa ΔfixK_2 complementada con el plásmido pRJ8857 que codifica C183S FixK₂, como control positivo.

La cepa ΔfixK_2 con el vector pBBR1MCS-2 dio lugar a valores basales de actividad de la fusión *fixNOQP*'-'*lacZ*. Sin embargo, cuando se complementó con los plásmidos pMB1282, pMB1283, pMB1287, pMB1285, pMB1288 y pMB1286, los valores de β -galactosidasa fueron solo ligeramente inferiores (entre el 75 y el 91%) a los que se determinaron en la cepa complementada con el plásmido pRJ8857, que codifica la proteína de referencia. Esto contrasta, en

su mayoría, con los resultados previos de RPS e IVT, (Figura 5.2.14), a excepción del derivado T138A FixK₂, donde se pudieron correlacionar los resultados *in vivo* con aquellos obtenidos *in vitro*. Un caso significativo es el fenotipo de la cepa $\Delta fixK_2$ complementada con el plásmido pMB1288, que codifica el derivado E146A FixK₂. En este caso, la expresión de la fusión *fixNOQP*'-*lacZ* fue inferior a la esperada, ya que en los ensayos *in vitro*, tanto su capacidad de interactuar con ADN como su actividad, fueron mejores que los de la proteína parental.

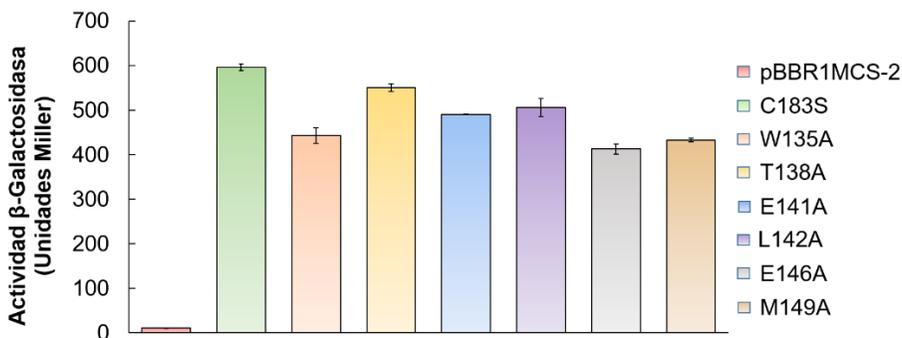


Figura 5.2.14. Actividad β-galactosidasa de la fusión *fixNOQP*'-*lacZ* en la cepa $\Delta fixK_2$ de *B. diazoefficiens* complementada con diferentes versiones de la proteína FixK₂. Las células de *B. diazoefficiens* se cultivaron en medio PSY en condiciones de microoxia (0,5% O₂) durante 48 h. Los derivados de FixK₂ codificados por cada uno de los plásmidos empleados para la complementación, así como el vector, se indican en la parte derecha del gráfico. Los valores muestran la media de tres réplicas técnicas procedentes de dos cultivos independientes. Las barras de error representan la desviación estándar de un ensayo representativo.

5.2.5.1.2. Efecto de las mutaciones en la hélice de dimerización de FixK₂ sobre la capacidad de crecer en condiciones desnitrificantes de células de *B. diazoefficiens*

Dado que algunos de los genes implicados en el proceso de desnitrificación en *B. diazoefficiens* son dianas directas de FixK₂ (véase apartado 2.5.1), se analizó el efecto de las distintas mutaciones en

la hélice de dimerización de FixK₂ en la capacidad de crecer de la bacteria en anoxia en presencia de nitrato (condiciones desnitrificantes).

Para ello, una cepa $\Delta fixK_2$ se complementó con los plásmidos pMB1282, pMB1283, pMB1287, pMB1285, pMB1288 y pMB1286 que codifican los diferentes derivados proteicos. Como control negativo del experimento, se empleó esta misma cepa con el vector pBBR1MCS-2, mientras que como control positivo se incluyó un derivado de la cepa $\Delta fixK_2$ complementada con el plásmido pRJ8857 (que codifica C183S FixK₂).

Después de 7 días de crecimiento, cuando se alcanzó la fase estacionaria, no se observaron diferencias significativas entre las cepas, a excepción de la empleada como control negativo, que fue incapaz de crecer en condiciones desnitrificantes (Figura 5.2.15, panel A). Como era esperable, no hubo crecimiento de ninguna de las cepas cuando no se adicionó nitrato al medio de cultivo (Figura 5.2.15, panel B).

Los resultados *in vivo* obtenidos con los derivados de la cepa $\Delta fixK_2$ complementada, en cuanto a la expresión de la fusión *fixNOQP'-lacZ*, así como el fenotipo relativo al crecimiento en condiciones desnitrificantes, no se pudieron correlacionar completamente con los datos obtenidos en experimentos *in vitro* (estado oligomérico, interacción proteína-ADN, activación de la transcripción en ensayos de IVT) y por consiguiente, en la funcionalidad de determinados residuos de la hélice de dimerización en el correcto funcionamiento de la proteína FixK₂. Es por ello, que se realizó un estudio similar con cepas de *B. diazoefficiens* con mutaciones puntuales en los residuos de la hélice de dimerización insertadas en el cromosoma bacteriano.

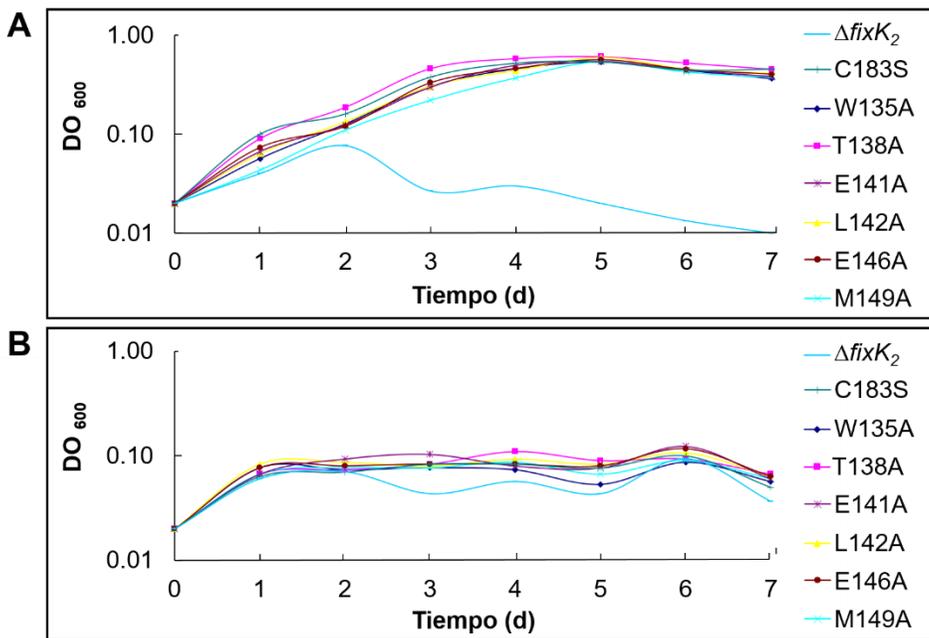


Figura 5.2.15. Curva de crecimiento en condiciones desnitrificantes de células de la cepa $\Delta fixK_2$ de *B. diazoefficiens* complementada con una batería de plásmidos. Los cultivos en medio YEM suplementado con nitrato (panel A) y sin nitrato (panel B) se inocularon con las diferentes cepas a una DO_{600} inicial de 0,02 y se cultivaron durante 7 días en anoxia (tubo lleno). Las barras de error representan la desviación estándar de las medidas de tres réplicas técnicas de un ensayo representativo procedente de dos cultivos independientes.

5.2.5.2. Ensayos con cepas de *B. diazoefficiens* con mutaciones puntuales en *fixK₂*

5.2.5.2.1. Efecto de las mutaciones en la hélice de dimerización de *FixK₂* sobre la expresión de los genes *fixNOQP*

Con objeto de llevar a cabo dicho estudio, en primer lugar, se transfirió el plásmido pRJ3603, con una fusión *fixNOQP'*-*lacZ* a las cepas de *B. diazoefficiens* 1295, 1298, 1296 y 1297 con mutaciones

W135A, E141A, L142A y M149A en FixK₂, respectivamente. En estos ensayos no se pudo incluir la cepa que codifica el derivado E146A ya que no estaba disponible en el momento de experimentación.

Las células de *B. diazoefficiens* se cultivaron en condiciones microóxicas durante 48 h, con una DO₆₀₀ de partida de 0,2 durante 48 h (para más detalles consultar apartado 4.3.1). Como control negativo y positivo, respectivamente, se emplearon las cepas Δ fixK₂ y parental C183S FixK₂, ambas con la fusión *fixNOQP'*-*lacZ* integrada en su cromosoma.

Los resultados obtenidos en los ensayos de actividad β -galactosidasa mostraron, como cabía a esperar, niveles basales de expresión en la cepa Δ fixK₂ (Figura 5.2.16). En la misma línea de los resultados obtenidos con células de cepas complementadas, todas las mutaciones en FixK₂ dieron lugar a una ligera disminución de la expresión de la fusión *fixNOQP'*-*lacZ*, de manera que los valores de actividad β -galactosidasa se redujeron entorno a un 20% con respecto a los de la cepa parental.

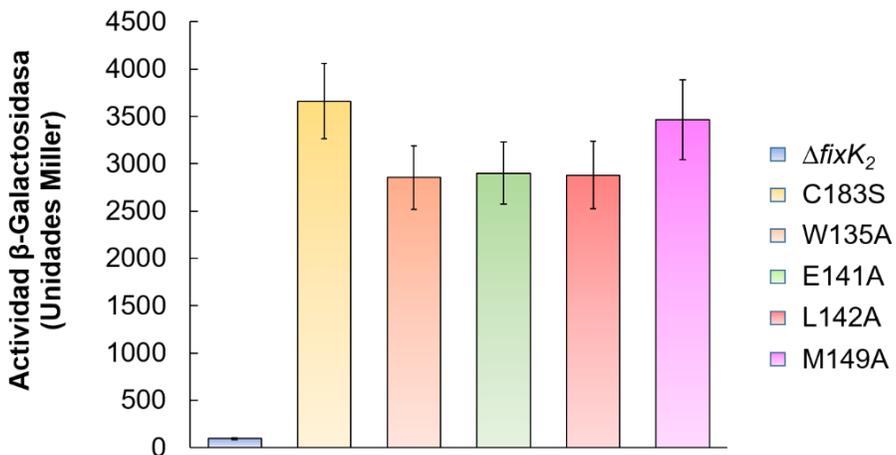


Figura 5.2.16. Actividad β -galactosidasa de la fusión *fixNOQP'*-*lacZ* en cepas de *B. diazoefficiens* parental y mutantes en *fixK*₂. Las células se cultivaron en medio PSY en condiciones de microóxicas (0,5% O₂) durante 48 h. La cepa que codifica el derivado C183S FixK₂ se empleó como

control positivo, mientras que la cepa $\Delta fixK_2$ se empleó como control negativo en el experimento. Los valores representan la media de tres réplicas técnicas procedentes de dos cultivos independientes. Las barras de error se corresponden con la desviación estándar de un ensayo representativo.

Los resultados obtenidos con las cepas que codifican los derivados W135A FixK₂, y L142A FixK₂ seguirían la tendencia de aquellos obtenidos *in vitro*, en los cuales se observó una mayor proporción de monómero y menor capacidad de activar la transcripción en ensayos de IVT, si bien el efecto sobre la expresión de la fusión *fixNOQP'*-*lacZ* no fue tan acusado como el que cabía de esperar. Este mismo fenotipo *in vivo* puede apreciarse en la cepa que codifica el derivado E141A FixK₂, a pesar de que, a diferencia de los dos casos anteriormente descritos, este derivado mostró una mayor proporción de la forma dimérica en ensayos de cromatografía de exclusión molecular. Curiosamente, en el caso del derivado M149A FixK₂, a pesar no interactuar con el ADN prototipo y de tener disminuida la capacidad de activar la transcripción del promotor modelo, los niveles de expresión de la fusión *fixNOQP'*-*lacZ* fueron en células de *B. diazoefficiens* cultivadas en condiciones de microoxia similares a los de la proteína parental (Figura 5.2.16). Estos resultados muestran una gran semejanza con aquellos de la cepa que codifica el derivado C183D FixK₂ tanto *in vitro* como *in vivo* (sección 5.1), en la cual la actividad atenuada de la proteína en ensayos de RPS e IVT, se veía compensada con niveles superiores de la misma en células de *B. diazoefficiens* (Parejo et al., 2022).

5.2.5.2.2. Efecto de las mutaciones en la hélice de dimerización de FixK₂ sobre la capacidad de crecer en condiciones desnitrificantes de células de *B. diazoefficiens*

Al igual que en las cepas complementadas, se determinó la capacidad de crecer en condiciones desnitrificantes de las cepas de *B. diazoefficiens* 1295, 1298, 1296 y 1297, que codifican los derivados W135A, E141A, L142A y M149A, respectivamente. Se utilizó la cepa 8855 como control positivo y una cepa $\Delta fixK_2$ como control

negativo. Después de 7 días de crecimiento hasta alcanzar la fase estacionaria, al igual de lo observado para las cepas complementadas, no se observaron diferencias significativas entre las cepas 1295, 1298, 1296 y 1297 con respecto a la parental 8855. Como cabía esperar, la cepa $\Delta fixK_2$ fue incapaz de crecer en dichas condiciones (Figura 5.2.17).

Los resultados obtenidos indicarían que la mutación en los residuos W135, E141, L142 y M149 no afecta a la capacidad de crecer en condiciones desnitrificantes de *B. diazoefficiens*, lo cual, *a priori*, estarían en contraposición a lo esperado de acuerdo a los resultados obtenidos *in vitro* pero en la misma línea que los datos de expresión de la fusión *fixNOQP'-lacZ*.

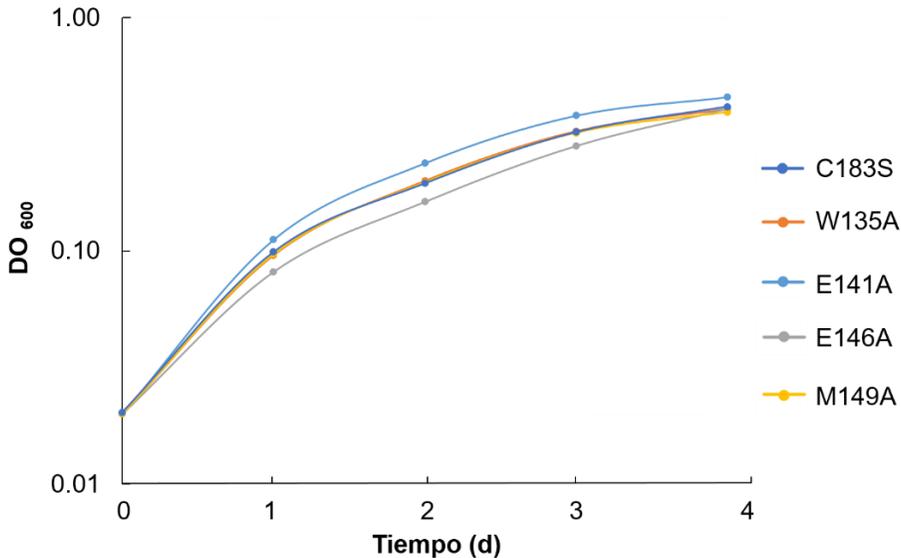


Figura 5.2.17. Crecimiento en condiciones desnitrificantes de las cepas *B. diazoefficiens* parental y mutantes en *fixK*₂. Las células se inocularon a una DO₆₀₀ inicial de 0,02 y se cultivaron durante 4 días en anoxia en medio YEM suplementado con nitrato. Las barras de error representan la desviación estándar de las medidas de tres réplicas técnicas de un ensayo representativo procedente de dos cultivos independientes.

5.2.5.2.3. Análisis de los niveles de derivados de FixK₂ en células de *B. diazoefficiens*

Para investigar si la ausencia de fenotipo *in vivo* en las cepas con mutaciones en la hélice de dimerización era debida a una compensación de la actividad de FixK₂ mediante sobre-expresión e incremento de los niveles de proteína intracelulares, se determinó la abundancia de cada una de las proteínas en células cultivadas en medio PSY en condiciones microóxicas (0,5% O₂) a una DO₆₀₀ ~ 0,5 (para más información consulte apartado 4.3.7.1).

Según se puede observar en la Figura 5.2.18, en la fracción soluble de los cultivos, se detectó una banda de aproximadamente 25,63 kDa, que se corresponde con la masa molecular teórica de la proteína FixK₂. Mientras que los niveles de proteína en las cepas que codifican los derivados W135A y E141A fueron similares a los detectados en la cepa parental, la intensidad de la banda fue ligeramente inferior con respecto a la parental (aproximadamente del 20%), en el caso de la cepa que codifica el derivado L142A, (Figura 5.2.18). Sin embargo, en la cepa con la mutación M149A los niveles de proteína fueron alrededor de un 40% superiores a los observados en la cepa que codifica la proteína de referencia. Estos resultados indicarían que solamente en este último caso en la variante de FixK₂ con intercambio M149A, existiría un mecanismo compensatorio *in vivo* para contrarrestar su menor capacidad de interaccionar con ADN y actividad *in vitro* (IVT y RPS), lo cual da lugar a ausencia de fenotipo en cuanto al crecimiento en condiciones desnitrificantes. Este mecanismo ya fue descrito previamente en la cepa que codifica el derivado C183D FixK₂ (apartado 5.1.5). Pero aún se desconocen las razones por las que la expresión de una fusión *fixNOQP'*-*'lacZ* fueron similares en la cepa que codifica el derivado E141A.

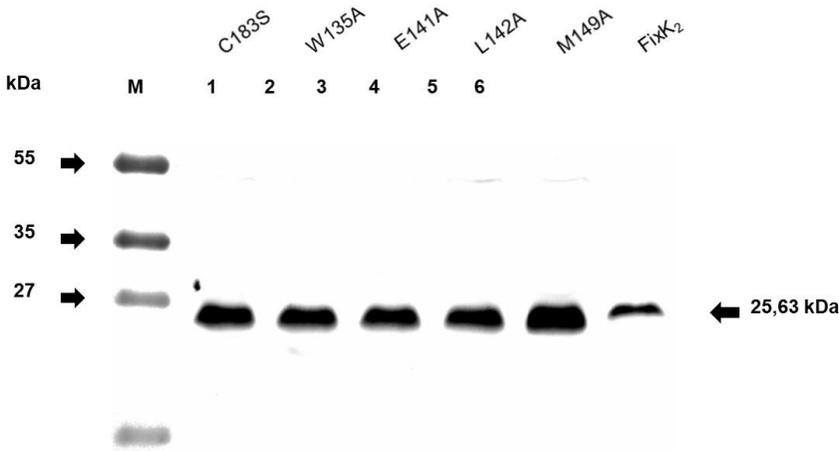


Figura 5.2.18. Niveles de derivados de FixK₂ en células de *B. diazoefficiens* cultivadas en condiciones de microoxia. Las cepas 8855, 1295, 1298, 1296 y 1297 que codifican los derivados C183S (proteína de referencia), W135A, E141A, L142A y M149A, respectivamente (carriles 1, 2, 3, 4 y 5), se cultivaron en medio PSY en condiciones microóxicas (0,5% O₂) a una DO₆₀₀ ~ 0,5. Se cargaron 40 µg de fracción soluble y 2 ng de proteína FixK₂ purificada (carril 6). La inmunodetección se realizó con un anticuerpo policlonal anti-FixK₂ (Mesa et al., 2009) tratado con extracto celular de una cepa Δ fixK₂ de *B. diazoefficiens* cultivada en condiciones microóxicas (Mesa et al., 2009). La masa molecular aparente de FixK₂ (25,63 kDa) se indica a la derecha. Se muestran los resultados de un experimento representativo de al menos tres réplicas biológicas independientes.

Capítulo 5.3

Modelización molecular proteína-ligando para la identificación del cofactor de FixK₂

5.3. Modelización molecular proteína-ligando para la identificación del cofactor de FixK₂

5.3.1. Introducción

Numerosos estudios anteriores revelan la importancia de cofactores en la regulación mediada por proteínas de la familia CRP/FNR, a la que pertenece FixK₂. Estas proteínas son capaces de responder a un amplio espectro de serie de señales intracelulares y medioambientales, tales como AMP cíclico (AMPC), anoxia, estado redox, estrés oxidativo y nitrosativo, óxido nítrico (NO), monóxido de carbono (CO), 2-oxoglutarato o temperatura, entre otros (revisado en Körner et al., 2003). Para ello, los miembros de la familia CRP/FNR poseen módulos sensoriales que les permiten la unión a efectores o grupos prostéticos que interaccionan con la señal. Un ejemplo relevante es el caso de la proteína CRP de *E. coli*, la primera que se caracterizó dentro de esta familia y que da origen a su nombre, la cual modula su actividad en función de los niveles de AMPC, su molécula efectora (Passner y Steitz, 1997; Passner et al., 2000; revisado en Körner et al., 2003; Evangelista et al., 2021).

Aunque proteína FixK₂ recombinante purificada es capaz de activar la transcripción *in vitro* de los genes que regula sin necesidad de ningún cofactor (Mesa et al., 2005), la estructura del complejo FixK₂-ADN reveló la presencia de una cavidad con carga negativa en cada uno de los monómeros que indica la posible unión a una molécula efectora (Bonnet et al., 2013a) (Figura 5.3.1).

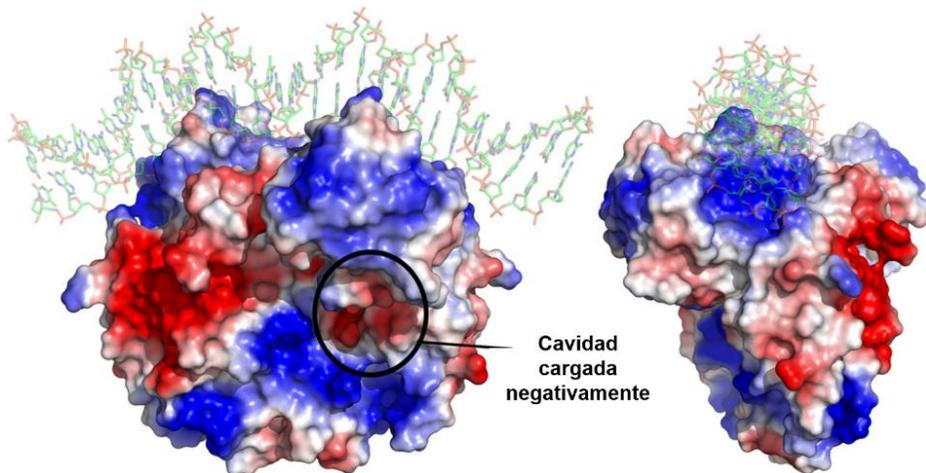


Figura 5.3.1. Visualización de la superficie eléctrica de la proteína FixK₂. La estructura del complejo FixK₂-ADN presenta una cavidad con carga negativa en cada uno de los monómeros (marcada con un círculo en uno de ellos) que indica la posible unión a una molécula efectora (adaptado de Bonnet et al., 2013a). Carga negativa (rojo), carga positiva (azul), carga neutra (blanco). Imagen obtenida con PyMOL® versión 2.2.3.

Dada la ingente cantidad de moléculas existentes en la naturaleza que pudieran actuar como efectores y, por tanto, las dificultades asociadas para su identificación *in vivo*, para abordar la identificación del posible cofactor que pudiera estar involucrado en la modulación de la actividad de FixK₂, se propuso llevar a cabo una modelización molecular FixK₂-ligando. Para ello, se emplearon distintos programas de bioinformática disponibles en el grupo del Dr. Xavier Barril (Universidad de Barcelona, España) descritos en Materiales y Métodos, con objeto de analizar la estructura cristalina de FixK₂, especialmente la cavidad con carga negativa, posible candidata a actuar como región de unión de la molécula efectora. Esta aproximación *in silico* incluye las siguientes etapas: (i) el procesamiento de la estructura cristalina de FixK₂, (ii) la identificación de los puntos farmacofóricos, (iii) la generación de la cavidad de la proteína, (iv) el acoplamiento dinámico (*docking*) y procesamiento de ligandos (*clustering*) y finalmente, (v) el desacoplamiento dinámico (*undocking*). Con este proceso, se

esperaba el poder definir familias o grupos de moléculas como posibles candidatos para su verificación en futuros ensayos *in vitro* con proteína FixK₂ recombinante purificada y en última instancia, abordar ensayos *in vivo*.

5.3.2. Procesamiento de la estructura cristalina de FixK₂

En primer lugar, se descargó la estructura de FixK₂ en complejo con ADN, obtenida mediante difracción de rayos X a una resolución de 1,77 Å de la base de datos PDB (número de acceso 4I2O; Bonnet et al., 2013a). Cabe mencionar que, para la preparación de la proteína para las fases posteriores del proceso descrito, es fundamental la eliminación de moléculas de agua presentes en la estructura que no son esenciales para la estabilidad del complejo, la protonación de la misma y la adición de átomos ausentes en la estructura original con el programa MOE[®] 2016 (apartado 4.7.2). Los resultados de este proceso se muestran en la Figura 5.3.2.

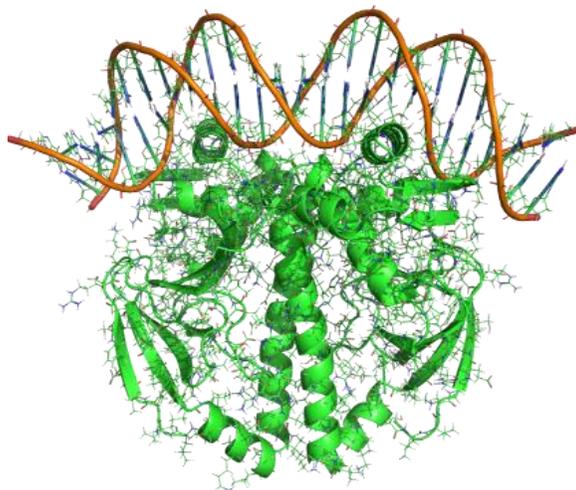


Figura. 5.3.2. Imagen de la estructura de la proteína FixK₂ en complejo con ADN. Imagen de la estructura del complejo FixK₂-ADN descargada de la base de datos PDB (número de acceso 4I2O; Bonnet et al., 2013a) procesada con el software MOE[®] 2016 para la eliminación de moléculas de agua, protonación y adición de átomos ausentes en la estructura de la proteína.

5.3.3. Identificación de puntos farmacofóricos

El término “farmacóforo” es una descripción abstracta de las características moleculares necesarias para el reconocimiento molecular de un ligando por una macromolécula biológica. La IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), define un farmacóforo como “conjunto de características estéricas y electrónicas necesarias para asegurar las interacciones supramoleculares óptimas con una diana biológica específica y para desencadenar (o bloquear) su respuesta biológica”. Un modelo de farmacóforo explica cómo ligandos estructuralmente diversos pueden unirse a un receptor común. Además, los modelos de farmacóforos se pueden utilizar para identificar, mediante un diseño *de novo* o un cribado virtual, nuevos ligandos que pueden unirse a un mismo receptor.

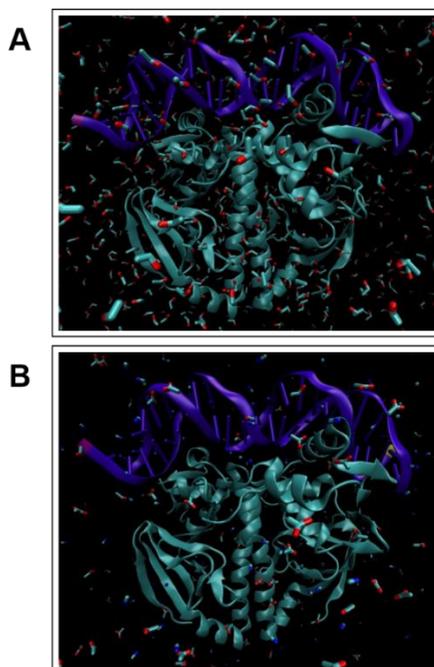


Figura 5.3.3 Control de solvatación y marcaje de zonas apolares, polares, aniónicas y catiónicas. A: Interacción de FixK₂ con moléculas de agua y etanol (1 foto cada 1000 pasos; 1 paso=0,02 picosegundos). B: Interacción de FixK₂ con moléculas de acetato de amonio (1 foto cada

5000 pasos). Visualización con el programa VMD versión 1.9.3 del procesado bioinformático mediante pyMDMix versión 2.7.3.

Con objeto de identificar los puntos farmacofóricos existentes en la proteína FixK₂, y especialmente en la cavidad descrita para su estudio, se llevaron a cabo una serie de simulaciones con superordenadores mediante la herramienta bioinformática pyMDMix versión 2.7.3 (apartado 4.7.2.2). Para ello, en primer lugar, se descargaron las librerías requeridas por el sistema. A continuación, se analizó la interacción de la proteína con moléculas de agua (control de solvatación) y etanol (marcaje de zonas apolares y polares) (1 foto cada 1000 pasos; paso=0,02 picosegundos) (Figura 5.3.3, panel A). En paralelo, con otro superordenador, se realizó la simulación de interacción de la proteína con acetato de amonio (proporciona cargas positivas y negativas al procesado de la proteína) (1 foto cada 5000 pasos) (Figura 5.3.3, panel B). Se predijeron las conformaciones de mínima energía durante la etapa de “Minimización”, y se sometió a la proteína a ciclos de 100, 200, 250 y 300 °K, a una presión en el último ciclo de 0,987 atmósferas durante la etapa de “Equilibración”, con la finalidad de disminuir el peso de la simulación y acelerar el análisis. Para su correcto análisis *in silico*, estos resultados fueron visualizados mediante el soporte bioinformático VMD® versión 1.9.3 (Figura 5.3.3).

Estas simulaciones permitieron alinear las trayectorias de cada uno de los solventes y así definir las afinidades existentes en diferentes regiones de cada uno de los monómeros de la proteína y, en consecuencia, determinar los puntos farmacofóricos polares, apolares, aniónicos y catiónicos. Estos parámetros son esenciales para hallar los posibles lugares de interacción proteína-ligando que resulten en un complejo estable con un efector (Figura 5.3.4).

Una vez identificados los puntos farmacofóricos de la proteína, se seleccionaron y añadieron a la estructura aquellos presentes en la cavidad de interés de cada monómero, con objeto de determinar los que pudieran presentar interés biológico. Hay que mencionar

que la cavidad de uno de los monómeros (monómero A) presentó un punto farmacofórico polar (que puede actuar tanto como aceptor como donador de protones), adyacente al residuo H100, (Figura 5.3.5, panel A). Mientras que, en la cavidad del otro monómero (monómero B) se localizó un punto farmacofórico aniónico que actuaría como aceptor (Figura 5.3.5, panel B) también próximo al residuo H100.

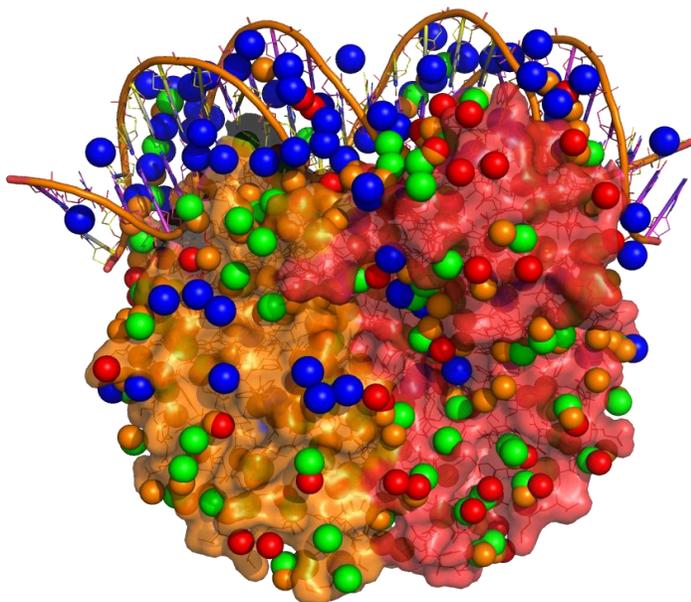


Figura 5.3.4. Puntos farmacofóricos en superficie de FixK₂. Visualización de la estructura cuaternaria de FixK₂ con el software PyMOL[®] versión 2.2.3 tras la definición de los puntos farmacofóricos mediante pyMDMix versión 2.7.3 en modos *surface* y *lines* (monómero A en color naranja; monómero B en color rojo). La doble hélice de ADN está representada en modo *licorice*. Los puntos farmacofóricos se corresponden con las esferas de la imagen representados con los siguientes colores: azul, catiónico; rojo, aniónico; naranja, polar (aceptor y donador de protones, con grupo OH polar); verde, apolar.

Para llevar a cabo etapas posteriores de *docking* y *dynamic undocking*, es necesaria la identificación del átomo que establece el

principal enlace de hidrógeno con el ligando, el cual se define como átomo de referencia y debe poder interactuar, por tanto, con todos los ligandos a analizar. Puesto que el residuo de H100 estaba protonado (Nitrógeno ND1; Figura 5.3.5), se consideró como donador y residuo de referencia para etapas posteriores, para rastrear ligandos aceptores de protones que fuesen capaces de interactuar en ese dominio. Por tanto, los puntos farmacofóricos de cada monómero se consideraron como aceptores situados a 2 Å del residuo de H100.

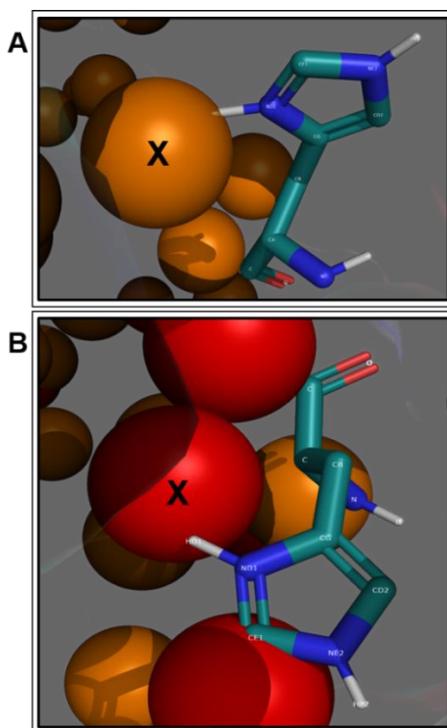


Figura 5.3.5 Puntos farmacofóricos de la cavidad de los monómeros A y B de FixK₂. A: en el monómero A, adyacente al residuo H100, se observa un punto farmacofórico con un grupo OH polar que puede actuar como aceptor y donador de protones (en color naranja marcado con una X). B: en el monómero B, adyacente al residuo H100, se observa un punto farmacofórico aniónico que puede actuar como aceptor de protones (en color rojo marcado con una X). La visualización se llevó a cabo con el programa PyMOL[®] versión 2.2.3.

5.3.4. Generación de la cavidad

Dentro del proceso de modelización molecular es necesario definir la cavidad de la proteína para llevar a cabo el estudio *in silico* de interacción proteína-ligando. Puesto que en la estructura del complejo FixK₂-ADN se detectó una cavidad con carga negativa presente en cada uno de los monómeros (Bonnet et al., 2013a; Figura 5.3.1), se consideró ésta como candidata de estudio para ser el dominio sensor de FixK₂ y se empleó el método “ligando de referencia” del soporte informático rDock[®] versión LGPLv3 según el protocolo descrito en Material y Métodos (apartado 4.7.2.3.2).

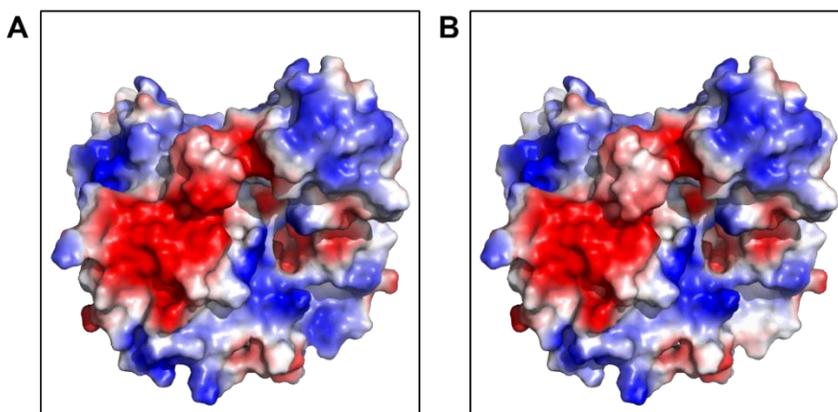


Figura 5.3.6. Estudio comparativo de la superficie electroestática de FixK₂. A: proteína FixK₂ original (Bonnet et al., 2013a). B: Proteína FixK₂ procesada con MOE[®] 2016. Se empleó el programa PyMOL[®] versión 2.2.3 para su visualización. Carga negativa (rojo), carga positiva (azul), carga neutra (blanco).

Independientemente del procesamiento de la proteína en las etapas previas descritas, se llevó a cabo el análisis de la superficie eléctrica de la misma, de manera que se hallaron diferencias sutiles que se consideraron, si bien no hubieran afectado significativamente para definir la cavidad objeto de estudio (Figura 5.3.6, panel B en comparación con el panel A).

Curiosamente, la cavidad de FixK₂ presentó homología con la de la proteína CRP de *E. coli*, la cual requiere cAMP como molécula efectora (Passner y Steitz, 1997; Passner et al., 2000; Körner et al., 2003; Kumar et al., 2009). Por ello, se analizó el grado de similitud entre la estructura cuaternaria de la proteína FixK₂ procesada y una de las disponibles de CRP en complejo con AMPc y unida a ADN (PDB, número de acceso 3RYR; Evangelista et al., 2021) mediante el empleo del soporte bioinformático PyMOL® 2.2.3.

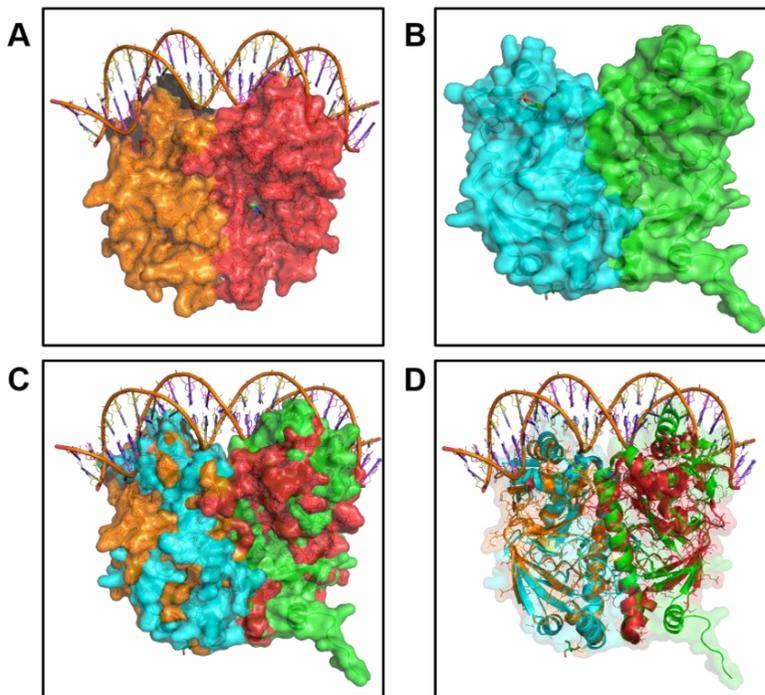


Figura 5.3.7. Alineamiento de las estructuras cristalinas de FixK₂ y CRP en complejo con ADN. A y B: Estructuras cuaternarias de FixK₂ y CRP visualizadas con el soporte bioinformático PyMOL® versión 2.2.3. C: Alineamiento tridimensional de CRP vs. FixK₂ en complejo con ADN visualizado en modos *surface* y *lines* superpuestos. D: Alineamiento tridimensional CRP vs. FixK₂ en complejo con ADN visualizado en modos *surface*, *lines* y *cartoon* superpuestos.

Como se puede observar en la Figura 5.3.7, el alineamiento de las estructuras de ambas proteínas permitió analizar el grado de semejanza estructural entre ambas, así como estudiar la similitud existente entre las cavidades receptoras de unión a cAMP en CRP y la identificada en FixK₂.

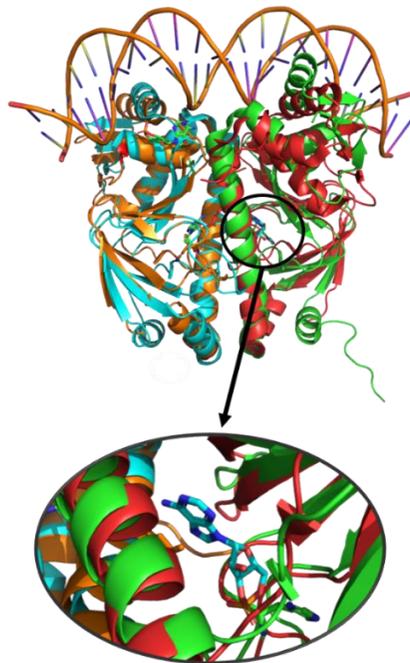


Figura 5.3.8. Superposición de las cavidades de FixK₂ y CRP. Visualización en modo *cartoon* del alineamiento de CRP vs. FixK₂ obtenido mediante PyMOL[®] versión 2.2.3. Se observa que ambas cavidades coinciden en tamaño, localización y plano espacial.

La visualización en modo *cartoon* del alineamiento tridimensional reveló que las cavidades de ambas proteínas coincidían en gran medida en tamaño, localización y plano espacial (Figura 5.3.8). Además, la molécula de AMPc se ajustaba de manera casi perfecta al plano espacial de la cavidad de la proteína FixK₂ (Figura 5.3.9), por lo que fue seleccionada como prototipo de molécula efectora para etapas posteriores.

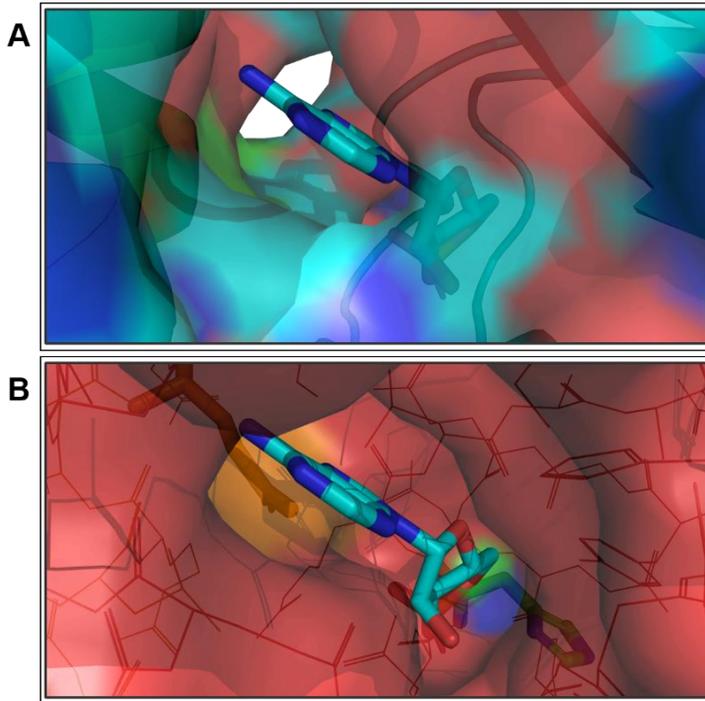


Figura 5.3.9. Comparativa de las áreas sensoras CRP y FixK₂. A: CRP. B: FixK₂. Visualización de la interacción de la molécula de AMPc con las cavidades de las proteínas CRP y FixK₂. Se emplearon los modos de visualización “*surface*”, “*lines*” y “*cartoon*” superpuestos del soporte bioinformático PyMOL® versión 2.2.3. Se observa que la molécula de AMPc se ajusta perfectamente al plano espacial de la cavidad de FixK₂.

Seguidamente, se realizó un mapeo para localizar el área de interacción de la proteína FixK₂ con la molécula de AMPc (Figura 5.3.10). De esta manera, se definió una cavidad, solapante con la identificada anteriormente (Bonnet et al., 2013a), con un tamaño de radio de 7 Å, lo cual se corresponde con la distancia máxima entre cualquier punto de la superficie del ligando (Figuras 5.3.10 y 5.3.11).

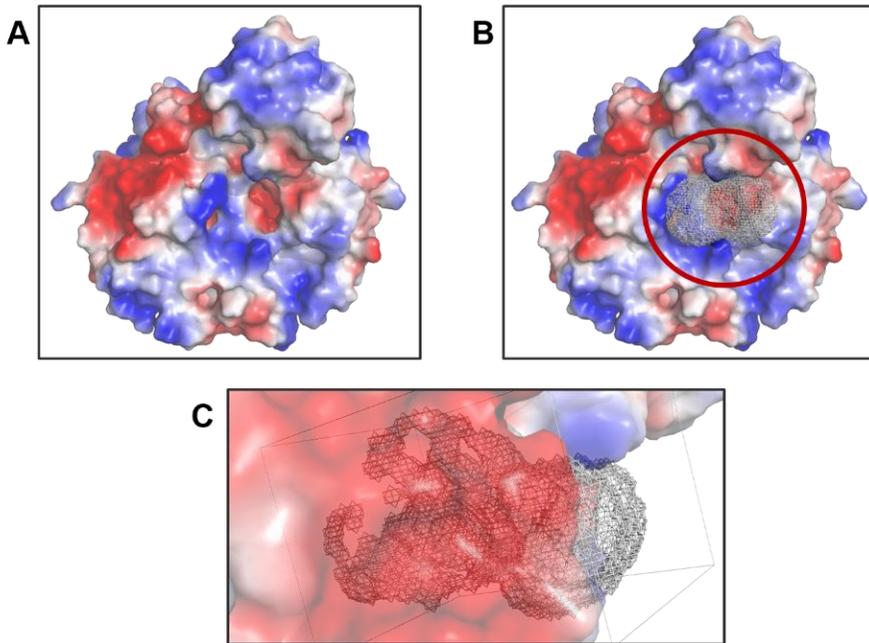


Figura 5.3.10. Mapeo tridimensional de la cavidad de FixK₂. A: Superficie eléctrica de la estructura tridimensional procesada de FixK₂; B: Superficie eléctrica de la estructura tridimensional procesada de FixK₂ donde se localiza la cavidad de 7 Å de radio (marcada con un círculo rojo); C: Imagen de la cavidad ampliada. Las imágenes se obtuvieron con PyMOL[®] versión 2.2.3.

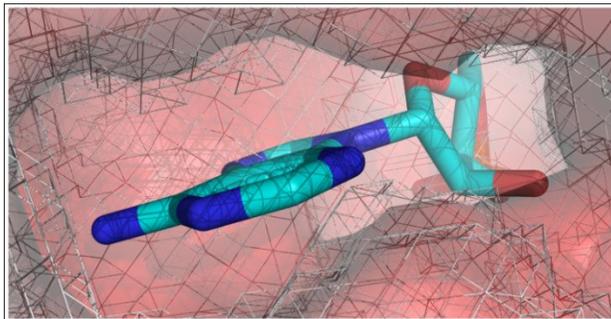


Figura 5.3.11. Acoplamiento cAMP-FixK₂. Simulación de la interacción de la molécula de AMPc con la cavidad de 7 Å de radio de la proteína FixK₂. La imagen se obtuvo con el soporte informático PyMOL[®] versión 2.2.3.

5.3.5. Acoplamiento dinámico (*docking*) y procesado bioinformático de ligandos (*clustering*)

El término *docking* (acoplamiento dinámico), es utilizado para predecir el acoplamiento de moléculas pequeñas con proteínas y ácidos nucleicos y está diseñado para cribados virtuales de metabolitos.

Para llevarlo a cabo en este estudio, una vez definida la cavidad y los puntos farmacofóricos de la misma, se procesaron 51000 ligandos procedentes de diversas bases de datos de interés (apartado 4.7.2.3.3) con el objeto de seleccionar aquellos que tuvieran mejor acoplamiento dentro de la cavidad en función de su estructura espacial y propiedades físico-químicas (Figura 5.3.12). Para ello, se empleó el soporte informático rDock[®] versión LGPLv3 según el modelo “acoplamiento restringido por farmacóforo”, en el que las posiciones de cada ligando están sesgadas para ajustarse a un determinado punto farmacofórico. En particular, el estudio se centró en la cavidad del monómero B de FixK₂. No obstante, para el cribado de ligandos se consideraron las propiedades de los puntos farmacofóricos de las cavidades de ambos monómeros, es decir: polar y aceptor (monómero A) o aniónico, y por tanto aceptor (monómero B).

Los ligandos de estudio se sometieron a tres filtros. En el primero, se identificaron las 50 posiciones posibles de cada uno de ellos dentro de la cavidad y se descartaron aquellas que poseían peor puntuación del parámetro *InterScore* (valores > 0). En el segundo, se seleccionó la mejor posición de cada metabolito dentro de las 50 identificadas en el primer filtro en función de las mejores puntuaciones obtenidas para los parámetros *InterScore* (<-20) e *IntraScore* (< 10). En este segundo filtro también se consideró el parámetro *ScoreRestr* que determina el espacio ocupado por el metabolito en la cavidad (mejor puntuación cuanto más se ajuste a 0).

De esta manera el grupo de 51000 metabolitos se redujo a 6785 de los cuales 3311 se correspondían con un punto

farmacofórico polar y aceptor y 3484 considerando el punto farmacofórico como aniónico.

El conjunto de 6785 ligandos se clasificó con el programa bioinformático MOE® 2016, el cual permite agruparlos según similitud estructural (modo *fingerprint* del soporte bioinformático MOE®), dando lugar a 3478 agrupaciones diferentes.

Puesto que el grupo de ligandos era numeroso para poder abordar un cribado experimental, se aplicó un nuevo filtro con un *InterScore* < -25. De esta manera, se obtuvieron un total de 400 agrupaciones con 3084 metabolitos, de los cuales 1215 correspondían al punto farmacofórico considerado polar y aceptor, y 1869 para el punto farmacofórico considerado aniónico. Cabe mencionar que, del total de 3084 metabolitos seleccionados en esta última fase, 1042 figuraban para ambos puntos farmacofóricos por lo que eran comunes.

En una fase posterior se realizó una selección siguiendo diferentes criterios: i) se eliminaron los 1042 duplicados, ii) se seleccionó el metabolito con mejor puntuación *InterScore* de cada una de las 400 agrupaciones; iii) se descartaron todos aquellos que no estaban representados en bases de datos de soja, rizobios y otros procariontes; iv) se seleccionaron en función de particularidades moleculares (proteínas con las que interactúan utilizando como referencia la base de datos Protein Data Bank).

Como resultado, se obtuvo un total de 418 metabolitos (Tabla 9.3.1) de los cuales 18, a pesar de no superar todos los criterios citados anteriormente, fueron igualmente incluidos en esta lista debido a su interés biológico o al ser cofactores de otras proteínas de la familia CRP/FNR, por lo que su análisis *in silico* resultaba interesante.

Cabe mencionar que, de todas las moléculas procesadas, los derivados nucleotídicos parecían ajustarse más óptimamente al plano espacial de la cavidad, por lo que fueron considerados candidatos de gran interés.

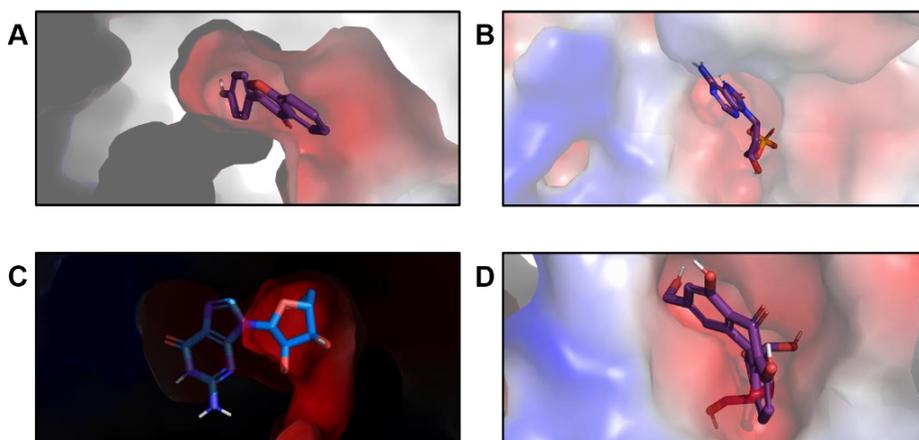


Figura 5.3.12. Acoplamiento dinámico (*docking*) de FixK₂ con diferentes metabolitos. Mejor posición en el interior de la cavidad de FixK₂ de los ligandos, A: *4'-hydroxy isoflavone*; B: *8-oxo-dAMP*; C: *D-tryptofan*; D: *barbaloin* (Base de datos *MetaCyc*). Los metabolitos y sus posiciones espaciales son seleccionados en función de las mejores puntuaciones obtenidas para los parámetros *InterScore* (< -25), *IntraScore* (< 10) y *ScoreRestr* (≈ 0) del soporte informático rDock[®] versión LGPLv3. Se observa que mientras que los metabolitos en los paneles A y B encajan perfectamente en el interior de la cavidad, aquellos representados en los paneles C y D sobrepasan los límites de la misma en cierto grado. Imágenes procesadas con PyMOL[®] versión 2.2.3 visualizadas en modo *surface*.

5.3.6. Desacoplamiento dinámico (*dynamic undocking o duck*)

El término *duck*, también llamado *dynamic undocking* o desacoplamiento dinámico, hace referencia a un método computacional para calcular el trabajo necesario para alcanzar un estado “cuasi” unido”, en el que el ligando termina por romper el contacto nativo más importante con el receptor (Ruíz-Carmona et al., 2017).

Mediante el empleo de esta metodología se determinó la energía necesaria para romper la interacción proteína-ligando (W_{QB}) de cada uno de los 418 candidatos seleccionados, tomando como referencia el átomo de nitrógeno ND1 de H100 (Figura 5.3.13), el

cual es clave para establecer el principal enlace de hidrógeno con el ligando. Por tanto, se emplea como referencia para el cribado de los ligandos a analizar.

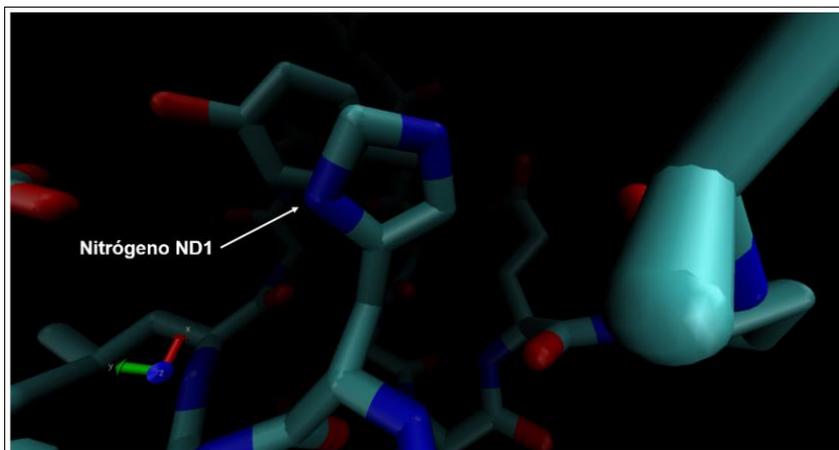


Figura 5.3.13. Desacoplamiento dinámico con FixK₂. Átomo de nitrógeno ND1 del residuo H100 el cual se empleó como referencia para establecer el principal enlace de hidrógeno con los ligandos en el interior de la cavidad de FixK₂. Imagen obtenida con el software VMD[®] versión 1.9.3.

Dentro del proceso de desacoplamiento dinámico también hay que definir lo que se denomina el "fragmento", el cual define al subconjunto mínimo de residuos conservados alrededor del enlace de hidrógeno clave, en este caso ND1 (Figura 5.3.14).

La selección de estos residuos que forman el fragmento es esencial para el resultado exacto del desacoplamiento dinámico, dado que un exceso de los mismos ralentizaría el cálculo pudiendo impedir que el ligando salga de la cavidad, lo que da como resultado valores de W_{QB} muy altos que no reflejan la fuerza del enlace de hidrógeno.

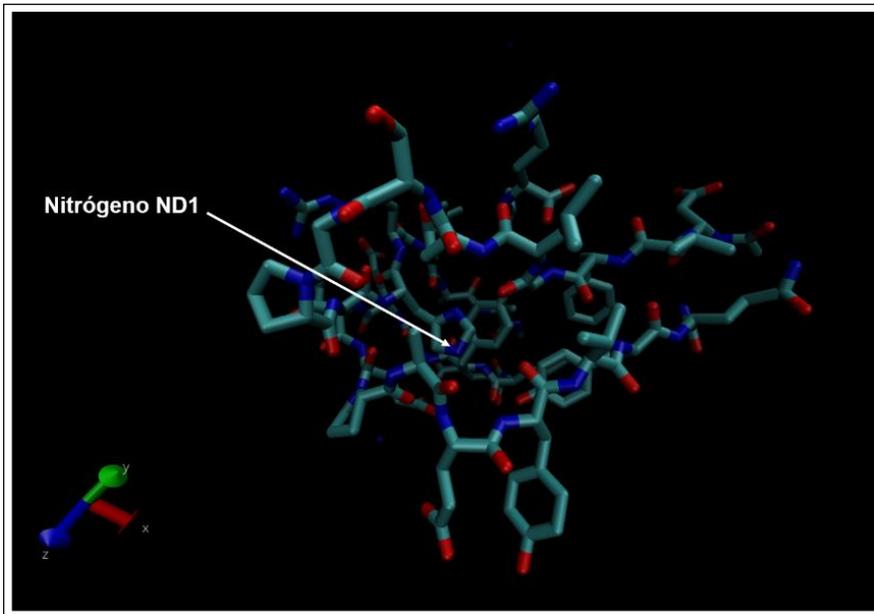


Figura 5.3.14. Imagen del fragmento alrededor del enlace de hidrógeno de ND1. Inspección visual de residuos en el interior de la cavidad de FixK₂ mediante el software bioinformático VMD® versión 1.9.3 para la realización del desacoplamiento dinámico.

Tras el procesamiento, no fue posible analizar 20 de los 418 metabolitos debido a fallos en el desacoplamiento fragmento-metabolito. Finalmente, 236 candidatos superaron una energía de 3 Kcal/mol.

A continuación, este grupo se redujo a 147 ligandos aptos para futuros ensayos *in vitro* (Tabla 9.3.2) en base a un análisis visual en el que se determina el tipo de molécula, forma, tamaño, etc. Como última selección, se consideraron las similitudes con otros ligandos descritos para proteínas CRP-FNR y la presencia en rizobios o leguminosas, más concretamente en *B. diazoefficiens* y *Glycine max*. Estos criterios de selección permitieron determinar un total de 27 candidatos como posibles candidatos para la proteína FixK₂ (Tabla 5.3.1).

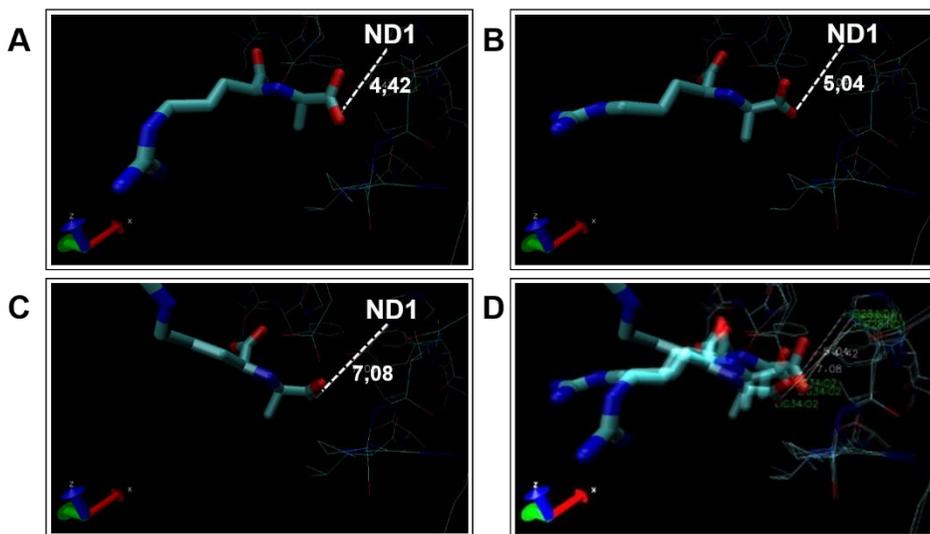


Figura 5.3.15. Ruptura de la interacción proteína-ligando. Visualización de diferentes etapas (A-C) del proceso de separación de la molécula de *D-octopine* (Base de datos *MetaCyc*) del nitrógeno ND1 de la cavidad del monómero B de *FixK₂*. A: Distancia de 4,42 Å al inicio de *duck*; B: Distancia de 5,04 Å en una etapa intermedia; C: Distancia de 7,08 Å en la etapa final. D: Superposición de imágenes A, B y C en la que se aprecia el desplazamiento del metabolito alejándose del fragmento. En todos los casos, la línea blanca discontinua representa la distancia entre ND1 y el metabolito. Se aplicó un filtro de 3 Kcal/mol como energía necesaria para romper el enlace. Imagen obtenida mediante el programa VMD® versión 1.9.3.

Tabla 5.3.1. Listado de 27 metabolitos seleccionados para ensayos de interacción FixK₂-ligando *in vitro*.

Nombre ^a	InterScore ^b	W _{QB} ^c	ID ^d
A 7,8-dihydro-8-oxoguanine in DNA	-37,493599	9,59	RXN-18435
(R)-N-formyl-beta-hydroxy-L-kynurenine	-30,565701	9,57	CPD-18539
8-oxo-dAMP	-35,563801	8,90	CPD-15018
N-(5-phosphoribosyl)-anthranilate	-31,247299	8,51	N-5-PHOSPHORIBOSYL-ANTHRANILATE
monapterin	-31,270599	8,36	CPD-15308
scyllo-inosose	-28,498501	8,19	CPD-14808
4-(beta-D-ribofuranosyl)hydroxybenzene 5'-phosphate	-37,558399	7,09	CPD-16964
adenosine	-28,756399	5,94	ADENOSINE
D-ornithine	-29,574699	5,80	CPD-217
dopamine 3-O-sulfate	-29,158001	5,68	CPD-7649
stizolobinate	-28,637501	5,49	CPD-13903
3-dehydro scyllo-inosose	-29,399799	5,54	CPD-15236
7,8-dihydroneopterin 2',3'-cyclic phosphate	-32,467701	5,08	CPD-10812
A 1,N2-ethenoguanine in DNA	-31,994699	4,77	a-1INisup2sup-ethenoguanine-in-DNA

Nombre ^a	InterScore ^b	W _{QB} ^c	ID ^d
1-oxo-2-phosphorylethylphosphonate	-29,2404	4,72	CPD-12970
riboflavin cyclic-4',5'-phosphate	-36,9221	4,59	CPD-12658
valienamine	-28,714399	4,53	CPD-17534
L-histidino phosphate	-27,7756	4,46	L-HISTIDINOL-P
cyclic-GMP	-26,361	4,34	CGMP
A 2-oxindole-3-acetyl-hexose	-32,412998	4,21	2-OXINDOLE-3-ACETYL-HEXOSE
steroid O sulfate	-30,935301	3,97	STEROID-O-SULFATE
cyclic-AMP	-30,0327	4,06	CAMP
phenyl-1-thio-beta-D-galactopyranoside	-29,386101	3,67	CPD0-1302
1-(5-phosphoribosyl)imidazole-4-acetate	-33,923801	3,38	1-5- PHOSPHORIBOSYLIMIDAZOLE-4- ACETATE
beta-nicotinate D-ribonucleotide	-35,546799	3,26	NICOTINATE_NUCLEOTIDE
D L-6-methyltryptophan	-29,751101	3,28	DL-6-METHYLTRYPTOPHAN
An N3-hydroxypropylcytosine in DNA	-34,342098	3,36	CPD0-1924

^a Nombre de las moléculas según las bases de datos *Plant Metabolic Network*

(<https://www.plantcyc.org/>) y *MetaCyc Metabolic Pathway Database* (<https://metacyc.org/>).

^b Parámetro del programa rDock (<http://rdock.sourceforge.net/>) que representa la puntuación de interacción proteína-ligando, Para la selección, se consideraron aquellos con un valor < -25.

^c Trabajo (en Kcal/mol) necesario para romper el enlace y alcanzar un estado cuasi ligado entre el ligando y el átomo de nitrógeno ND1 de H100 de FixK₂.

^d Código identificador de metabolito en base de datos *BioCyc* (<https://biocyc.org/>).

5.3.7. Análisis del papel del residuo H100 de FixK₂ en la función de la proteína en células de *B. diazoefficiens*

5.3.7.1. Construcción de una cepa de *B. diazoefficiens* que codifica un derivado H100A FixK₂

Para analizar la posible función del residuo H100 de FixK₂ *in vivo*, se llevó a cabo la construcción de una cepa de *B. diazoefficiens* que codifica un derivado H100A FixK₂ mediante la técnica de mutagénesis sin marcador descrita por Schäfer y colaboradores (1994) (apartado 4.4.16). Para ello, en primer lugar, se intercambió el residuo H100 por alanina mediante el empleo de la técnica de mutagénesis puntual dirigida usando como molde el plásmido pRJ9041 que codifica la variante silvestre de *fixK₂* y los oligonucleótidos His100_Ala100_for y His100_Ala100_rev (Tabla 4.3). De esta forma se obtuvo el plásmido pMB1291 que codifica la variante H100A FixK₂, cuya secuencia se verificó mediante secuenciación con la combinación de oligonucleótidos *fixK₂_12* y *fixK₂_4*.

Posteriormente el plásmido pMB1291 se digirió con la enzima *BamHI* y el fragmento de 1,849 kb resultante se clonó en el vector pK18*mobsacB* linearizado con la misma enzima para dar lugar al plásmido pMB1293 (Figura 5.3.16).

Finalmente, el plásmido pMB1293 se transfirió a células competentes de *E. coli* S17.1, que a su vez se utilizaron como donadoras en conjugaciones biparentales con la cepa parental de *B. diazoefficiens* 110*spc4*, para dar lugar a la cepa 1293 que codifica la proteína H100A FixK₂. La verificación de la misma se llevó a cabo mediante secuenciación con los oligonucleótidos M13_rev y *fixK₂_7*.

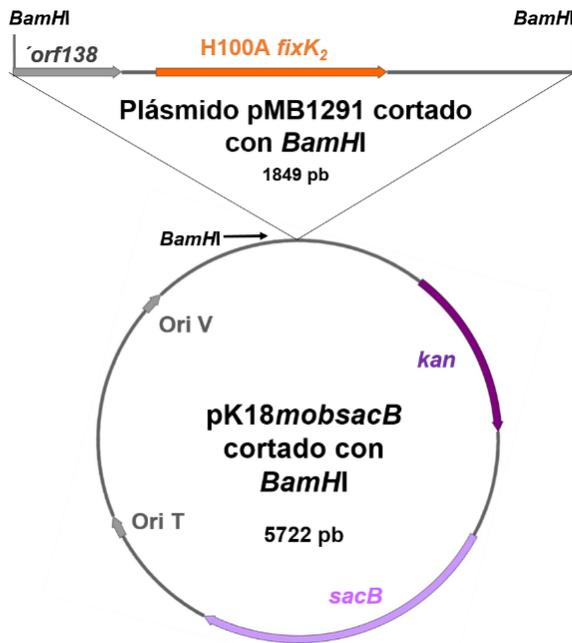


Figura 5.3.16. Esquema de la construcción del plásmido pMB1293. El fragmento *Bam*HI de 1,849 kb procedente del plásmido pMB1291 se clonó en el plásmido suicida pK18*mobsacB* linearizado con la misma enzima de restricción para dar lugar al plásmido pMB1293.

5.3.7.2. Efecto del intercambio H100A en FixK₂ en la capacidad de crecer en condiciones desnitrificantes de *B. diazoefficiens*

Puesto que la proteína FixK₂ controla (de forma directa o indirecta), la expresión de genes estructurales y accesorios implicados en el proceso de desnitrificación (apartado 2.5.2), para estudiar el efecto *in vivo* el efecto de la mutación H100A en FixK₂, se analizó la capacidad de la cepa 1293 de crecer condiciones desnitrificantes (anoxia con nitrato como aceptor final de electrones). Como cepas de referencia se emplearon la cepa parental de *B. diazoefficiens* 110*spc4* y la mutante en el gen *fixK₂* (cepa 1121). De acuerdo a los

resultados obtenidos Figura 5.3.17, panel A), no se observaron diferencias significativas en el crecimiento entre la cepa parental y la que codifica H100A FixK₂. Esto contrasta con el comportamiento de la cepa Δ fixK₂, la cual fue incapaz de crecer en condiciones desnitrificantes, de forma similar al crecimiento de cualesquiera de la tres cepas en el mismo medio sin nitrato (Figura 5.3.17, panel B).

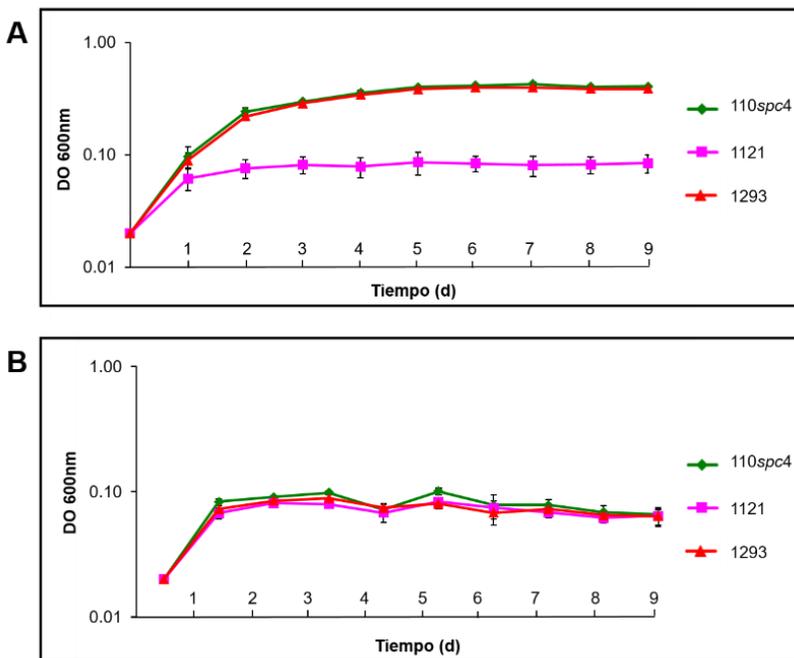


Figura 5.3.17. Crecimiento en condiciones desnitrificantes de diferentes cepas de *B. diazoefficiens*. Las células se cultivaron durante 9 días en medio YEM con y sin nitrato (paneles A y B, respectivamente). 110spc4 (cepa parental), 1121 (mutante *fixK*₂), 1293 (cepa codificante del derivado H100A FixK₂). Las barras de error representan la desviación estándar de las medidas de tres réplicas técnicas de un ensayo representativo.

Considerando estos resultados, el intercambio del residuo H100 a alanina en FixK₂ no fue suficiente para modular la actividad de FixK₂ en cuanto a la activación de la expresión de los genes de la desnitrificación y, en consecuencia, la capacidad de crecer en condiciones desnitrificantes de *B. diazoefficiens*. Otras aproximaciones experimentales serán necesarias para estudiar en profundidad la posible función del residuo H100 en la interacción FixK₂-ligando y su actividad *in vitro* e *in vivo* (véase apartado 6).

6

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

En esta Tesis Doctoral se ha pretendido avanzar en el conocimiento de los mecanismos de regulación en respuesta a baja tensión de oxígeno (microoxia) en la interacción simbiótica *Rhizobium-leguminosa*. Esta señal es clave para la expresión y funcionalidad de la nitrogenasa, así como de la oxidasa terminal de alta afinidad por oxígeno FixNOQP, que permite la respiración de la bacteria en el interior de los nódulos (Dixon et al., 2004; Terpolilli et al., 2012; Bonnet et al., 2013a).

En particular, este Trabajo de Investigación se ha centrado en el estudio de la relación estructura-función de la proteína FixK₂, un factor transcripcional de relevancia en la compleja red de regulación que responde a microoxia en *B. diazoefficiens*, bacteria modelo y endosimbionte de la soja. Para ello, se ha empleado como base la estructura del complejo FixK₂-ADN (Bonnet et al., 2013a), la cual es la primera publicada de un factor transcripcional que responde a oxígeno dentro de la familia de proteínas de tipo CRP/FNR. Dicha estructura permitió establecer las bases moleculares de la inactivación por oxidación de FixK₂ en respuesta a ROS, así como la identificación de los dominios de la proteína implicados en su control postraducciona por proteólisis, de unión a ADN, de dimerización y de un posible lugar de unión a un cofactor desconocido. La caracterización funcional de la proteína FixK₂ no solo sirve para profundizar en su propio mecanismo molecular, sino que podría emplearse como base para interpretar cómo otras proteínas de tipo CRP/FNR responden a distintos estímulos intracelulares y medioambientales.

Por tanto, este estudio se ha centrado en tres aspectos relevantes del mecanismo molecular de FixK₂: la modulación del control postraducciona por oxidación desarrollada en el primer capítulo de resultados de esta Tesis, la caracterización del dominio de dimerización de la proteína que se describe en el segundo capítulo y finalmente, una modelización molecular proteína-ligando, como primera aproximación, para identificar el posible cofactor que modula la actividad de FixK₂, la cual se detalla en el tercer capítulo.

Mecanismos de modulación del control postraduccional por oxidación de la proteína FixK₂

FixK₂ es una de las 16 proteínas tipo CRP/FNR presentes en el genoma de *B. diazoefficiens* (Mesa et al., 2006) pero se distingue dentro de esta familia de reguladores transcripcionales, por ser capaz de activar la transcripción *in vitro* de los genes que regula en colaboración con la ARN polimerasa de *B. diazoefficiens* en ausencia de moléculas efectoras conocidas (Mesa et al., 2005). Alternativamente, se han descrito diferentes niveles de regulación para la proteína FixK₂: (i) está integrada en una compleja red de regulación que responde a la baja tensión de oxígeno formada por dos cascadas interconectadas entre sí (FixLJ-FixK₂ y RegSR-NifA), donde la expresión del gen *fixK₂* está compensada entre la activación por sistema de dos componentes FixLJ y la auto-represión mediada por la propia proteína FixK₂ (de forma directa o indirecta por un mecanismo aún desconocido) (Nellen-Anthamatten et al., 1998; Sciotti et al., 2003; Mesa et al., 2008; Reutimann et al., 2010; revisado en Fernández et al., 2016); (ii) la actividad de FixK₂ se modula a nivel postranscripcional (Fernández et al., 2019) y postraduccional (revisado en Fernández et al., 2016). Este último modo de regulación implica una proteólisis por escisión específica y un mecanismo de degradación general por el sistema chaperona-proteasa ClpAP₁ (Bonnet et al., 2013b), así como la oxidación a nivel del residuo C183 en respuesta a agentes oxidantes (Mesa et al., 2009; revisado en Fernández et al., 2016).

Un análisis computacional realizado por Matsui y colaboradores, de diferentes proteínas pertenecientes a la familia de factores transcripcionales bacterianos de tipo CRP/FNR (Matsui et al., 2013), indicó que pudieron evolucionar de una única proteína FNR ancestral involucrada en la fijación de nitrógeno. Aunque las proteínas de tipo FixK, a las cuales pertenece FixK₂, forman parte del clado FNR, carecen del motivo de unión a grupos [Fe-S], ligando característico de esta clase.

Al igual de lo descrito para FixK₂, existen otras proteínas de tipo CRP/FNR capaces de activar la transcripción de los genes que

regulan sin la necesidad de un cofactor. Como ejemplos a mencionar serían los siguientes: (i) SdrP de *Thermus thermophilus* HB8, que está involucrada en el suministro de nutrientes y energía, control redox y poliadenilación de ARN mensajero. Esta proteína no solo es activa *in vitro* sin necesidad de cofactores, sino que también carece de un posible sitio de unión a cofactor en su estructura cristalina (Agari et al., 2008); (ii) PrfA de la bacteria patógena *L. monocytogenes*, la cual puede unirse a sus dianas en ausencia de su cofactor (Eiting et al., 2005), aunque su actividad se modula por la disponibilidad de fuentes de carbono en células de *L. monocytogenes* (Freitag et al., 2009). Recientemente se describió que el glutatión reducido es el ligando de PrfA, tanto *in vivo* como *in vitro* (Reniere et al., 2015; Hall et al., 2016); (iii) la proteína de tipo FNR de *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC23270, la cual tiene baja afinidad para unirse a su cofactor [Fe-S], con el objeto de permitir una mejor transición entre ambientes con alta y baja tensión de oxígeno (Osorio et al., 2012); (iv) Vfr de *Pseudomonas aeruginosa*, que puede activar la transcripción de algunos de sus genes diana en ausencia de un cofactor (revisado en Soberón-Chávez et al., 2017) y además, su actividad depende de los niveles intracelulares de la propia proteína, donde intervienen distintos mecanismos que actúan a nivel transcripcional, traduccional y postraduccional (Scortti et al., 2007). De manera similar, la actividad de FNR de *E. coli* depende de sus niveles intracelulares, donde el sistema proteolítico ClpXP es el responsable de la degradación de la variante monomérica sin cofactor de la proteína en células cultivadas en condiciones óxicas (Mettert et al., 2005; Pan et al., 2012). Todos estos antecedentes junto con el papel clave de FixK₂ en el metabolismo microóxico de *B. diazoefficiens*, tanto en condiciones de vida libre y en simbiosis, como en la desnitrificación (Nellen-Anthamatten et al., 1998; Mesa et al., 2008; Bueno et al., 2017), sustentan la posibilidad de la existencia de mecanismos alternativos, independientes de cofactores, para que esta proteína responda a estímulos intracelulares y ambientales.

En particular, la estructura cristalina de C183S FixK₂ en complejo con su ADN genuino (caja FixK₂) presente en el promotor

del operón *fixNOQP* (Bonnet et al., 2013a) reveló la importancia del residuo C183 de FixK₂ en su control postraduccional por oxidación. Esto se debe a la proximidad de este residuo al dominio de unión a ADN y a su susceptibilidad, no solo para formar puentes disulfuro, sino también para generar derivados de cisteína superoxidados a ácido sulfénico, sulfínico y sulfónico que dan lugar a una repulsión electrostática con el ADN cargado negativamente, a la vez de un impedimento estérico (Mesa et al., 2009). Específicamente, C183 interactúa directamente con la adenina ubicada en la posición 7 de la hebra W (Bonnet et al., 2013a), que se encuentra inmediatamente antes de la timina en la posición 8 que establece interacciones hidrofóbicas con el residuo L195 del motivo H-V-H de unión a ADN de FixK₂.

En nuestro trabajo, en primer lugar, analizamos *in silico* si el intercambio del residuo de C183 por ácido aspártico (C183D) podría simular la oxidación permanente de FixK₂, y por tanto, afectar la interacción FixK₂-DNA. Para ello, se realizó una modelización de distintos derivados de proteína: FixK₂, C183S FixK₂, C183D FixK₂, así como los derivados de cisteína a ácido sulfénico, sulfínico y sulfónico de FixK₂ con la caja FixK₂ presente en el promotor del operón *fixNOQP* (Figura 6.1). Según este estudio, la sustitución de C183 por ácido aspártico dio lugar a la adquisición de una carga negativa, y en consecuencia, la repulsión electrostática con los grupos fosfato de las bases adenina 6 y adenina 7 de la hebra W del ADN diana (Bonnet et al., 2013a). Además, el átomo de oxígeno de la cadena lateral ramificada del aspartato causa un impedimento estérico debido a su proximidad con las bases descritas anteriormente, reduciendo las distancias intermoleculares de 7,1 y 4,9 Å, a 4,5 y 3,5 Å, respectivamente (Figura 6.1, paneles A y C). Por tanto, la interacción del derivado C183D FixK₂-ADN probablemente imita a la de los derivados sulfénico (Figura 6.1, panel D) y sulfínico (Figura 6.1, panel E) debido al tamaño y la carga de cada radical, respectivamente, en lugar a la correspondiente del derivado sulfónico (Figura 6.1, panel F).

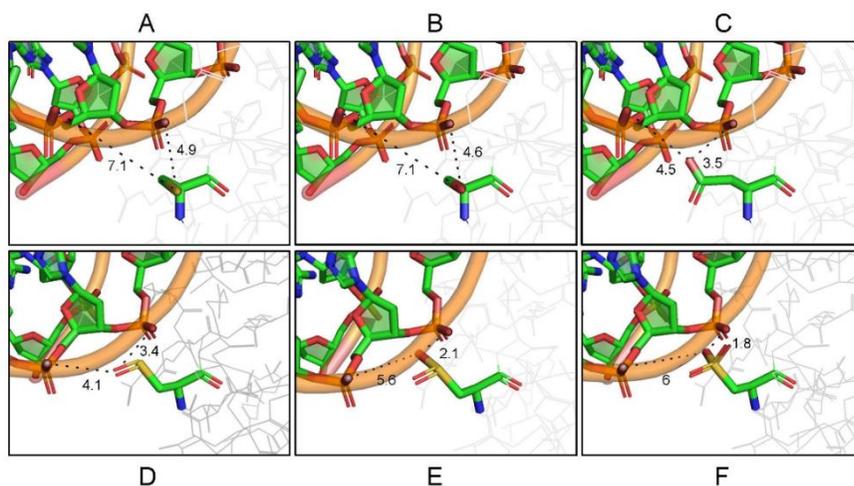


Figura 6.1. Modelización de diferentes variantes de la proteína FixK₂ con la caja FixK₂ presente en el promotor de los genes *fixNOQP*. Se muestran las distancias proteína-ADN entre los átomos de oxígeno cargados negativamente del grupo fosfato de las bases nitrogenadas adenina 6 y adenina 7 de la hebra W del ADN (Bonnet et al., 2013a), y los residuos de cisteína (A), serina (B), ácido aspártico (C), ácido sulfénico (D), ácido sulfinico (E) y ácido sulfónico (F) de FixK₂. La predicción de los modelos 3D de FixK₂ y C183D FixK₂ se realizó con el programa Pymol 2.2.3 (<https://pymol.org/2/>), utilizando como referencia la estructura C183S FixK₂-DNA (<http://wwpdb.org/>; código 4I2O). La visualización de las estructuras e interacciones moleculares se llevó a cabo con el programa Discovery Studio Visualizer versión V20.1.0.19295 (BIOVIA), el cual también se empleó para la modelización de los derivados de ácido sulfénico, sulfinico y sulfónico de FixK₂. Las distancias en angstroms (Å) se representan mediante líneas discontinuas; adenina 6 a la izquierda; adenina 7 a la derecha.

A continuación, se analizó cómo el intercambio C183D afectaba a las propiedades de la proteína FixK₂ *in vitro* y si simulaba su inactivación por oxidación. Como era de esperar, la proteína C183D FixK₂ recombinante purificada presentó una menor capacidad de unión al ADN en experimentos de RPS y EMSA (Figura 5.1.3). La mutación C183D en FixK₂ también afectó,

probablemente, la interacción con la ARN polimerasa, puesto que la activación de la transcripción mediada por este derivado determinada en experimentos de IVT, ser redujo aproximadamente un 75% en comparación con los derivados de referencia FixK₂ y C183S FixK₂ (Figura 5.1.1). Además, cuando se analizó el estado oligomérico del derivado C183D FixK₂, el equilibrio monómero-dímero parecía estar más desplazado hacia la forma monomérica que en el caso de la proteína FixK₂ parental (Figura 5.1.2). Sin embargo, dado que este perfil es similar al de la proteína C183S FixK₂, la cual es insensible a la oxidación, capaz de interactuar eficazmente con ADN y completamente activa *in vitro* (Figura 5.1.1), se descartó como posible causa para explicar la deficiencia tanto en la capacidad de unión a ADN y la actividad *in vitro* de la proteína C183D FixK₂.

A diferencia de los resultados *in vitro* y de lo descrito previamente para una cepa $\Delta fixK_2$ de *B. diazoefficiens* (Nellen-Anthamatten et al., 1998; Cabrera et al., 2021), la cepa C183D-*fixK*₂, mostró un fenotipo similar al de la cepa parental con respecto al perfil de expresión de una fusión *fixNOQP*'-'*lacZ* en condiciones microóxicas (Figura 5.1.4), el crecimiento de la bacteria en condiciones desnitrificantes (Figura 5.1.5), así como el fenotipo simbiótico con plantas de soja (Tabla 5.1.1). Por lo que indicaba la existencia de posibles mecanismos alternativos en células de *B. diazoefficiens* que pudieran compensar los resultados obtenidos con del derivado C183D FixK₂ *in vitro*. Con el objeto de verificar esta hipótesis, se analizaron los niveles de la proteína C183D FixK₂ en células de *B. diazoefficiens* cultivadas en condiciones microóxicas y en bacteroides aislados de nódulos de soja recolectados a 25 y 32 dpi. Se observó, que los niveles de proteína C183D FixK₂ fueron mayores (alrededor de 2-3 veces) que los de la proteína de parental (Figura 5.1.6) en cada una de las condiciones ensayadas, lo que podría explicar la ausencia de un fenotipo de la cepa C183D-*fixK*₂ en los ensayos *in vivo*.

Con el fin de obtener una visión más global del efecto del intercambio C183D en FixK₂ *in vivo*, se realizó un perfil transcriptómico de la cepa C183D-*fixK*₂ cultivada en condiciones

microóxicas y se comparó con el de la cepa parental cultivada en las mismas condiciones. Curiosamente, la mayoría de los genes cuya expresión está reducida en una cepa deficiente en FixK₂ (920 de un total de 970), es decir, activados positivamente por esta proteína, no mostraron una expresión diferencial en la cepa C183D-*fixK*₂ (Figura 5.1.7). Entre ellos, se encuentran los genes *blI2109*, *blI3466*, *fixK*₁ y *nnrR* que codifican otros reguladores de tipo CRP/FNR (Mesa et al., 2008). Este hallazgo, junto con la mayor abundancia de proteína C183D FixK₂ (Figura 5.1.6) en células de *B. diazoefficiens*, podrían justificar el fenotipo parental de la cepa C183D-*fixK*₂. En este contexto, hay que considerar que la variante C183D FixK₂ no consigue simular al derivado más oxidado de FixK₂ (ácido sulfónico), (Figura 6.1), lo que podría también contribuir al fenotipo de la cepa C183D-*fixK*₂.

Aun así, un grupo de 104 genes mostraron una expresión diferencial en la cepa C183D-*fixK*₂, de los cuales, 47 están controlados positivamente por FixK₂, y 37 de ellos organizados en 26 unidades transcripcionales que contienen una caja FixK₂ en su región promotora (Figura 5.1.7; Tabla 5.1.2). Este conjunto incluye dianas directas (Cabrera et al., 2021) tales como *hemN*₂, *phbC*₂, *ppsA*, *blr4637* o *bsr7087*, pero ni el operón *fixNOQP* que codifica la oxidasa terminal de alta afinidad *cbb*₃ ni los genes *napEDABC* que codifican la nitrato reductasa periplásmica involucrada en la desnitrificación estaban presentes, lo cual apoyaría la ausencia de fenotipo de la cepa C183D-*fixK*₂. Todas estas observaciones indicarían que la sobre-expresión de C183D FixK₂ no es suficiente para compensar la activación de la transcripción mediada por FixK₂ para todas sus dianas. Sin embargo, el análisis tanto de las cajas FixK₂ asociadas a las estas 26 unidades de transcripción, así como a los nucleótidos en la parte 5' de las cajas (posiciones 6 y 7 de la hebra W del ADN; Bonnet et al., 2013a) con respecto a aquella presente en el promotor del operón *fixNOQP*, no reveló un patrón conservado que pudiera justificar este comportamiento diferencial de la proteína C183D FixK₂ con respecto a la activación de la expresión de sus dianas directas.

Dentro del grupo de genes expresados diferencialmente en la cepa C183D-*fixK*₂, aproximadamente la mitad, es decir 54 de 104 (Tabla 9.1.1), no son parte del regulón FixK₂. Entre ellos, no se incluyen genes que codifican proteínas similares a proteínas CRP/FNR, que podrían contrarrestar el fenotipo de la cepa C183D-*fixK*₂. En cambio, se identificaron una serie de genes codificantes de proteínas hipotéticas o desconocidas, lo cual dificulta llevar a cabo un estudio para analizar su posible función en este contexto.

Finalmente, es importante destacar que encontramos una mayor expresión del gen *fixK*₂ en la cepa C183D-*fixK*₂ que en la cepa parental, cuando ambas se cultivaron en condiciones microóxicas (Figura 5.1.6; Tabla 9.1.1). Este perfil de expresión es similar al descrito una cepa Δ *fixK*₂ en estudios anteriores (Nellen-Anthamatten et al., 1998; Reutimann et al., 2010; Fernández et al., 2016), que sugería que FixK₂ regula negativamente su propia expresión (directa o indirectamente) por un mecanismo desconocido. Reutimann y colaboradores (Mesa et al., 2009) propusieron que este control probablemente sea indirecto, de manera que la proteína FixK₂ activaría su propio represor o a un activador del gen represor de *fixK*₂. Por ello, para identificar posibles candidatos, analizamos el grupo de genes cuya expresión estaba disminuida de forma simultánea en las cepas C183D-*fixK*₂ y Δ *fixK*₂. Sin embargo, ninguno de los genes reguladores propuestos previamente (*blr1216*, *bsr4636*, *blr7666*) (Reutimann et al., 2010; revisado en Fernández et al., 2016), apareció en el regulón común de ambas cepas (Tabla 9.1.1). No obstante, encontramos el gen *bll0330* que codifica un gen regulador de respuesta (Tabla 5.1.2), el cual podría ser un candidato a analizar como posible represor de FixK₂.

Caracterización del dominio de dimerización de la proteína FixK₂

Como se ha comentado anteriormente en esta Tesis Doctoral y de acuerdo a la estructura de FixK₂ publicada (Bonnet et al., 2013a), los residuos 128-154 de la proteína constituyen la hélice α C, implicada en la interacción hidrofóbica entre monómeros. De

manera que los aas de las posiciones *a* y *d* que constituyen la interfaz de una espiral heptamérica, estarían involucrados en las interacciones intermoleculares del homodímero.

De hecho, el alineamiento de la secuencia de la hélice de dimerización de FixK₂ con las de sus proteínas ortólogas CooA de *R. rubrum*, CRP y FNR, ambas de *E. coli* (Figura 5.2.1; Passner et al., 2000; Moore y Kiley, 2001; Kerby et al., 2003), reveló que las posiciones *a* y *d* estaban bastante conservadas, de manera que 7 de los 8 residuos que constituyen la interfaz, a excepción del residuo T138, son aminoácidos hidrofóbicos, es decir, las posiciones V128, A131, W135, L142, A145, M149 y L152. Además, un análisis *in silico* reveló que otros dos residuos, E141 y E146, localizados en los planos axiales *g* y *e*, respectivamente, flanqueantes a los planos *a* y *d*, ocasionaban interacciones intermoleculares negativas (repulsión electrostática) en el dímero de FixK₂. Hay que mencionar que mutaciones puntuales en determinados residuos equivalentes de dicha hélice en las proteínas ortólogas que se emplearon en este estudio comparativo, evidenciaron la relevancia de los mismos en el estado oligomérico y la conformación de la proteína, su capacidad de interacción con moléculas efectoras y con ADN, así como en la actividad de las mismas (Moore y Kiley, 2001; Kerby et al., 2003). Por ello, los residuos W135, T138, E141, L142, E146 y M149 en FixK₂ se intercambiaron a alanina, y se llevó a cabo un análisis funcional *in silico*, *in vitro* e *in vivo* de los derivados resultantes.

El análisis *in silico*, que comprende la modelización bioinformática de la hélice heptamérica de cada uno de los derivados con el software PyMOL[®] (versión 2.2.3) (Figura 6.2), seguido de un procesado con el programa BIOVIA Discovery Studio Visualizer[®] (versión v20.1.0.19295), permitió determinar las variaciones en las interacciones intra- e intermoleculares entre los residuos descritos de la hélice de dimerización (Tabla 6.2.1).

Como se puede observar en la Tabla 6.2.1, el intercambio a alanina de los residuos seleccionados en FixK₂, originó cambios en el número de las relaciones favorables y/o desfavorables entre los monómeros en función del residuo reemplazado, lo cual, *a priori*,

afectaría a la conformación y el estado oligomérico de la proteína, y en consecuencia su capacidad de unirse a su promotor modelo *fixNOQP*, y actividad.

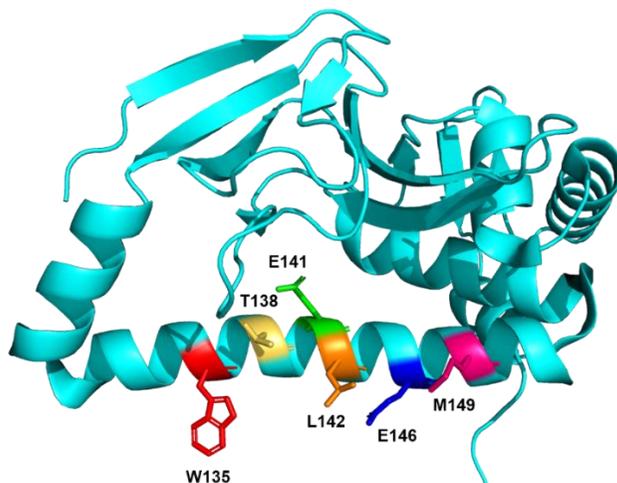


Figura 6.2. Representación gráfica de la hélice de dimerización de FixK₂. La imagen muestra un monómero de FixK₂ en la que se identifican los residuos W135, T138, E141, L142, E146 y M149 de los planos *a*, *d*, *e* y *g* de la hélice de dimerización seleccionados para este estudio. Molécula extraída de la base de datos Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/structure/4I2O>). Imagen procesada con PyMOL® (versión 2.2.3).

En particular, las posiciones W135, L142 y M149 de los planos *a* y *d*, serían los más relevantes para la formación del dímero. Esto es debido a que una sustitución en esos residuos por alanina da lugar a una disminución en las relaciones intermoleculares favorables monómero-monómero (como puentes de hidrógeno, enlace de carbono, disulfuro e hidrofóbico) (tabla 6.2.1), especialmente en los residuos W135 y M149. Además, el análisis del estado oligomérico mediante cromatografía de exclusión molecular de los derivados W135A FixK₂, L142A FixK₂ y M149A FixK₂ indicó una mayor proporción de la forma monomérica. Cabe mencionar que mutaciones a alanina en posiciones equivalentes a los residuos L142 y M149 en FixK₂ en la proteína FNR de *E. coli*, es

decir I151 e I158 afectaron la capacidad de formar dímeros de esta proteína (Moore y Kiley, 2001).

Tabla 6.2.1. Interacciones intermoleculares entre residuos de la hélice de dimerización de la proteína FixK₂.

Derivado	Interacciones	
	Favorables	Desfavorables
Parental	10	2
W135A	8	2
T138A	11	2
E141A	12	0
L142A	10	2
E146A	10	0
M149A	8	2

Favorables: Puentes de hidrógeno, enlace de carbono, disulfuro y alquilo (hidrofóbico).

Desfavorables: Donador-donador.

Sin embargo, cuando se introdujo una mutación a alanina en el residuo T138, el cual también se sitúa en el plano *d*, el número de interacciones favorables intermoleculares fue incluso mayor que en la versión parental de la proteína (tabla 9.2.1), y en consonancia, el estado oligomérico de la proteína T138A FixK₂ fue similar al de la proteína de referencia en cuanto al perfil de elución y el equilibrio monómero-dímero.

En el caso de los residuos E141 y E146, situados en los planos *g* y *e*, respectivamente, dado que proporcionaban interacciones intermoleculares negativas entre ambos monómeros, cabía pensar que la sustitución de cualquiera de los dos aminoácidos por alanina, y por consiguiente la eliminación de dichas interacciones negativas intermoleculares, resultaría en una mayor proporción de dímero, especialmente para el residuo E141 que no solo pierde dos de las interacciones negativas, sino que aumenta en dos el número de interacciones favorables dentro del plano *a-d* (tablas 6.2.1 y 9.2.1). De hecho, estudios de cromatografía de exclusión molecular

mostraron como una mutación en este residuo conllevó a una mayor proporción dimérica. En contraposición, el residuo E146, aunque perdería las mismas interacciones negativas que en el caso del residuo E141, no incrementa el número de interacciones favorables dentro de la hélice en comparación con la proteína parental (tabla 6.2.1), y se detectó una mayor abundancia del monómero que en la proteína parental en experimentos de cromatografía de exclusión molecular.

Para comprender estos resultados, se realizaron una serie de estudios comparativos *in silico* adicionales sobre las interacciones moleculares de FixK₂. El derivado E141A pierde dos interacciones negativas: entre los residuos E141 del monómero A y el E146 del monómero B; y entre el E146 del monómero A y el E141 del monómero B (planos *e-g* del derivado parental). Sin embargo, gana dos interacciones favorables entre los residuos A141 del monómero A y L142 del monómero B; y A141 del monómero B y L142 del monómero A (planos *a-g* del derivado modificado). En contraposición el derivado E146A pierde las mismas interacciones desfavorables, pero no sufre ninguna variación en el número de interacciones favorables respecto a la proteína parental. Estas diferencias intermoleculares podrían dotar a este derivado de una conformación diferente para unirse a su ADN diana y activar la transcripción (Figura 6.3).

Curiosamente, existen cuatro relaciones intermoleculares favorables en el derivado parental dentro de los planos *a-d* de la hélice de dimerización (A145-M149, W135-T138, L142-L142 y A145-A145). Las interacciones L142-L142 y A145-A145 son interacciones simples, actuando siempre el monómero A como donador y el monómero B como aceptor, y nunca se ven afectadas al realizar este tipo de mutaciones para ninguno de los derivados estudiados, de hecho, el derivado L142A FixK₂ mantiene el mismo tipo de interacción (hidrofóbica) entre los residuos de alanina en posición 142 de ambos monómeros. Las interacciones A145-M149 y W135-T138 por el contrario, son interacciones dobles, es decir, tanto el monómero A como el B actúan como donadores y aceptores lo que da lugar a una unión más energética entre monómeros. De

manera que cuando se pierde la interacción W135-T138, como es el caso del derivado W135A FixK₂ o la interacción A145-M149, como es el caso del derivado M149A FixK₂, en principio, daría lugar a una pérdida en la actividad mucho más acusada. En el caso de la sustitución del residuo T138 por alanina, no se observaron diferencias en el estado oligomérico de este derivado, ya que no se interrumpe la interacción monómero-monómero del plano *a-d* en el que participa, solo cambia el tipo de enlace, de puentes de hidrógeno a hidrofóbico.

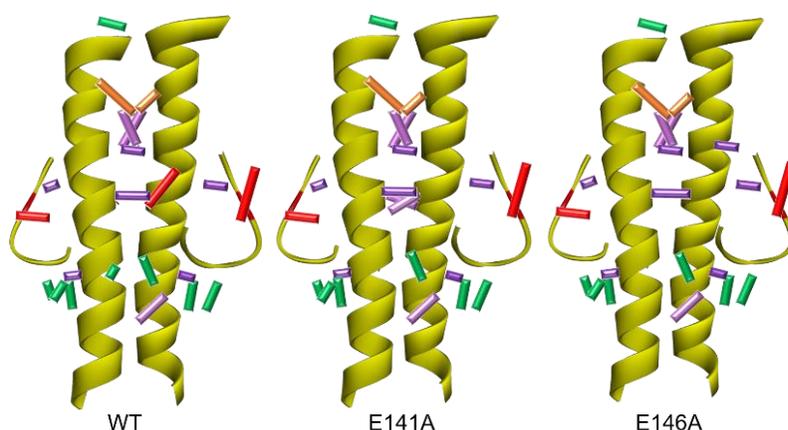


Figura 6.3. Representación gráfica del estudio *in silico* de las interacciones intermoleculares en la hélice de dimerización de distintos derivados de FixK₂. Pueden observarse variaciones entre el número de interacciones existentes entre monómeros en los derivados E141A FixK₂ y E146A FixK₂, en comparación con la proteína de referencia. Las líneas coloreadas conectan los residuos implicados en las interacciones (rojo: desfavorable; naranja: favorable electrostático; verde: enlace de hidrógeno; magenta y violeta: favorable hidrofóbico). Molécula extraída de Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/structure/4I2O>). Análisis procesado con BIOVIA Discovery Studio Visualizer® (versión v20.1.0.19295).

La consonancia entre los resultados obtenidos *in silico* e *in vitro* (Tabla 6.2.2), permiten comprender la importancia de estos cuatro

tipos de interacciones descritas (Figura 6.4), y de cómo los aas que participan en las mismas, dentro de los planos *a* y *d*, a excepción del residuo 138, deben ser los más más determinantes para el estado oligomérico de FixK₂.

Además, la capacidad de cada uno de los derivados de interactuar con la caja FixK₂ genuina, se analizó en experimentos de RPS y a su vez, se correlacionó con la actividad de la proteína en ensayos de IVT. Las constantes de afinidad, asociación y disociación proteína-ADN obtenidas, mostraron diferentes patrones de comportamiento en cada uno de los derivados, que permiten concluir que en el caso de E146A FixK₂, a pesar de ser más abundante en la forma monomérica que la proteína parental, posee una mejor constante de afinidad y de asociación por el promotor *fixNOQP* y además se disocia más lentamente, lo cual se correlaciona con los resultados de IVT en los que fue más activa que la proteína parental incluso a bajas concentraciones (0,25 μM).

A diferencia del anterior, el derivado M149A FixK₂ no fue capaz de unirse al promotor modelo, lo cual está en línea con la baja actividad de este derivado en ensayos de IVT y las predicciones *in silico*. Por otra parte, los derivados con intercambios W135A, T138A y E141A en FixK₂ mostraron una afinidad por ADN ligeramente mejor que la de la proteína de referencia, mientras que, con excepción del derivado W135A FixK₂, se disocian más rápidamente del ADN, si bien su constante de asociación se vio ligeramente mejorada. Es más, a excepción del derivado T138A, el cual se comporta como la proteína parental, los otros dos presentaron una capacidad reducida para activar la transcripción del promotor del operón *fixNOQP* en ensayos de IVT. Por último, el derivado M142A FixK₂ presentó menor afinidad por ADN con una asociación más lenta y disociación más rápida que la proteína parental, lo cual se pudo correlacionar con la predominancia de la forma monomérica y su menor capacidad de activar la transcripción en ensayos de IVT (Tabla 6.2.2).

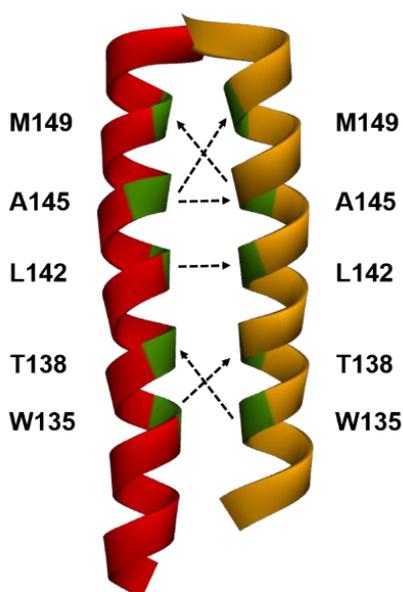


Figura 6.4. Representación esquemática de las interacciones intermoleculares de la hélice de dimerización de FixK₂ en la proteína parental. Las flechas indican las interacciones positivas entre residuos (marcado en verde) de los monómeros A (marcado en rojo) y B (marcado en naranja) en estado de dímero. A ambos lados de la imagen se indican los aminoácidos implicados. Imagen adaptada de un procesamiento bioinformático mediante BIOVIA Discovery Studio Visualizer® (versión v20.1.0.19295). Molécula extraída de Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/structure/4I2O>).

Finalmente, se analizó el efecto *in vivo* de las mutaciones introducidas en la hélice de dimerización de FixK₂ en cuanto a la expresión de una fusión *fixNOQP*'-*lacZ* en células cultivadas en condiciones microóxicas y la capacidad de crecer en condiciones desnitrificantes. En experimentos llevados a cabo, tanto con una cepa Δ *fixK*₂ complementada *en trans* de forma individual con plásmidos que expresan los distintos derivados, como con cepas con mutaciones puntuales en los distintos residuos, no se observaron diferencias significativas respecto al fenotipo parental (apartado 5.2.5.1.1 y 5.2.5.2.1). Estos hallazgos contrastan con los

resultados *in vitro* respecto a la capacidad de interactuar con ADN en ensayos de RPS y de activar la transcripción en experimentos de IVT para los derivados con sustituciones T135A, E141A, L142A y M149A. La razón de esta divergencia en estos resultados podría estar asociada a la existencia de mecanismos compensatorios *in vivo* que resultaran en el mismo fenotipo que el de la proteína parental, al igual de lo descrito para el intercambio C183D en FixK₂ (capítulo 5.1.3; Parejo et al., 2022), en el que los niveles de proteína mutante detectados fueron superiores a los de parental en células de *B. diazoefficiens*, tanto en vida libre como en simbiosis. Esta hipótesis se pudo confirmar en el caso de la cepa que codifica el derivado M149A, en la que los niveles de proteína fueron un 40% superiores a los de la proteína de referencia. Sin embargo, los niveles de proteína en las cepas codificantes de los derivados W135A y E141A no experimentaron cambios con respecto a la parental, e incluso en aquella que codifica el derivado L142A fueron ligeramente inferiores (una reducción de aproximadamente el 20%).

Tabla 6.2.2. Compilación de las propiedades de derivados de FixK₂ con mutaciones en la hélice de dimerización.

Derivados de FixK ₂	SEC ^a	IVT ^b	RPS ^c			In vivo		
			K _D	K _a	K _d	WB ^d	β-galactosidasa UM ^e	UM ^f
W135A	>>M	<<	3,9 x 10 ⁻⁹	6,5 x 10 ⁵	2 x 10 ⁻³	≈	4,4 x 10 ²	2,8 x 10 ³
T138A	>D	≈	4,6 x 10 ⁻⁹	2 x 10 ⁶	7,5 x 10 ⁻³	≈	5,5 x 10 ²	n.d.
E141A	>>D	<<	1,6 x 10 ⁻⁹	5,4 x 10 ⁶	8 x 10 ⁻³	≈	4,9 x 10 ²	2,9 x 10 ³
L142A	>>>M	<<<	1,6 x 10 ⁻⁸	7,5 x 10 ⁵	1 x 10 ⁻²	≈	5,1 x 10 ²	2,8 x 10 ³
E146A	>M	>>	3,6 x 10 ⁻¹⁰	1,2 x 10 ⁷	3,3 x 10 ⁻³	n.d.	4,1 x 10 ²	n.d.
M149A	>M	<<<				>	4,3 x 10 ²	3,4 x 10 ³
Parental			7,6 x 10 ⁻⁹	9,2 x 10 ⁵	6,5 x 10 ⁻³		5,9 x 10 ²	3,5 x 10 ³

^a Estado oligomérico determinado por cromatografía de exclusión molecular (SEC). Los símbolos > ó <, así como el número de los mismos indican una mayor ó menor proporción de monómero (M) o de dímero (D), respectivamente, que en la proteína de referencia.

^b Capacidad de activar la transcripción del promotor *fixNOQP* en ensayos de transcripción *in vitro* (IVT). Los símbolos > ó <, así como el número de los mismos indican la mayor o menor actividad con respecto a la de la proteína parental. ≈, actividad similar a la de la proteína parental.

- ^c Capacidad de interaccionar con la caja FixK₂ presente en el promotor *fixNOQP* en ensayos de resonancia de plasmones de superficie (RPS). K_D, constante de afinidad (M); K_a, constante de asociación (M⁻¹ s⁻¹); K_d, constante de disociación (s⁻¹).
- ^d Niveles de proteína en extractos de células de cultivadas en condiciones de microoxia (0,5% O₂) determinados por inmunodetección con un anticuerpo policlonal α-FixK₂ (Mesa et al., 2009). ≈, niveles similares a los de la proteína parental. n.d., no determinado.
- ^e Expresión de una fusión *fixNOQP* - *lacZ* en la cepa Δ*fixK*₂ complementada *in trans* con plásmidos que expresan individualmente los distintos derivados proteicos. UM, unidades Miller.
- ^f Expresión de una fusión *fixNOQP* - *lacZ* en cepas con mutaciones puntuales en residuos de la hélice de dimerización de FixK₂. UM, unidades Miller.

Modelización molecular proteína-ligando para la identificación del cofactor de FixK₂

Los factores de transcripción de tipo CRP/FNR tienen una similitud bastante baja entre los miembros de la familia (<25%), pero conservan una estructura similar a la de la proteína CRP con cuatro dominios funcionales conservados en el que el dominio sensor en la parte amino-terminal juega un papel clave en la interacción con una molécula efectora que regula la actividad de la proteína (Körner et al., 2003). Las proteínas CRP/FNR son en su mayoría activadores que actúan como dímeros (Browning y Busby, 2004). Los estímulos intra-y extracelulares, dan lugar a la interacción entre la molécula de señalización y el dominio sensor, lo que conduce a un cambio conformacional, produciendo la unión del dímero activo en la región promotora de los genes diana. Los modos de percepción de la señal descritas en estas proteínas pueden ser a través de la percepción directa de un factor de estrés, la unión a un grupo prostético o la unión de una molécula efectora.

La proteína FixK₂ es capaz de activar la transcripción *in vitro* de los genes que regula en colaboración con la ARN polimerasa de *B. diazoefficiens* en ausencia de un cofactor conocido (Mesa et al., 2005). No obstante, la estructura del complejo FixK₂-ADN, reveló la presencia de una cavidad con carga negativa en cada uno de los monómeros que indica la posible unión a una molécula efectora (Bonnet et al., 2013a). Dicha cavidad, guarda homología con la proteína CRP de *E. coli*, la cual requiere AMPc como cofactor (Körner et al., 2003), por lo que el modelo de interacción CRP-AMPc se consideró como referencia para los estudios de modelización molecular FixK₂-ligando (Figura 6.5).

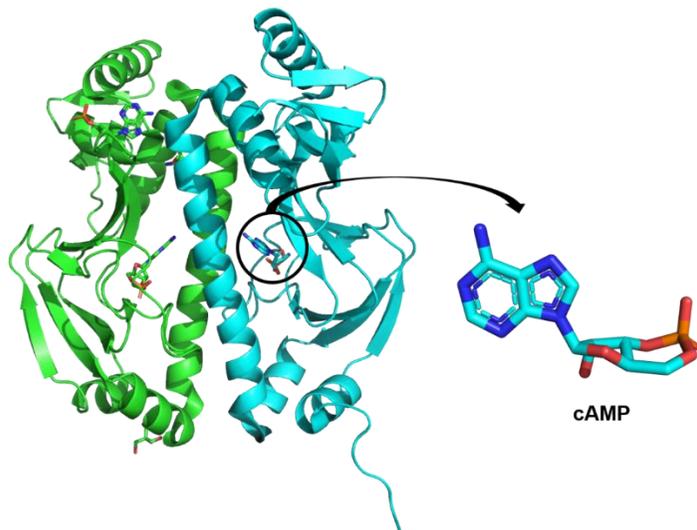


Figura 6.5. Estructura de CRP en complejo con AMPc. La estructura se descargó de la base de datos Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>; ID: 1I5Z). La molécula de AMPc se muestra ampliada a la derecha de la figura. Imagen procesada con PyMOL® (versión 2.2.3); Modalidad de visualización *cartoon* (proteína CRP) y *licorice* (AMPc).

Las predicciones *in silico*, conjuntamente con la localización de puntos farmacofóricos y el estudio de residuos aminoacídicos que podrían jugar un papel clave en una posible interacción FixK₂-molécula efectora, revelaron la presencia e importancia de una histidina en posición 100 protonada en la cavidad de la proteína, como aminoácido esencial para dicha interacción con cofactores aceptores de protones. Es más, se observó una alta afinidad entre derivados nucleotídicos y la cavidad, tal como ocurre en el caso de CRP-AMPc, al ajustarse más óptimamente al plano espacial de la misma (Figura 6.6), por lo que fueron considerados candidatos de gran interés en este estudio. No obstante, el proceso completo de

modelización molecular y los cribados posteriores de selección, incluyendo su presencia en bases de datos de *B. diazoefficiens* y/o de soja, permitió identificar otras 26 moléculas como posibles cofactores para FixK₂ (Tabla 5.3.1).

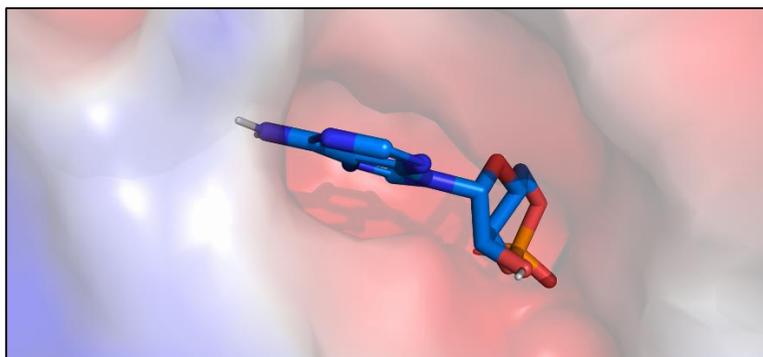


Figura 6.6. Acoplamiento *in silico* de la molécula de AMPc en la cavidad cargada negativamente de FixK₂. Imagen obtenida mediante PyMOL® (versión 2.2.3) de la cavidad con carga negativa de FixK₂ en la que se muestra la alta afinidad espacial con derivados nucleotídicos (AMPc como ligando de referencia).

Con el fin de verificar que un intercambio en el residuo H100 a alanina pudiera afectar a la unión con una posible molécula efectora de FixK₂ y, en consecuencia, su actividad, se construyó una cepa de *B. diazoefficiens* que codifica un derivado H100A FixK₂ (apartado 5.3). Dado que FixK₂ es capaz de regular los genes para la desnitrificación, se analizó la capacidad de crecer en condiciones desnitrificantes de esta cepa, es decir, en condiciones de anoxia con nitrato como aceptor final de electrones. Sin embargo, su fenotipo fue similar al de la cepa parental, en cuanto tasa de crecimiento y rendimiento final, (Figura 5.3.18) lo que indica que el

intercambio de histidina a alanina no parece afectar negativamente a la actividad de la proteína FixK₂, al menos, *in vivo*.

Consideraciones finales

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral contribuyen a mejorar el conocimiento de la proteína FixK₂ de *B. diazoefficiens*, organismo modelo en este estudio y, en consecuencia, ampliar la comprensión de la funcionalidad de la familia de factores transcripcionales CRP/FNR.

En el primer capítulo, se ha profundizado en el control postraduccional por oxidación de esta proteína. El estudio llevado a cabo partía de la hipótesis de si la modificación en el residuo C183 de FixK₂ a ácido aspártico podría conferir a *B. diazoefficiens* una resistencia adquirida a las ROS que se generan durante la interacción simbiótica con su planta hospedadora. Los resultados obtenidos con la variante C183D FixK₂ que mimetiza parcialmente la superoxidación de FixK₂, revelaron la existencia, *in vivo*, de mecanismos de modulación, a nivel transcripcional y postranscripcional, de la inactivación por oxidación de FixK₂, que dan lugar a mayores niveles de la proteína FixK₂, y, en consecuencia, un fenotipo similar al de la cepa parental tanto en vida libre como en simbiosis. Sin embargo, este efecto compensatorio no se observó para la autorregulación negativa del gen *fixK₂*, ya que su perfil de expresión en la cepa C183D-*fixK₂* se indujo, al igual que lo observado para la cepa Δ *fixK₂*. No obstante, la comparación de los perfiles transcripcionales de ambas cepas cultivadas en condiciones de microoxia, reveló un grupo común de genes entre los que se encuentra el gen *bll0330* que codifica un gen regulador de respuesta y además, contiene una caja FixK₂ en su región promotora (Tabla 5.1.2). De hecho, forma parte del grupo de genes activados por el regulador de respuesta FixJ, si bien esta

observación se obvió anteriormente ya que su expresión no se induce por microoxia (Mesa et al., 2008). Por lo tanto, sería interesante realizar un análisis funcional de este regulador para analizar su implicación en la autorregulación negativa de *fixK₂*, así como el mecanismo por el cual ejercería su posible función.

Por otra parte, en el segundo capítulo, hemos observado cómo la sustitución por alanina en el residuo E141 conlleva a una mayor proporción dimerica según estudios de cromatografía de exclusión molecular, aunque, los resultados de IVT indicaron menor actividad, y en RPS se observó una peor constante de afinidad por el ADN, pero si una constante de asociación mejorada. Estos resultados pueden llevar a pensar que una mutación en el residuo E141, puede dar lugar a conformaciones menos activas de la proteína FixK₂, independientemente del estado oligomérico asociado, o por el contrario a la formación de complejos inactivos, como tetrámeros. Por tanto, resultaría de interés llevar a cabo un estudio más detallado de la conformación de este derivado mediante ultracentrifugación analítica. En contraposición, el residuo E146, aun perdiendo las mismas interacciones negativas que el residuo anterior, no incrementa sus interacciones favorables, y además presenta una mayor proporción monomérica y mejor capacidad de interactuar con ADN (RPS) y de activar la transcripción *in vitro* (IVT). Debemos de tener en cuenta que la actividad de la proteína no está solo determinada por el número y tipo de interacciones existentes entre residuos clave para la dimerización, sino por la conformación que adopte la estructura terciaria y cuaternaria de la misma, que a su vez está influenciada por las interacciones favorables y desfavorables intramoleculares (monómero) y/o intermoleculares (dímero). Estas variaciones pueden dotar al derivado E146A FixK₂ de una conformación mejorada para la actividad de la proteína y para interactuar con su ADN diana.

Para dar una explicación plausible del comportamiento *in vitro* del derivado M149A FixK₂, el menos activo de todos los estudiados, cabe destacar la pérdida de dos interacciones intermoleculares favorables en la hélice de dimerización (entre los residuos A145 y M149, y entre los residuos H148 y M149). Pero curiosamente, este derivado, adquiere una nueva interacción intermolecular dentro del mismo plano, entre el residuo A149 y L152. Resulta interesante mencionar que L152 es el último aminoácido de la hélice de dimerización, y el más próximo al dominio de unión a ADN, por lo que la formación de una nueva interacción podría conducir a una conformación mucho menos efectiva en la interacción con ADN (Figura 6.7).

Cabe destacar que, durante la realización de ensayos de cromatografía de exclusión molecular, observamos que los picos no eran simétricos con una tendencia a la formación de colas cromatográficas (*tailing*) en la fracción final de elución de la columna. Este efecto, se observó previamente en un derivado de FixK₂ con una cola de histidinas en su parte amino-terminal (His₆-FixK₂) (Mesa et al., 2005), lo cual es indicativo de un equilibrio monómero-dímero dependiente de concentración. Para verificar este comportamiento en los derivados empleados en este estudio y excluir el efecto de una posible adsorción en la matriz de la columna que interferiría en los resultados, se podrían llevar a cabo ensayos de cromatografía de exclusión molecular incrementando la fuerza iónica del tampón de elución.

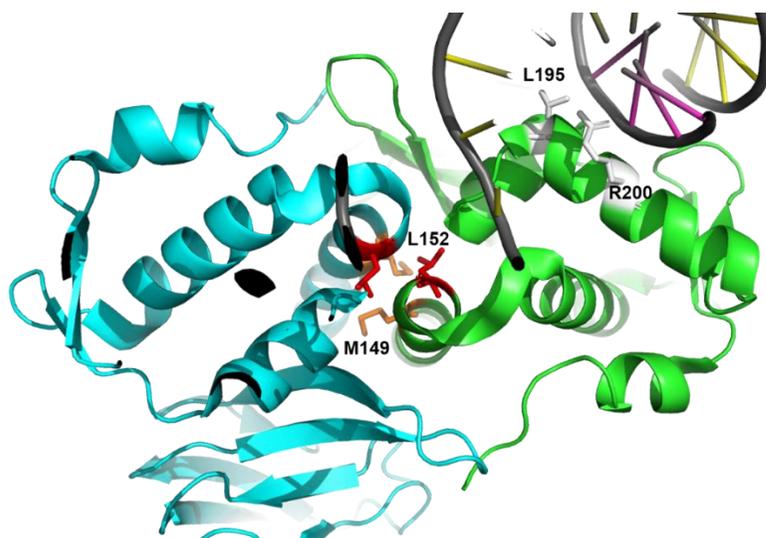


Figura 6.7. Visualización tridimensional de los dominios de dimerización y de interacción de ADN de FixK₂. Imagen representativa de la proximidad entre los residuos M149 (marcado en naranja) y L152 (marcado en rojo) de la hélice de dimerización de FixK₂, a los residuos implicados en la unión a ADN L195 y R200 (marcados en blanco). Como se puede apreciar, el residuo L152 (último aminoácido de la espiral heptamérica situado en el plano *d*) es el aminoácido con mayor proximidad al dominio de unión ADN, situado a 15 y 17,5 Å de los residuos L195 y R200 respectivamente. Monómero A (azul), monómero B (verde). Molécula extraída de Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/structure/4I2O>). Imagen procesada con PyMOL® (versión 2.2.3).

En el tercer capítulo, los resultados obtenidos mediante el análisis *in vivo*, nos han permitido descartar que la interacción del posible cofactor con FixK₂ dependa de un único residuo en la cavidad sensora, o al menos con las características que confiere el intercambio del residuo de H100 a alanina. Por lo que sería

conveniente analizar, si al introducir un residuo cargado negativamente como el ácido aspártico, podría conducir a una repulsión electrostática con una posible molécula efectora y, en consecuencia, un efecto en la actividad de FixK₂. Así mismo, sería interesante estudiar la importancia de otros residuos en la cavidad próximos a H100 para la interacción de FixK₂ con su cofactor mediante un análisis funcional.

Por otra parte, tomando como referencia la lista final de 27 posibles cofactores de FixK₂ obtenidos en este trabajo, se prevé llevar a cabo una serie de ensayos *in vitro* de interacción con el complejo FixK₂-ADN, con aquellas moléculas (naturales o sintéticas) que se encuentren comercialmente disponibles. Dichos análisis comenzarán un primer cribado de los posibles candidatos mediante ensayos de cambio en la temperatura de desnaturalización de la proteína (*Thermal shift*), para a continuación, llevar a cabo ensayos de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) en los cuales se analizará la interacción del complejo FixK₂-ADN con los ligandos seleccionados. Una vez identificado el posible cofactor, será de interés analizar cómo la unión del mismo a FixK₂ afecta su estado oligomérico (mediante SEC), así como sus propiedades para unirse a ADN mediante experimentos de ITC y su capacidad de activar la transcripción (experimentos de IVT). Como experimentos complementarios *in vivo*, en el caso de hallar moléculas potencialmente candidatas como cofactor de FixK₂, sería interesante llevar a cabo la construcción de cepas mutantes de *B. diazoefficiens* en genes implicados en la síntesis de dicho sustrato específico, con objeto de descubrir cualquier dato fisiológico que respalde el papel del cofactor en la actividad de FixK₂.

En resumen, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, en su conjunto, han permitido conocer mejor la relación estructura

función de FixK₂ de *B. diazoefficiens*, lo que contribuirá a avanzar en el conocimiento actual de la regulación de la interacción *Rhizobium*-leguminosa y proveer las bases científicas para modificar proteínas de tipo FixK para incrementar la eficiencia simbiótica y la capacidad de respuesta a cambios en la concentración de oxígeno de rizobios. En consecuencia, permitirá desarrollar, a medio/largo plazo, herramientas biotecnológicas con el objeto de mejorar el diseño de inoculantes y prácticas agrícolas más productivas y adecuadas para una Agricultura sostenible y respetuosa con el medioambiente y la salud.

7

CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

7. CONCLUSIONES

1. El intercambio a ácido aspártico del residuo C183 de la proteína FixK₂ de *Bradyrhizobium diazoefficiens* permitió profundizar en su control postraduccional por oxidación, ya que simula de forma estable estados superoxidados de la proteína.
2. Existe un mecanismo multifactorial, a nivel transcripcional y postranscripcional, que modula la inactivación por oxidación de FixK₂, tanto en condiciones de microoxia en vida libre como en simbiosis con plantas de soja.
3. Al igual que lo descrito en otros ortólogos, los residuos que se encuentran en las posiciones *a* y *d* de una espiral heptamérica están implicados en la dimerización de FixK₂ y en particular, se corresponden con los aminoácidos T135, M142 y M149.
4. Los residuos E141 y E146 de las posiciones *g* y *e* de la espiral heptamérica de FixK₂ también participan en la conformación activa de la proteína.
5. La mutación M149A tiene un efecto más radical que los otros residuos en la capacidad de unión a ADN y actividad de FixK₂. Sin embargo, existe un mecanismo compensatorio en células de *B. diazoefficiens* que da lugar al fenotipo de la proteína parental.
6. Existe una correlación entre la mayor abundancia del monómero de FixK₂, la menor capacidad de interaccionar con ADN y de activar la transcripción *in vitro*, a excepción del derivado con la mutación E146A.
7. Una modelización *in silico* proteína-ligando, conjuntamente con un cribado posterior (similitudes con cofactores de otros ortólogos, presencia de los metabolitos en las bases de datos

de rizobios y leguminosas) permitió la identificación de 27 moléculas como cofactores potenciales de FixK₂. En este conjunto destacan los compuestos nucleotídicos como el AMP cíclico.

8. El residuo H100 es el principal candidato para la interacción de FixK₂ con su posible cofactor.

CONCLUSIONS

1. The exchange of C183 to aspartic acid in *Bradyrhizobium diazoefficiens* FixK₂ mimicked superoxidized states of the protein, thus allowing to deepen our understanding on its post-translational control by oxidation.
2. There is a multifactorial mechanism, at transcriptional and postranscriptional levels, that modulates oxidation-mediated FixK₂ inactivation, both under microoxic, free-living conditions, and in symbiosis with soybean plants.
3. As described in other orthologous proteins, the residues located at positions *a* and *d* of a coiled-coil heptad repeat are involved in FixK₂ dimerization, and in particular, they correspond to amino acids T135, M142 and M149.
4. Residues E141 and E146 at the *g* and *e* of the heptameric spiral of FixK₂ also participate in the active conformation of the protein.
5. M149A mutation has a more radical effect on protein-DNA ability and *in vitro* activity of FixK₂. However, there is an alternative compensatory mechanism *in vivo* that resulted in the phenotype of the parental protein.
6. There is a correlation between an increased monomer FixK₂ population, reduced capacity to interact with DNA and *in vitro* transcription activation activity, except for the E146A FixK₂ variant.
7. Protein-ligand modelling in combination with subsequent screenings (cofactors similarity with other orthologues, metabolites present in rhizobia and/or legumes), allowed the identification of 27 molecules as potential cofactors for FixK₂.

Within this group, nucleotide compounds such as cyclic AMP are outstanding.

8. H100 is the prominent candidate residue for FixK₂-cofactor interaction.

8

BIBLIOGRAFÍA

Agari, Y., Kashihara, A., Yokoyama, S., Kuramitsu, S., and Shinkai, A. (2008) Global gene expression mediated by *Thermus thermophilus* SdrP, a CRP/FNR family transcriptional regulator. *Mol Microbiol* **70**: 60-75.

Aono, S., Nakajima, H., Saito, K., and Okada, M. (1996) A novel heme protein that acts as a carbon monoxide-dependent transcriptional activator in *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem Biophys Res Commun* **228**: 752-756.

Aono, S., Ohkubo, K., Matsuo, T., and Nakajima, H. (1998) Redox-controlled ligand exchange of the heme in the CO-sensing transcriptional activator CooA. *J Biol Chem* **273**: 25757-25764.

Apel, K., and Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 373-399.

Arsene, F., Kaminski, P.A., and Elmerich, C. (1996) Modulation of NifA activity by PII in *Azospirillum brasilense*: evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain. *J Bacteriol* **178**: 4830-4838.

Arsene, F., Kaminski, P.A., and Elmerich, C. (1999) Control of *Azospirillum brasilense* NifA activity by P(II): effect of replacing Tyr residues of the NifA N-terminal domain on NifA activity. *FEMS Microbiol Lett* **179**: 339-343.

Baron, C., and Zambryski, P.C. (1995) The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding: variations on a common theme? *Annu Rev Genet* **29**: 107-129.

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.

Bastiat, B., Sauviac, L., and Bruand, C. (2010) Dual control of *Sinorhizobium meliloti* RpoE2 sigma factor activity by two PhyR-type two-component response regulators. *J Bacteriol* **192**: 2255-2265.

Bates, D.M., Popescu, C.V., Khoroshilova, N., Vogt, K., Beinert, H., Munck, E., and Kiley, P.J. (2000) Substitution of leucine 28 with histidine in the *Escherichia coli* transcription

factor FNR results in increased stability of the $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ cluster to oxygen. *J Biol Chem* **275**: 6234-6240.

Batut, J., Daveran-Mingot, M.L., David, M., Jacobs, J., Garnerone, A.M., and Kahn, D. (1989) *fixK*, a gene homologous with *fnr* and *crp* from *Escherichia coli*, regulates nitrogen fixation genes both positively and negatively in *Rhizobium meliloti*. *EMBO J* **8**: 1279-1286.

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.

Becana, M., and Klucas, R.V. (1992) Oxidation and reduction of leghemoglobin in root nodules of leguminous plants. *Plant Physiol* **98**: 1217-1221.

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.

Bedmar, E.J., Bueno, E., Correa, D., Torres, M.J., Delgado, M.J., and Mesa, S. (2014) Ecology of denitrification in soils and plant-associated bacteria. In *Beneficial plant-microbial interactions: Ecology and Applications*. Rodelas González, M.B., and González-López, J. (eds). Boca Ratón, Florida, U.S.A.: CRC Press, pp. 164-182.

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. In *Beneficial plant-microbial interactions*: CRC Press, pp. 165-182.

Benoff, B., Yang, H., Lawson, C.L., Parkinson, G., Liu, J., Blatter, E. et al. (2002) Structural basis of transcription activation: the CAP- α CTD-DNA complex. *Science* **297**: 1562-1566.

Berger, D.K., Narberhaus, F., Lee, H.S., and Kustu, S. (1995) *In vitro* studies of the domains of the nitrogen fixation regulatory protein NIFA. *J Bacteriol* **177**: 191-199.

- Berges, H., Checroun, C., Guiral, S., Garnerone, A.M., Boistard, P., and Batut, J. (2001) A glutamine-amidotransferase-like protein modulates FixT anti-kinase activity in *Sinorhizobium meliloti*. *BMC Microbiol* **1**: 6.
- Blanquet, P., Silva, L., Catrice, O., Bruand, C., Carvalho, H., and Meilhoc, E. (2015) *Sinorhizobium meliloti* controls nitric oxide-mediated post-translational modification of a *Medicago truncatula* nodule protein. *Mol Plant Microbe Interact* **28**: 1353-1363.
- 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. (2011) Biochemical studies on FixK₂, a global regulatory protein from *Bradyrhizobium japonicum*: Proteolytic control and attempts at crystallization. In *Dep of biology*. Zürich, Switzerland: ETH-Zürich.
- Bonnet, M., Kurz, M., Mesa, S., Briand, C., Hennecke, H., and Grutter, M.G. (2013a) The structure of *Bradyrhizobium japonicum* transcription factor FixK₂ unveils sites of DNA binding and oxidation. *J Biol Chem* **288**: 14238-14246.
- Bonnet, M., Stegmann, M., Maglica, Z., Stiegeler, E., Weber-Ban, E., Hennecke, H., and Mesa, S. (2013b) FixK₂, a key regulator in *Bradyrhizobium japonicum*, is a substrate for the protease ClpAP *in vitro*. *FEBS Lett* **587**: 88-93.
- Borjigin, M., Li, H., Lanz, N.D., Kerby, R.L., Roberts, G.P., and Poulos, T.L. (2007) Structure-based hypothesis on the activation of the CO-sensing transcription factor CooA. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **63**: 282-287.
- Boscari, A., Del Giudice, J., Ferrarini, A., Venturini, L., Zaffini, A.L., Delledonne, M., and Puppo, A. (2013) Expression dynamics of the *Medicago truncatula* transcriptome during the symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*: which role for nitric oxide? *Plant Physiol* **161**: 425-439.
- Botsford, J.L., and Harman, J.G. (1992) Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol Rev* **56**: 100-122.

- Brewin, N.J. (2004) Plant cell wall remodelling in the *Rhizobium*–legume symbiosis. In *Critical reviews in plant sciences*: Taylor & Francis, pp. 293-316.
- Brown, K.L., and Hughes, K.T. (1995) The role of anti-sigma factors in gene regulation. *Mol Microbiol* **16**: 397-404.
- Browning, D.F., and Busby, S.J. (2004) The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat Rev Microbiol* **2**: 57-65.
- Bruning-Fann, C.S., and Kaneene, J.B. (1993) The effects of nitrate, nitrite, and N-nitroso compounds on animal health. *Vet Hum Toxicol* **35**: 237-253.
- 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.
- Buck, M., Gallegos, M.T., Studholme, D.J., Guo, Y., and Gralla, J.D. (2000) The bacterial enhancer-dependent σ^{54} (σ^N) transcription factor. *J Bacteriol* **182**: 4129-4136.
- Bush, M., and Dixon, R. (2012) The role of bacterial enhancer binding proteins as specialized activators of sigma⁵⁴-dependent transcription. *Microbiol Mol Biol Rev* **76**: 497-529.
- 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., Jiménez-Leiva, A., Tomás-Gallardo, L., Parejo, S., Casado, S., Torres, M.J. et al. (2021) Dissection of FixK₂ protein-DNA interaction unveils new insights into *Bradyrhizobium diazoefficiens* lifestyles control. *Environ Microbiol* **23**: 6194-6209.
- Campbell, E.A., Westblade, L.F., and Darst, S.A. (2008) Regulation of bacterial RNA polymerase sigma factor activity: a structural perspective. *Curr Opin Microbiol* **11**: 121-127.
- Canfield, D.E., Glazer, A.N., and Falkowski, P.G. (2010) The evolution and future of Earth's nitrogen cycle. *Science* **330**: 192-196.

- Cardenas, L., and Quinto, C. (2008) Reactive oxygen species (ROS) as early signals in root hair cells responding to rhizobial nodulation factors. *Plant Signal Behav* **3**: 1101-1102.
- Carol, R.J., and Dolan, L. (2006) The role of reactive oxygen species in cell growth: lessons from root hairs. *J Exp Bot* **57**: 1829-1834.
- Carpena, R., Esteban, E., Lucena, J.J., Peñalosa, J., Vázquez, S., Zorzona, P., and Gárate, A. (2006) Simbiosis y fitorrecuperación de suelos. In *Fijación biológica de nitrógeno: fundamentos y aplicaciones*. Bedmar, E.J., González, J., Lluch, C., and Rodelas, B. (ed): Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN), pp. 255-268.
- Chang, A.Y., Chau, V.W., Landas, J.A., and Pang, Y. (2017) Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation. *JEMI methods* **1**: 22-25.
- Chang, C., Damiani, I., Puppo, A., and Frendo, P. (2009) Redox changes during the legume-rhizobium symbiosis. *Mol Plant* **2**: 370-377.
- Colombo, M.V., Gutierrez, D., Palacios, J.M., Imperial, J., and Ruiz-Argueso, T. (2000) A novel autoregulation mechanism of *fnrN* expression in *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae*. *Mol Microbiol* **36**: 477-486.
- Crack, J.C., Green, J., Cheesman, M.R., Le Brun, N.E., and Thomson, A.J. (2007) Superoxide-mediated amplification of the oxygen-induced switch from [4Fe-4S] to [2Fe-2S] clusters in the transcriptional regulator FNR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 2092-2097.
- D'Haese, W., Glushka, J., De Rycke, R., Holsters, M., and Carlson, R.W. (2004) Structural characterization of extracellular polysaccharides of *Azorhizobium caulinodans* and importance for nodule initiation on *Sesbania rostrata*. *Mol Microbiol* **52**: 485-500.
- D'Hooghe, I., Michiels, J., Vlassak, K., Verreth, C., Waelkens, F., and Vanderleyden, J. (1995) Structural and functional analysis of the *fixLJ* genes of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* CNPAF₅₁₂. *Mol Gen Genet* **249**: 117-126.
- Daims, H., Lucker, S., and Wagner, M. (2016) A new perspective on microbes formerly known as nitrite-oxidizing bacteria. *Trends Microbiol* **24**: 699-712.

Dalton, D.A., Post, C.J., and Langeberg, L. (1991) Effects of ambient oxygen and of fixed nitrogen on concentrations of glutathione, ascorbate, and associated enzymes in soybean root nodules. *Plant Physiol* **96**: 812-818.

Damiani, I., Pauly, N., Puppo, A., Brouquisse, R., and Boscari, A. (2016) Reactive oxygen species and nitric oxide control early steps of the legume - *Rhizobium* symbiotic interaction. *Front Plant Sci* **7**: 454.

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.

David, M., Daveran, M.L., Batut, J., Dedieu, A., Domergue, O., Ghai, J. et al. (1988) Cascade regulation of *nif* gene expression in *Rhizobium meliloti*. *Cell* **54**: 671-683.

Delamuta, J.R.M., 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 (Reading)* **149**: 3395-3403.

Delmotte, N., Ahrens, C.H., Knief, C., Qeli, E., Koch, M., Fischer, H.M. et al. (2010) An integrated proteomics and transcriptomics reference data set provides new insights into the *Bradyrhizobium japonicum* bacteroid metabolism in soybean root nodules. *Proteomics* **10**: 1391-1400.

Denarie, J., and Cullimore, J. (1993) Lipo-oligosaccharide nodulation factors: a minireview new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Cell* **74**: 951-954.

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

- Downie, J.A. (2005) Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. *Curr Biol* **15**: R196-198.
- Dreyfus, B.L., and Dommergues, Y.R. (1981) Nitrogen-fixing nodules induced by *Rhizobium* on the stem of the tropical legume *Sesbania rostrata*. *FEMS Microbiology Letters* **10**: 313–317.
- Dreyfus, B.L., Elmerich, C., and Dommergues, Y.R. (1983) Free-living *Rhizobium* strain able to grow on N₂ as the sole nitrogen source. *Appl Environ Microbiol* **45**: 711-713.
- 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**: e1001027.
- 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.
- Earl, C.D., Ronson, C.W., and Ausubel, F.M. (1987) Genetic and structural analysis of the *Rhizobium meliloti* *fixA*, *fixB*, *fixC*, and *fixX* genes. *J Bacteriol* **169**: 1127-1136.
- Earnshaw, A., and Greenwood, N.N. (1997) Nitrogen. In *Chemistry of the elements*: Elsevier Ltd., pp. 406-472.
- Edgren, T., and Nordlund, S. (2004) The *fixABCX* genes in *Rhodospirillum rubrum* encode a putative membrane complex participating in electron transfer to nitrogenase. *J Bacteriol* **186**: 2052-2060.
- Eiting, M., Hageluken, G., Schubert, W.D., and Heinz, D.W. (2005) The mutation G145S in PrfA, a key virulence regulator of *Listeria monocytogenes*, increases DNA-binding affinity by stabilizing the HTH motif. *Mol Microbiol* **56**: 433-446.
- Emmer, M., deCrombrughe, B., Pastan, I., and Perlman, R. (1970) Cyclic AMP receptor protein of *E. coli*: its role in the synthesis of inducible enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **66**: 480-487.
- Ensign, S.A., Bonam, D., and Ludden, P.W. (1989) Nickel is required for the transfer of electrons from carbon monoxide to the iron-sulfur center(s) of carbon monoxide dehydrogenase from *Rhodospirillum rubrum*. *Biochemistry* **28**: 4968-4973.

- Epstein, W., Rothman-Denes, L.B., and Hesse, J. (1975) Adenosine 3':5'-cyclic monophosphate as mediator of catabolite repression in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**: 2300-2304.
- Evangelista, W., Knapp, J., Zandarashvili, L., Esadze, A., White, M.A., Gribenko, A.V., and Lee, J.C. (2021) Signal Transmission in *Escherichia coli* Cyclic AMP Receptor Protein for Survival in Extreme Acidic Conditions. *Biochemistry* **60**: 2987-3006.
- Ferguson, S.J., Richardson, D.J., and van Spanning, R.J.M. (2007) Biochemistry and Molecular Biology of Nitrification. In *Biology of the nitrogen cycle*. Bothe, H., Ferguson, S., and Newton, W. (ed). Netherlands: Elsevier, pp. 209-222.
- Fernández, N., Cabrera, J.J., Salazar, S., Parejo, S., Rodríguez, M., Lindemann, A. et al. (2016) Molecular determinants of negative regulation of the *Bradyrhizobium diazoefficiens* transcription factor FixK₂. In *Biological nitrogen fixation and beneficial plant-microbe interactions*. González-Andrés, F., and James, E. (eds). Switzerland: Springer, Cham, pp. 57-72.
- Fernández, N., Cabrera, J.J., Varadarajan, A.R., Lutz, S., Ledermann, R., Roschitzki, B. et al. (2019) An integrated systems approach unveils new aspects of microoxia-mediated regulation in *Bradyrhizobium diazoefficiens*. *Front Microbiol* **10**: 924.
- Fic, E., Bonarek, P., Gorecki, A., Kedracka-Krok, S., Mikolajczak, J., Polit, A. et al. (2009) cAMP receptor protein from *Escherichia coli* as a model of signal transduction in proteins. A review. *J Mol Microbiol Biotechnol* **17**: 1-11.
- Fischer, H.M. (1994) Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol Rev* **58**: 352-386.
- Fischer, H.M. (1996) Environmental regulation of rhizobial symbiotic nitrogen fixation genes. *Trends Microbiol* **4**: 317-320.
- Flynn, J.M., Neher, S.B., Kim, Y.I., Sauer, R.T., and Baker, T.A. (2003) Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX-recognition signals. *Mol Cell* **11**: 671-683.

- Flynn, J.M., Levchenko, I., Seidel, M., Wickner, S.H., Sauer, R.T., and Baker, T.A. (2001) Overlapping recognition determinants within the *ssrA* degradation tag allow modulation of proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10584-10589.
- Foussard, M., Garnerone, A.M., Ni, F., Soupene, E., Boistard, P., and Batut, J. (1997) Negative autoregulation of the *Rhizobium meliloti fixK* gene is indirect and requires a newly identified regulator, FixT. *Mol Microbiol* **25**: 27-37.
- Francez-Charlot, A., Frunzke, J., Reichen, C., Ebnetter, J.Z., Gourion, B., and Vorholt, J.A. (2009) Sigma factor mimicry involved in regulation of general stress response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 3467-3472.
- Fraysse, N., Couderc, F., and Poinso, V. (2003) Surface polysaccharide involvement in establishing the *rhizobium*-legume symbiosis. *Eur J Biochem* **270**: 1365-1380.
- Freitag, N.E., Port, G.C., and Miner, M.D. (2009) *Listeria monocytogenes* - from saprophyte to intracellular pathogen. *Nat Rev Microbiol* **7**: 623-628.
- Fried, M., and Crothers, D.M. (1981) Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* **9**: 6505-6525.
- Galinier, A., Garnerone, A.M., Reyrat, J.M., Kahn, D., Batut, J., and Boistard, P. (1994) Phosphorylation of the *Rhizobium meliloti* FixJ protein induces its binding to a compound regulatory region at the *fixK* promoter. *J Biol Chem* **269**: 23784-23789.
- Galloway, J.N., Leach, A.M., Bleeker, A., and Erisman, J.W. (2013) A chronology of human understanding of the nitrogen cycle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **368**: 20130120.
- Galloway, J.N., Townsend, A.R., Erisman, J.W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J.R. et al. (2008) Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science* **320**: 889-892.
- Gao, R., and Stock, A.M. (2009) Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiol* **63**: 133-154.

- Garner, M.M., and Revzin, A. (1981) A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res* **9**: 3047-3060.
- Garnerone, A.M., Cabanes, D., Foussard, M., Boistard, P., and Batut, J. (1999) Inhibition of the FixL sensor kinase by the FixT protein in *Sinorhizobium meliloti*. *J Biol Chem* **274**: 32500-32506.
- Gebhardt, C., Turner, G.L., Gibson, A.H., Dreyfus, B.L., and Bergersen, F.J. (1984) Nitrogen-fixing growth in continuous culture of a strain of *Rhizobium* sp. isolated from stem nodules on *Sesbania rostrata*. *J Gen Microbiol* **130**: 843-848.
- Gechev, T.S., Van Breusegem, F., Stone, J.M., Denev, I., and Laloi, C. (2006) Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bioessays* **28**: 1091-1101.
- 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.
- Gonzalez, J.E., York, G.M., and Walker, G.C. (1996) *Rhizobium meliloti* exopolysaccharides: synthesis and symbiotic function. *Gene* **179**: 141-146.
- Gottesman, S., Roche, E., Zhou, Y., and Sauer, R.T. (1998) The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. *Genes Dev* **12**: 1338-1347.
- Gouet, P., Fabry, B., Guillet, V., Birck, C., Mourey, L., Kahn, D., and Samama, J.P. (1999) Structural transitions in the FixJ receiver domain. *Structure* **7**: 1517-1526.
- Gourion, B., Sulser, S., Frunzke, J., Francez-Charlot, A., Stiefel, P., Pessi, G. et al. (2009) The PhyR- σ^{EcG} signalling cascade is involved in stress response and symbiotic efficiency in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Microbiol* **73**: 291-305.

- Granados-Baeza, M.J., Gomez-Hernandez, N., Mora, Y., Delgado, M.J., Romero, D., and Girard, L. (2007) Novel reiterated Fnr-type proteins control the production of the symbiotic terminal oxidase *cbb₃* in *Rhizobium etli* CFN42. *Mol Plant Microbe Interact* **20**: 1241-1249.
- 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.
- Green, J., Crack, J.C., Thomson, A.J., and LeBrun, N.E. (2009) Bacterial sensors of oxygen. *Curr Opin Microbiol* **12**: 145-151.
- Gruber, T.M., and Gross, C.A. (2003) Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu Rev Microbiol* **57**: 441-466.
- Guest, J.R., Green, J., Irvine, A.S., Spiro, S. (1996) The FNR modulon and FNR-regulated gene expression. In *Regulation of gene expression in Escherichia coli*. Lin, E.C.C., and Lynch, A.S. (ed). Boston, MA: Springer, pp. 317–342.
- Guimaraes, P.R., Jr., Pires, M.M., Jordano, P., Bascompte, J., and Thompson, J.N. (2017) Indirect effects drive coevolution in mutualistic networks. *Nature* **550**: 511-514.
- Gupta, S.K., Gupta, R.C., Seth, A.K., Gupta, A.B., Bassin, J.K., and Gupta, A. (2002) Methaemoglobinemia in areas with high nitrate concentration in drinking water. *The National medical journal of India* **13**: 58-61.
- Gutierrez, D., Hernando, Y., Palacios, J.M., Imperial, J., and Ruiz-Argueso, T. (1997) FnrN controls symbiotic nitrogen fixation and hydrogenase activities in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* UPM791. *J Bacteriol* **179**: 5264-5270.
- Haagen-Smit, A.J., Bradley, C.E., and Fox, M.M. (1953) Ozone formation in photochemical oxidation of organic substances. *American Chemical Society* **45**: 2086-2089.
- Hall, M., Grundstrom, C., Begum, A., Lindberg, M.J., Sauer, U.H., Almqvist, F. et al. (2016) Structural basis for glutathione-mediated activation of the virulence regulatory protein PrfA in *Listeria*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**: 14733-14738.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.

- Hao, B., Isaza, C., Arndt, J., Soltis, M., and Chan, M.K. (2002) Structure-based mechanism of O₂ sensing and ligand discrimination by the FixL heme domain of *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochemistry* **41**: 12952-12958.
- Hardy, R.W., Burns, R.C., and Holsten, R.D. (1973) Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biol Biochem* **5**: 47-81.
- Hardy, R.W., Holsten, R.D., Jackson, E.K., and Burns, R.C. (1968) The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: Laboratory and field evaluation. *Plant Physiol* **43**: 1185-1207.
- Harman, J.G. (2001) Allosteric regulation of the cAMP receptor protein. *Biochim Biophys Acta* **1547**: 1-17.
- Harper, L.A., Flesch, T.K., Weaver, K.H., and Wilson, J.D. (2010) The effect of biofuel production on swine farm methane and ammonia emissions. *J Environ Qual* **39**: 1984-1992.
- Hauser, F., Pessi, G., Friberg, M., Weber, C., Rusca, N., Lindemann, A. et al. (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.
- He, Y., Shelver, D., Kerby, R.L., and Roberts, G.P. (1996) Characterization of a CO-responsive transcriptional activator from *Rhodospirillum rubrum*. *J Biol Chem* **271**: 120-123.
- Helmann, J.D. (2002) The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv Microb Physiol* **46**: 47-110.
- Herler, M., Bubert, A., Goetz, M., Vega, Y., Vazquez-Boland, J.A., and Goebel, W. (2001) Positive selection of mutations leading to loss or reduction of transcriptional activity of PrfA, the central regulator of *Listeria monocytogenes* virulence. *J Bacteriol* **183**: 5562-5570.
- 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.
- Hertig, C., Li, R.Y., Louarn, A.M., Garnerone, A.M., David, M., Batut, J. et al. (1989) *Rhizobium meliloti* regulatory gene *fixJ* activates transcription of *R. meliloti* *nifA* and *fixK* genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **171**: 1736-1738.

- Hichri, I., Boscari, A., Castella, C., Rovere, M., Puppo, A., and Brouquisse, R. (2015) Nitric oxide: a multifaceted regulator of the nitrogen-fixing symbiosis. *J Exp Bot* **66**: 2877-2887.
- Hirsch, A.M., and Smith, C.A. (1987) Effects of *Rhizobium meliloti* nif and fix mutants on alfalfa root nodule development. *J Bacteriol* **169**: 1137-1146.
- Howarth, R.W. (2004) Human acceleration of the nitrogen cycle: drivers, consequences, and steps toward solutions. *Water Sci Technol* **49**: 7-13.
- Hughes, K.T., and Mathee, K. (1998) The anti-sigma factors. *Annu Rev Microbiol* **52**: 231-286.
- Lijima, K., Henry, E., Moriya, A., Wirz, A., Kelman, A.W., and McColl, K.E. (2002) Dietary nitrate generates potentially mutagenic concentrations of nitric oxide at the gastroesophageal junction. *Gastroenterology* **122**: 1248-1257.
- Jamet, A., Mandon, K., Puppo, A., and Herouart, D. (2007) H₂O₂ is required for optimal establishment of the *Medicago sativa*/*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *J Bacteriol* **189**: 8741-8745.
- Jervis, A.J., and Green, J. (2007) *In vivo* demonstration of FNR dimers in response to lower O₂ availability. *J Bacteriol* **189**: 2930-2932.
- 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.
- Jiménez-Leiva, A., Cabrera, J.J., Bueno, E., Torres, M.J., Salazar, S., Bedmar, E.J. et al. (2019) Expanding the regulon of the *Bradyrhizobium diazoefficiens* NnrR transcription factor: new insights into the denitrification pathway. *Front Microbiol* **10**: 1926.
- Jones, K.M., and Walker, G.C. (2008) Responses of the model legume *Medicago truncatula* to the rhizobial exopolysaccharide succinoglycan. *Plant Signal Behav* **3**: 888-890.

Jones, K.M., Kobayashi, H., Davies, B.W., Taga, M.E., and Walker, G.C. (2007) How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium–Medicago* model. In. Massachusetts: Nature Reviews Microbiology, pp. 619–633.

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.

Kaminski, P.A., and Elmerich, C. (1991) Involvement of *fixLJ* in the regulation of nitrogen fixation in *Azorhizobium caulinodans*. *Mol Microbiol* **5**: 665-673.

Kaminski, P.A., and Elmerich, C. (1998) The control of *Azorhizobium caulinodans nifA* expression by oxygen, ammonia and by the HF-I-like protein, NrfA. *Mol Microbiol* **28**: 603-613.

Kaminski, P.A., Mandon, K., Arigoni, F., Desnoues, N., and Elmerich, C. (1991) Regulation of nitrogen fixation in *Azorhizobium caulinodans*: identification of a *fixK*-like gene, a positive regulator of *nifA*. *Mol Microbiol* **5**: 1983-1991.

Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto, S. et al. (2002) Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res* **9**: 189-197.

Karin, M. (1990) Too many transcription factors: positive and negative interactions. *New Biol* **2**: 126-131.

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

Kerby, R.L., Youn, H., Thorsteinsson, M.V., and Roberts, G.P. (2003) Repositioning about the dimer interface of the transcription regulator CooA: a major signal transduction pathway between the effector and DNA-binding domains. *J Mol Biol* **325**: 809-823.

Khoroshilova, N., Popescu, C., Munck, E., Beinert, H., and Kiley, P.J. (1997) Iron-sulfur cluster disassembly in the FNR protein of *Escherichia coli* by O₂: [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion with loss of biological activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 6087-6092.

- Kiley, P.J., and Beinert, H. (1998) Oxygen sensing by the global regulator, FNR: the role of the iron-sulfur cluster. *FEMS Microbiol Rev* **22**: 341-352.
- Kits, K.D., Sedlacek, C.J., Lebedeva, E.V., Han, P., Bulaev, A., Pjevac, P. et al. (2017) Kinetic analysis of a complete nitrifier reveals an oligotrophic lifestyle. *Nature* **549**: 269-272.
- Kitts, C.L., and Ludwig, R.A. (1994) *Azorhizobium caulinodans* respire with at least four terminal oxidases. *J Bacteriol* **176**: 886-895.
- Koch, H.G., Winterstein, C., Saribas, A.S., Alben, J.O., and Daldal, F. (2000) Roles of the *ccoGHIS* gene products in the biogenesis of the *ccb₃*-type cytochrome c oxidase. *J Mol Biol* **297**: 49-65.
- Komori, H., Inagaki, S., Yoshioka, S., Aono, S., and Higuchi, Y. (2007) Crystal structure of CO-sensing transcription activator CooA bound to exogenous ligand imidazole. *J Mol Biol* **367**: 864-871.
- 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., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M., and Peterson, K.M. (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-176.
- Kress, W., Maglica, Z., and Weber-Ban, E. (2009) Clp chaperone-proteases: structure and function. *Res Microbiol* **160**: 618-628.
- 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.
- Kumar, S., Kostin, S., Flacke, J.P., Reusch, H.P., and Ladilov, Y. (2009) Soluble adenyl cyclase controls mitochondria-dependent apoptosis in coronary endothelial cells. *J Biol Chem* **284**: 14760-14768.

Kuzma, M.M., Hunt, S., and Layzell, D.B. (1993) Role of oxygen in the limitation and inhibition of nitrogenase activity and respiration rate in individual soybean nodules. *Plant Physiol* **101**: 161-169.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

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.

LaRue, T.A., and Child, J.J. (1979) Sensitive fluorometric assay for leghemoglobin. *Anal Biochem* **92**: 11-15.

Latchman, D.S. (1997) Transcription factors: an overview. *Int J Biochem Cell Biol* **29**: 1305-1312.

Lee, T.I., and Young, R.A. (2000) Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet* **34**: 77-137.

Levy, C., Pike, K., Heyes, D.J., Joyce, M.G., Gabor, K., Smidt, H. et al. (2008) Molecular basis of halorespiration control by CprK, a CRP-FNR type transcriptional regulator. *Mol Microbiol* **70**: 151-167.

Li, H., Xu, F., Ren, X., and Chen, S. (2010) Functional analysis of the *fixL/fixJ* and *fixK* genes in *Azospirillum brasilense* Sp7. *Annals of Microbiology*: 469–480.

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.

Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M.P. et al. (2005) *Biología celular y molecular*. Editorial Médica Panamericana, S. A.

Lohar, D.P., Haridas, S., Gantt, J.S., and VandenBosch, K.A. (2007) A transient decrease in reactive oxygen species in roots leads to root hair deformation in the legume-rhizobia symbiosis. *New Phytol* **173**: 39-49.

- Lois, A.F., Ditta, G.S., and Helinski, D.R. (1993) The oxygen sensor FixL of *Rhizobium meliloti* is a membrane protein containing four possible transmembrane segments. *J Bacteriol* **175**: 1103-1109.
- Lonetto, M.A., Brown, K.L., Rudd, K.E., and Buttner, M.J. (1994) Analysis of the *Streptomyces coelicolor sigE* gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase sigma factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 7573-7577.
- Lopez, K.E., Rizo, A.N., Tse, E., Lin, J., Scull, N.W., Thwin, A.C. et al. (2020) Conformational plasticity of the ClpAP AAA+ protease couples protein unfolding and proteolysis. *Nat Struct Mol Biol* **27**: 406-416.
- Lopez, O., Morera, C., Miranda-Rios, J., Girard, L., Romero, D., and Soberon, M. (2001) Regulation of gene expression in response to oxygen in *Rhizobium etli*: role of FnrN in *fixNOQP* expression and in symbiotic nitrogen fixation. *J Bacteriol* **183**: 6999-7006.
- Loroch, A.I., Nguyen, B.G., and Ludwig, R.A. (1995) Interactive regulation of *Azorhizobium nifA* transcription via overlapping promoters. *J Bacteriol* **177**: 7210-7221.
- Martinez-Argudo, I., Little, R., Shearer, N., Johnson, P., and Dixon, R. (2005) Nitrogen fixation: key genetic regulatory mechanisms. *Biochem Soc Trans* **33**: 152-156.
- Martinez-Espinosa, R.M., Cole, J.A., Richardson, D.J., and Watmough, N.J. (2011) Enzymology and ecology of the nitrogen cycle. *Biochem Soc Trans* **39**: 175-178.
- Martinez, M., Palacios, J.M., Imperial, J., and Ruiz-Argueso, T. (2004) Symbiotic autoregulation of *nifA* expression in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *J Bacteriol* **186**: 6586-6594.
- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., and Batut, J. (2009) Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many *rhizobium* recipes? *Trends Microbiol* **17**: 458-466.
- Matamoros, M.A., Dalton, D.A., Ramos, J., Clemente, M.R., Rubio, M.C., and Becana, M. (2003) Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis. *Plant Physiol* **133**: 499-509.

Matsui, M., Tomita, M., and Kanai, A. (2013) Comprehensive computational analysis of bacterial CRP/FNR superfamily and its target motifs reveals stepwise evolution of transcriptional networks. *Genome Biol Evol* **5**: 267-282.

McKay, D.B., and Steitz, T.A. (1981) Structure of catabolite gene activator protein at 2.9 Å resolution suggests binding to left-handed B-DNA. *Nature* **290**: 744-749.

Meilhoc, E., Boscarì, A., Brouquisse, R., and Bruand, C. (2015) Chapter 64: Multifaceted roles of nitric oxide in legume–*Rhizobium* symbioses. In *Biological nitrogen fixation*. de Bruijn, F.J. (ed): John Wiley & Sons, Inc, pp. 637-648.

Mensinga, T.T., Speijers, G.J., and Meulenbelt, J. (2003) Health implications of exposure to environmental nitrogenous compounds. *Toxicol Rev* **22**: 41-51.

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., Alche Jd, J.D., Bedmar, E., and Delgado, M.J. (2004) Expression of *nir*, *nor* and *nos* denitrification genes from *Bradyrhizobium japonicum* in soybean root nodules. *Physiol Plant* **120**: 205-211.

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., 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., Velasco, L., Manzanera, M.E., Delgado, M.A.J., and Bedmar, E.J. (2002) Characterization of the *norCBQD* genes, encoding nitric oxide reductase, in the nitrogen fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Microbiology (Reading)* **148**: 3553-3560.

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.

Mettert, E.L., and Kiley, P.J. (2005) ClpXP-dependent proteolysis of FNR upon loss of its O₂-sensing [4Fe-4S] cluster. *J Mol Biol* **354**: 220-232.

Michiels, J., Van Soom, T., D'Hooghe, I., Dombrecht, B., Benhassine, T., de Wilde, P., and Vanderleyden, J. (1998) The *Rhizobium etli* *rpoN* locus: DNA sequence analysis and phenotypical characterization of *rpoN*, *ptsN*, and *ptsA* mutants. *J Bacteriol* **180**: 1729-1740.

Miller, J.H. (1972) *Experiments in molecular genetics*: Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.

Minchin, F.R., James, E.K., and Becana, M. (2008) Oxygen diffusion, production of reactive oxygen and nitrogen species, and antioxidants in legume nodules. In *Nitrogen-fixing leguminous symbioses*. Dilworth, M.J., James, E.K., Ji, S., and Newton, W. (ed): Springer Science, pp. 321-362.

Mitchell, P.J., and Tjian, R. (1989) Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* **245**: 371-378.

Moller, I.M., Jensen, P.E., and Hansson, A. (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu Rev Plant Biol* **58**: 459-481.

Montiel, J., Nava, N., Cardenas, L., Sanchez-Lopez, R., Arthikala, M.K., Santana, O. et al. (2012) A *Phaseolus vulgaris* NADPH oxidase gene is required for root infection by Rhizobia. *Plant Cell Physiol* **53**: 1751-1767.

Moore, L.J., and Kiley, P.J. (2001) Characterization of the dimerization domain in the FNR transcription factor. *J Biol Chem* **276**: 45744-45750.

Moore, L.J., Mettert, E.L., and Kiley, P.J. (2006) Regulation of FNR dimerization by subunit charge repulsion. *J Biol Chem* **281**: 33268-33275.

Moreno-Vivián, C., Luque-Almagro, V.M., Cabello, P., Roldán, M.D., and Castillo, F. (2011) Transport and assimilation of inorganic nitrogen in bacteria. In *Nitrogen cycling in bacteria*. JWB, M. (ed). Norfolk: Caister Academic Press, pp. 101-122.

Moreno-Vivián, C., and Flores, E. (2007) CHAPTER 17: Nitrate assimilation in bacteria. In *Biology of the nitrogen cycle*. Ferguson, S.J., and Newton, W. E. (ed). Amsterdam: Elsevier, pp. 263-282.

Morett, E., Fischer, H.M., and Hennecke, H. (1991) Influence of oxygen on DNA binding, positive control, and stability of the *Bradyrhizobium japonicum* NifA regulatory protein. *J Bacteriol* **173**: 3478-3487.

Moriya, A., Grant, J., Mowat, C., Williams, C., Carswell, A., Preston, T. et al. (2002) *In vitro* studies indicate that acid catalysed generation of N-nitrosocompounds from dietary nitrate will be maximal at the gastro-oesophageal junction and cardia. *Scand J Gastroenterol* **37**: 253-261.

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.

Newton, E., W. (2007) Physiology, biochemistry, and molecular biology of nitrogen fixation. In *Biology of the nitrogen cycle*.

Nikolov, D.B., and Burley, S.K. (1997) RNA polymerase II transcription initiation: a structural view. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 15-22.

Oldroyd, G.E., Murray, J.D., Poole, P.S., and Downie, J.A. (2011) The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu Rev Genet* **45**: 119-144.

Osorio, H. (2012) Caracterización de la proteína FNR de *A. ferrooxidans*, estructural y funcionalmente. In *Departamento de ciencias biológicas*. Santiago de Chile: University Andres Bello.

Overmyer, K., Brosche, M., and Kangasjarvi, J. (2003) Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends Plant Sci* **8**: 335-342.

- Pan, Q., Shan, Y., and Yan, A. (2012) A region at the C-terminus of the *Escherichia coli* global transcription factor FNR negatively mediates its degradation by the ClpXP protease. *Biochemistry* **51**: 5061-5071.
- Pandey, C.B., Kumar, U., Kaviraj, M., Minick, K.J., Mishra, A.K., and Singh, J.S. (2020) DNRA: A short-circuit in biological N-cycling to conserve nitrogen in terrestrial ecosystems. *Sci Total Environ* **738**: 139710.
- Parejo, S., Cabrera, J.J., Jimenez-Leiva, A., Tomas-Gallardo, L., Bedmar, E.J., Gates, A.J., and Mesa, S. (2022) Fine-tuning modulation of oxidation-mediated posttranslational control of *Bradyrhizobium diazoefficiens* FixK₂ transcription factor. *Int J Mol Sci* **23**: 5117.
- Parkinson, G., Wilson, C., Gunasekera, A., Ebright, Y.W., Ebright, R.H., and Berman, H.M. (1996) Structure of the CAP-DNA complex at 2.5 angstroms resolution: a complete picture of the protein-DNA interface. *J Mol Biol* **260**: 395-408.
- Passner, J.M., and Steitz, T.A. (1997) The structure of a CAP-DNA complex having two cAMP molecules bound to each monomer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 2843-2847.
- Passner, J.M., Schultz, S.C., and Steitz, T.A. (2000) Modeling the cAMP-induced allosteric transition using the crystal structure of CAP-cAMP at 2.1 Å resolution. *J Mol Biol* **304**: 847-859.
- Patschkowski, T., Schlüter, A., and Priefer, U.B. (1996) *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* contains a second *fnr/fixK*-like gene and an unusual *fixL* homologue. *Mol Microbiol* **21**: 267-280.
- Pauly, N., Pucciariello, C., Mandon, K., Innocenti, G., Jamet, A., Baudouin, E. et al. (2006) Reactive oxygen and nitrogen species and glutathione: key players in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *J Exp Bot* **57**: 1769-1776.
- Peck, M.C., Fisher, R.F., and Long, S.R. (2006) Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to nod gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **188**: 5417-5427.

- Peleg-Grossman, S., Melamed-Book, N., and Levine, A. (2012) ROS production during symbiotic infection suppresses pathogenesis-related gene expression. *Plant Signal Behav* **7**: 409-415.
- Peleg-Grossman, S., Golani, Y., Kaye, Y., Melamed-Book, N., and Levine, A. (2009) NPR1 protein regulates pathogenic and symbiotic interactions between *Rhizobium* and legumes and non-legumes. *PLoS One* **4**: e8399.
- Pellock, B.J., Cheng, H.P., and Walker, G.C. (2000) Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. *J Bacteriol* **182**: 4310-4318.
- 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.
- Pitzschke, A., Forzani, C., and Hirt, H. (2006) Reactive oxygen species signaling in plants. *Antioxid Redox Signal* **8**: 1757-1764.
- Poole, P., Ramachandran, V., and Terpolilli, J. (2018) Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts. *Nat Rev Microbiol* **16**: 291-303.
- Popescu, C.V., Bates, D.M., Beinert, H., Munck, E., and Kiley, P.J. (1998) Mossbauer spectroscopy as a tool for the study of activation/inactivation of the transcription regulator FNR in whole cells of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13431-13435.
- Popovych, N., Tzeng, S.R., Tonelli, M., Ebright, R.H., and Kalodimos, C.G. (2009) Structural basis for cAMP-mediated allosteric control of the catabolite activator protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 6927-6932.
- Postgate, J.R. (1982) Biological nitrogen fixation: fundamentals. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* **296**: 375-385.
- Preisig, O., Zufferey, R., and Hennecke, H. (1996) The *Bradyrhizobium japonicum* *fixGHIS* genes are required for the formation of the high-affinity *cbb₃*-type cytochrome oxidase. *Arch Microbiol* **165**: 297-305.

- Ptashne, M., and Gann, A. (1997) Transcriptional activation by recruitment. *Nature* **386**: 569-577.
- Puppo, A., Herrada, G., and Rigaud, J. (1991) Lipid peroxidation in peribacteroid membranes from French-bean nodules. *Plant Physiol* **96**: 826-830.
- Puppo, A., Pauly, N., Bosdari, A., Mandon, K., and Brouquisse, R. (2013) Hydrogen peroxide and nitric oxide: key regulators of the legume-*Rhizobium* and mycorrhizal symbioses. *Antioxid Redox Signal* **18**: 2202-2219.
- Ravishankara, A.R., Daniel, J.S., and Portmann, R.W. (2009) Nitrous oxide (N₂O): the dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century. *Science* **326**: 123-125.
- Regensburger, B., and Hennecke, H. (1983) RNA polymerase from *Rhizobium japonicum*. *Arch Microbiol* **135**: 103-109.
- Reinhart, F., Achebach, S., Koch, T., and Uden, G. (2008) Reduced apo-fumarate nitrate reductase regulator (apoFNR) as the major form of FNR in aerobically growing *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **190**: 879-886.
- Reniere, M.L., Whiteley, A.T., Hamilton, K.L., John, S.M., Lauer, P., Brennan, R.G., and Portnoy, D.A. (2015) Glutathione activates virulence gene expression of an intracellular pathogen. *Nature* **517**: 170-173.
- Renseigné, N., Shahid, U., and Iqbal, M. (2007) Nitrate accumulation in plants, factors affecting the process, and human health implications. A review. *Agronomy for sustainable development* **27**: 45-57.
- Reutimann, L. (2010) Impact of oxidative stress on transcription regulator FixK₂ and two ECF σ factors in *Bradyrhizobium japonicum*. In: ETH Zürich.
- Reutimann, L., Mesa, S., and Hennecke, H. (2010) Autoregulation of *fixK₂* gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Genet Genomics* **284**: 25-32.
- Reyes-González, A., Talbi, C., Rodríguez, S., Rivera, P., Zamorano-Sánchez, D., and Girard, L. (2016) Expanding the regulatory network that controls nitrogen fixation in

Sinorhizobium meliloti: elucidating the role of the two-component system hFixL-FxkR. *Microbiology Society* **162**.

Reyrat, J.M., David, M., Blonski, C., Boistard, P., and Batut, J. (1993) Oxygen-regulated *in vitro* transcription of *Rhizobium meliloti* *nifA* and *fixK* genes. *J Bacteriol* **175**: 6867-6872.

Richardson, D.J., and Watmough, N.J. (1999) Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. *Curr Opin Chem Biol* **3**: 207-219.

Rivero, R.M., Kojima, M., Gepstein, A., Sakakibara, H., Mittler, R., Gepstein, S., and Blumwald, E. (2007) Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 19631-19636.

Rodgers, K.R., and Lukat-Rodgers, G.S. (2005) Insights into heme-based O₂ sensing from structure-function relationships in the FixL proteins. *J Inorg Biochem* **99**: 963-977.

Rodiño, A.P., de la Fuente, M., González, A.M., de Ron, A.M., and Santalla, M. (2011) Diversidad de las leguminosas en Europa y España. In *Fundamentos y aplicaciones agroambientales de las interacciones beneficiosas plantas-microorganismos*. Mejías, M.G., Rivilla, R.P., Soto, M.J., Delgado, M.J., González, E., P.F., M. et al. (ed): Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN), pp. 19-34.

Rodríguez, R.L., and Tait, R. C. (1983) *Recombinant DNA techniques: An introduction*. Massachusetts: Addison-Wesley.

Roeder, R.G. (1996) The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* **21**: 327-335.

Rubio, L.M., and Ludden, P.W. (2008) Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Annu Rev Microbiol* **62**: 93-111.

Ruiz-Carmona, S., Schmidtke, P., Luque, F.J., Baker, L., Matassova, N., Davis, B. et al. (2017) Dynamic undocking and the quasi-bound state as tools for drug discovery. *Nat Chem* **9**: 201-206.

Rutten, P.J., and Poole, P.S. (2019) Oxygen regulatory mechanisms of nitrogen fixation in rhizobia. *Adv Microb Physiol* **75**: 325-389.

Rutten, P.J., Steel, H., Hood, G.A., Ramachandran, V.K., McMurtry, L., Geddes, B. et al. (2021) Multiple sensors provide spatiotemporal oxygen regulation of gene expression in a *Rhizobium*-legume symbiosis. *PLoS Genet* **17**: e1009099.

Salas, A., Cabrera, J.J., Jimenez-Leiva, A., Mesa, S., Bedmar, E.J., Richardson, D.J. et al. (2021) Bacterial nitric oxide metabolism: Recent insights in rhizobia. *Adv Microb Physiol* **78**: 259-315.

Sambrook, J., and Russell, D. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

Santos, M.S., Nogueira, M.A., and Hungria, M. (2019) Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. *AMB Express* **9**: 205.

Santos, R., Herouart, D., Sigaud, S., Touati, D., and Puppo, A. (2001) Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 86-89.

Sawers, R.G. (1991) Identification and molecular characterization of a transcriptional regulator from *Pseudomonas aeruginosa* PAO₁ exhibiting structural and functional similarity to the FNR protein of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**: 1469-1481.

Schafer, A., Tauch, A., Jager, 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.

Scheidle, H., Gross, A., and Niehaus, K. (2005) The lipid A substructure of the *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharides is sufficient to suppress the oxidative burst in host plants. *New Phytol* **165**: 559-565.

Schetgens, R.M.P., Hontelez, J.G.J., van den Bos, R.C., and Kammen, A.V. (1985) Identification and phenotypical characterization of a cluster of *fix* genes, including a *nif* regulatory gene, from *Rhizobium leguminosarum* PRE. *Molecular and General Genetics (Molec Gen Genet)* **200**: 368–374.

Schlüter, A., Patschkowski, T., Quandt, J., Selinger, L.B., Weidner, S., Kramer, M. et al. (1997) Functional and regulatory analysis of the two copies of the *fixNOQP* operon of *Rhizobium leguminosarum* strain VF₃₉. *Mol Plant Microbe Interact* **10**: 605-616.

Schlüter, A., Patschkowski, T., Uden, G., and Priefer, U.B. (1992) The *Rhizobium leguminosarum* FnrN protein is functionally similar to *Escherichia coli* Fnr and promotes heterologous oxygen-dependent activation of transcription. *Mol Microbiol* **6**: 3395-3404.

Schmidt, R., Zahn, R., Bukau, B., and Mogk, A. (2009) ClpS is the recognition component for *Escherichia coli* substrates of the N-end rule degradation pathway. *Mol Microbiol* **72**: 506-517.

Schultz, S.C., Shields, G.C., and Steitz, T.A. (1991) Crystal structure of a CAP-DNA complex: the DNA is bent by 90 degrees. *Science* **253**: 1001-1007.

Schumacher, J., Da Re, S., Fourment, J., Roche, P., Rousseau, P., Ton-Hoang, B., and Kahn, D. (2000) Structural basis for signal transduction within the FixJ transcriptional activator. In *Nitrogen fixation: From molecules to crop productivity*. Pedrosa, F.O., Hungria, M., Yates, G., Newton, W.E. (ed). Dordrecht: Springer.

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.

Scortti, M., Monzo, H.J., Lacharme-Lora, L., Lewis, D.A., and Vazquez-Boland, J.A. (2007) The PrfA virulence regulon. *Microbes Infect* **9**: 1196-1207.

Scott, J.D., and Ludwig, R.A. (2004) *Azorhizobium caulinodans* electron-transferring flavoprotein N electrochemically couples pyruvate dehydrogenase complex activity to N₂ fixation. *Microbiology (Reading)* **150**: 117-126.

Selman, M., Greenhalgh, S., Diaz, R., and Sugg, Z. (2008) A global assessment of the state of knowledge. In *Eutrophication and hypoxia in coastal areas*. Institute, W.R. (ed). Washington DC: World Resources Institute, pp. 1–6.

Sharma, H., Yu, S., Kong, J., Wang, J., and Steitz, T.A. (2009) Structure of apo-CAP reveals that large conformational changes are necessary for DNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 16604-16609.

Sharon R. Long, M.K., Lance Seefeldt, Yi-FangTsay, and Stanislav Kopriva (2015) Carpter 16: Nitrogen and sulfur. In *Biochemistry and molecular biology of plants*. Buchanan, B.B., Gruissem, W. and Jones, R.L. (ed): John Wiley & Sons, pp. 711-767.

Shelver, D., Thorsteinsson, M.V., Kerby, R.L., Chung, S.Y., Roberts, G.P., Reynolds, M.F. et al. (1999) Identification of two important heme site residues (cysteine 75 and histidine 77) in CooA, the CO-sensing transcription factor of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochemistry* **38**: 2669-2678.

Shen, C.H. (2019) Chapter 3: Gene expression: Transcription of the genetic code. In *Diagnostic molecular biology*: Elsevier Inc., pp. 59-86.

Sieberer, B.J., Timmers, A.C., and Emons, A.M. (2005) Nod factors alter the microtubule cytoskeleton in *Medicago truncatula* root hairs to allow root hair reorientation. *Mol Plant Microbe Interact* **18**: 1195-1204.

Simon, R., Priefer, U., and Pühler, A. (1983) Vector plasmids for in-vivo and in-vitro manipulations of gram-negative bacteria. In *Molecular genetics of the bacteria-plant interaction*. Pühler, A. (ed): Springer Berlin Heidelberg, pp. 98-106.

Soberon-Chavez, G., Alcaraz, L.D., Morales, E., Ponce-Soto, G.Y., and Servin-Gonzalez, L. (2017) The transcriptional regulators of the CRP family regulate different essential bacterial functions and can be inherited vertically and horizontally. *Front Microbiol* **8**: 959.

Sousa, E.H., Tuckerman, J.R., Gonzalez, G., and Gilles-Gonzalez, M.A. (2007) DosT and DevS are oxygen-switched kinases in *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Sci* **16**: 1708-1719.

Spiro, S. (1994) The FNR family of transcriptional regulators. *Antonie Van Leeuwenhoek* **66**: 23-36.

Spiro, S., and Guest, J.R. (1987a) Activation of the lac operon of *Escherichia coli* by a mutant FNR protein. *Mol Microbiol* **1**: 53-58.

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.

Spiro, S., and Guest, J.R. (1987b) Regulation and over-expression of the *fnr* gene of *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* **133**: 3279–3288.

Sprent, J.I. (2009) An interdisciplinary look at legumes and their bacterial symbionts: some thoughts from Big Sky. *New Phytol* **184**: 15-17.

Sprent, J.I., Ardley, J., and James, E.K. (2017) Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. *New Phytol* **215**: 40-56.

Stein, L.Y., and Klotz, M.G. (2016) The nitrogen cycle. *Curr Biol* **26**: R94-98.

Stock, J.B., Surette, M.G., Levit, M., and Park, P. (1995) Two-component signal transduction systems: structure-function relationships and mechanisms of catalysis. In *Two-component signal transduction*. Hoch, J.A., and Silhavy, T.J. (eds). Washington, D.C: American Society for Microbiology (ASM Press), pp. 25–51.

Strous, M., Kuenen, J.G., and Jetten, M.S. (1999) Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3248-3250.

Studholme, D.J., and Dixon, R. (2003) Domain architectures of σ^{54} -dependent transcriptional activators. *J Bacteriol* **185**: 1757-1767.

Sugawara, M., Shah, G.R., Sadowsky, M.J., Paliy, O., Speck, J., Vail, A.W., and Gyaneshwar, P. (2011) Expression and functional roles of *Bradyrhizobium japonicum* genes involved in the utilization of inorganic and organic sulfur compounds in free-living and symbiotic conditions. *Mol Plant Microbe Interact* **24**: 451-457.

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.

- Terpolilli, J.J., Hood, G.A., and Poole, P.S. (2012) What determines the efficiency of N₂-fixing *Rhizobium*-legume symbioses? *Adv Microb Physiol* **60**: 325-389.
- Thompson, R.L., Lassaletta, L., Patra, P.K., Wilson, C., Wells, K.C., Gressent, A. et al. (2019) Acceleration of global N₂O emissions seen from two decades of atmospheric inversion. *Nature Climate Change* **9**: 993-998.
- Tian, Z., Zou, H., Li, J., Zhang, Y., Liu, Y., Yu, G. et al. (2006) Transcriptome analysis of *Sinorhizobium meliloti* nodule bacteria in *nifA* mutant background. *Chinese Science Bulletin* **51**: 2079–2086.
- Tischer, R., and Kaiser, W. (2007) Nitrate assimilation in plants. In *Biology of the nitrogen cycle*. Bothe, H., Ferguson, S., and Newton, W. (ed). Netherlands: Elsevier, pp. 283-302.
- 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., 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.
- 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.
- Tortosa, G., Parejo, S., Cabrera, J.J., Bedmar, E.J., and Mesa, S. (2021) Oxidative stress produced by paraquat reduces nitrogen fixation in soybean-*Bradyrhizobium diazoefficiens* symbiosis by decreasing nodule functionality. *Nitrogen* **2**: 30-40.
- Tortosa, G., Pacheco, P.J., Hidalgo-García, A., Granados, A., Delgado, A., Mesa, S. et al. (2020) Copper modulates nitrous oxide emissions from soybean root nodules. *Environ Exp Bot* **180**.
- Toth, K., and Stacey, G. (2015) Does plant immunity play a critical role during initiation of the legume-*rhizobium* symbiosis? *Front Plant Sci* **6**: 401.

Trageser, M., and Unden, G. (1989) Role of cysteine residues and of metal ions in the regulatory functioning of FNR, the transcriptional regulator of anaerobic respiration in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **3**: 593-599.

Tripathi, S., and Poulos, T.L. (2018) Testing the N-terminal velcro model of CooA carbon monoxide activation. *Biochemistry* **57**: 3059-3064.

Tutar, Y. (2008) Syn, anti, and finally both conformations of cyclic AMP are involved in the CRP-dependent transcription initiation mechanism in *E. coli* lac operon. *Cell Biochem Funct* **26**: 399-405.

Tzeng, S.R., and Kalodimos, C.G. (2009) Dynamic activation of an allosteric regulatory protein. *Nature* **462**: 368-372.

Van Grinsven, H.J., Rabl, A., and de Kok, T.M. (2010) Estimation of incidence and social cost of colon cancer due to nitrate in drinking water in the EU: a tentative cost-benefit assessment. *Environ Health* **9**: 58.

van 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. (ed). Amsterdam: Elsevier, pp. 3-20.

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., Darnault, C., Renoux, O., Nicolet, Y., and Fontecilla-Camps, J.C. (2015) The crystal structure of the global anaerobic transcriptional regulator FNR explains its extremely fine-tuned monomer-dimer equilibrium. *Sci Adv* **1**: e1501086.

- West, A.H., and Stock, A.M. (2001) Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci* **26**: 369-376.
- Yamada, S., Sugimoto, H., Kobayashi, M., Ohno, A., Nakamura, H., and Shiro, Y. (2009) Structure of PAS-linked histidine kinase and the response regulator complex. *Structure* **17**: 1333-1344.
- 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.
- Zamorano-Sánchez D., G.L. (2015) FNR-like proteins in Rhizobia: Past and future. In *Biological nitrogen fixation*. de Bruijn, F.J. (ed): John Wiley & Sons, pp. 155-166.
- Zubay, G., Schwartz, D., and Beckwith, J. (1970) Mechanism of activation of catabolite-sensitive genes: a positive control system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **66**: 104-110.
- Zufferey, R., Preisig, O., Hennecke, H., and Thony-Meyer, L. (1996) Assembly and function of the cytochrome *cbb₃* oxidase subunits in *Bradyrhizobium japonicum*. *J Biol Chem* **271**: 9114-9119.
- Zumft, W.G. (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 533-616.

9

ANEXOS

9. ANEXOS

9.1. Material suplementario

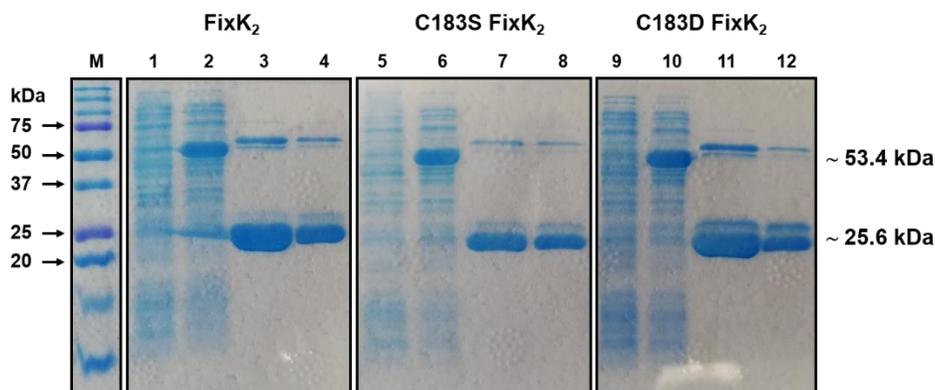


Figure 9.1.1. SDS-PAGE analysis of FixK₂, C183S FixK₂, and C183D FixK₂ recombinant purified proteins. Samples of representative steps during protein overexpression and purification were monitored in Coomassie blue-stained 14% SDS-PAGE gels. Each panel corresponds to different sections of the same gel (C183S FixK₂, and C183D FixK₂) or a different gel (FixK₂). Extracts of uninduced (lanes 1, 5, and 9; 10 μ L) and induced (lanes 2, 6, and 10; 10 μ L) *E. coli* overexpressing cells. Purified proteins after cleavage with DTT (lanes 3, 7, and 11; ~6.25-9.2 μ g), and after buffer exchange in elution buffer (40 mM Tris-HCl, pH 7.0, 150 mM KCl, 0.1 mM EDTA) (lanes 4, 8, and 12; ~3-3.5 μ g). The predicted molecular masses of the purified FixK₂ protein derivatives (~25,6 kDa) as well as of the C-terminally bound *Mxe* GyrA-Intein-CBD recombinant protein variants (~53.4 kDa) are shown on the right margin. The molecular marker Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad, California, CA, USA) (M) is shown on the left margin.

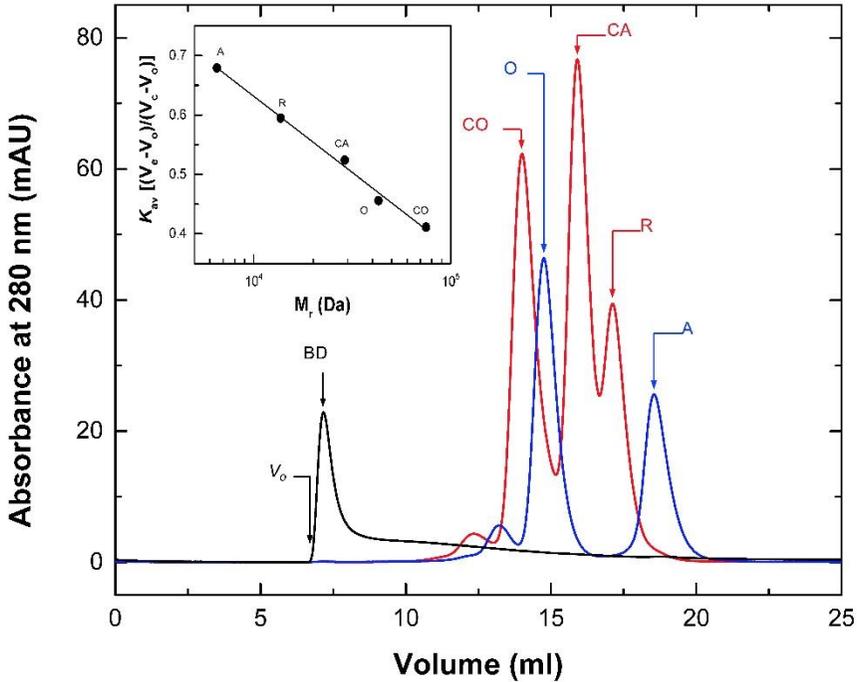


Figure 9.1.2. Calibration curve for SEC. The following non-interacting standards were applied: In red, conalbumin (CO, 75 kDa), carbonic anhydrase (CA, 29 kDa), ribonuclease A (R, 13.7 kDa); In blue, ovalbumin (O, 43 kDa), aprotinin (A, 6.5 kDa). In black, the void volume (V_o) of was determined as 7 mL using blue dextran 2000 (BD, 2,000 kDa). Chromatograms were obtained at 0.75 mL/min using a Superdex 200 10/300 GL column with a volume (V_c) of 24 mL. The calibration curve plot of K_{av} vs. M_r (Log10 scale) obtained using elution volume (V_e) of each standard is inset.

Table 9.1.1.1. Comparative transcriptomic profile in the C183D-*fixK₂* strain.

Data sheet A. Differentially expressed genes in the C183D-*fixK₂* strain in comparison with the wild type (WT), both cultivated under microoxic conditions (0.5% O₂).

Query ^a	FC (C183D- <i>fixK₂</i> vs. WT) ^b	Locus_tag ^c	Gene_name ^d	Product ^e
bsr0093	5.0	Bdiaspc4_00080	-	hypothetical protein
blI0271	-2.9	Bdiaspc4_01005	-	MBL fold metallo-hydrolase
blI0330	-2.4	Bdiaspc4_01315	-	DNA-binding response regulator
blI0658	2.1	Bdiaspc4_03035	-	histidine phosphatase family protein
blI0818	-2.1	Bdiaspc4_03880	-	hypothetical protein
blI1008	-3.5	Bdiaspc4_04890	-	hypothetical protein
blr1277	4.5	Bdiaspc4_06330	<i>madL</i>	malonate transporter subunit MadL
blr1289	-3.2	Bdiaspc4_06390	-	oleate hydratase
bsr1505	2.1	Bdiaspc4_07580	-	hypothetical protein
bsI1637	-2.0	Bdiaspc4_08260	-	hypothetical protein
bsr2164	-4.8	Bdiaspc4_11055	-	hypothetical protein
blr2170	2.9	Bdiaspc4_11100	-	TRAP transporter substrate-binding protein
blr2505	-2.3	Bdiaspc4_12860	-	nuclear transport factor 2 family protein
blI2517	-3.2	Bdiaspc4_12930	-	acetate/propionate family kinase
blI2518	-2.6	Bdiaspc4_12935	-	phosphotolase family protein
blI2590	-2.4	Bdiaspc4_13350	-	universal stress protein
blI2600	2.5	Bdiaspc4_13405	-	DUF4142 domain-containing protein

blI2757	5.0	Bdiaspc4_14260	<i>fixK₂</i>	CRP/FNR family transcriptional regulator
blr2762	-3.6	Bdiaspc4_14285	ORF141	CBS domain-containing protein
blI2849	-3.6	Bdiaspc4_14730	-	exonuclease VII large subunit
blI3115	-9.6	Bdiaspc4_16100	-	MBL fold metallo-hydrolase
blI3117	-2.4	Bdiaspc4_16110	-	thymidine phosphorylase family protein
blr3168	-21.1	Bdiaspc4_16395	-	2-hydroxy-3-oxopropionate reductase
blI3191	-3.1	Bdiaspc4_16510	-	ABC transporter permease
blI3301	2.8	Bdiaspc4_17070	-	LacI family transcriptional regulator
blr3303	2.8	Bdiaspc4_17080	-	CoA transferase
blr3305	-2.4	Bdiaspc4_17090	-	acyl dehydratase
blr3353	-2.4	Bdiaspc4_17330	-	ABC transporter substrate-binding protein
blr3358	-6.6	Bdiaspc4_17355	-	Rieske (2Fe-2S) protein
blI3377	-2.0	Bdiaspc4_17450	-	xanthine dehydrogenase family protein subunit M
blr3458	-2.1	Bdiaspc4_17865	<i>ackA2</i>	acetate kinase
blI3471	-2.0	Bdiaspc4_17935	-	transporter
blI3662	-4.3	Bdiaspc4_18895	-	branched-chain amino acid ABC transporter permease
bsI3687	7.0	Bdiaspc4_19025	-	hypothetical protein
bsI3693	-2.6	Bdiaspc4_19060	-	hypothetical protein
blr3724	2.1	Bdiaspc4_19215	<i>phbA</i>	acetyl-CoA C-acetyltransferase
blr3815	-2.2	Bdiaspc4_19720	-	HAD family hydrolase
blI3976	2.2	Bdiaspc4_20575	-	RidA family protein

blr4112	-2.4	Bdiaspc4_21285	-	CusA/CzcA family heavy metal efflux RND transporter
blr4240	-3.1	Bdiaspc4_22005	-	pyridoxamine 5'-phosphate oxidase family protein
blr4241	-2.9	Bdiaspc4_22010	-	cytochrome <i>c</i>
blr4299	4.3	Bdiaspc4_22325	-	SDR family oxidoreductase
blr4412	-3.2	Bdiaspc4_22980	-	translational machinery protein
blr4542	-8.1	Bdiaspc4_23750	-	ABC transporter ATP-binding protein
blr4634	-2.8	Bdiaspc4_24260	-	efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit
blr4635	-2.5	Bdiaspc4_24265	<i>groL5, groEL5</i>	chaperonin GroEL
blr4637	-2.6	Bdiaspc4_24275	<i>hspC2</i>	Hsp20/alpha crystallin family protein
blr4638	-3.9	Bdiaspc4_24280	-	CBS domain-containing protein
blr4644	-3.2	Bdiaspc4_24320	-	universal stress protein
blr4645	-2.8	Bdiaspc4_24325	-	host attachment protein
blr4652	-3.1	Bdiaspc4_24370	-	nitroreductase
blr4653	-2.8	Bdiaspc4_24375	<i>dnaJ</i>	J domain-containing protein
blr4654	-2.8	Bdiaspc4_24380	-	hypothetical protein
blr4655	-2.5	Bdiaspc4_24385	<i>ppsA</i>	phosphoenolpyruvate synthase
blr4658	-2.1	Bdiaspc4_24400	<i>glk</i>	glucokinase
blr5145	-2.7	Bdiaspc4_27040	-	mannose-6-phosphate isomerase
blr5213	6.5	Bdiaspc4_27445	-	ATP-dependent DNA ligase
blr5237	-5.2	Bdiaspc4_27570	-	hypothetical protein

blf5279	-3.5	Bdiaspc4_27810	-	DUF2380 domain-containing protein
bsf5463	-2.5	Bdiaspc4_28800	-	hypothetical protein
blr5546	4.0	Bdiaspc4_29280	-	hypothetical protein
blf5771	-2.3	Bdiaspc4_30480	-	efflux RND transporter permease subunit
blr5774	-2.3	Bdiaspc4_30495	-	NAD(P)/FAD-dependent oxidoreductase
blf5777	-2.2	Bdiaspc4_30510	-	DUF302 domain-containing protein
blr5821	7.1	Bdiaspc4_30735	-	hypothetical protein
blf5959	5.3	Bdiaspc4_31445	-	hypothetical protein
bsf6066	-4.0	Bdiaspc4_31980	-	hypothetical protein
blr6067	-2.7	Bdiaspc4_31985	-	phage holin family protein
blf6073	-3.5	Bdiaspc4_32015	<i>phaC2</i>	probable poly-beta-hydroxybutyrate polymerase
blr6074	-2.7	Bdiaspc4_32020	-	CBS domain-containing protein
blr6116	-5.8	Bdiaspc4_32250	-	hypothetical protein
blf6142	-2.2	Bdiaspc4_32395	<i>ade2</i>	adenine deaminase
blf6256	-2.1	Bdiaspc4_32995	-	aldo/keto reductase
blr6312	-4.0	Bdiaspc4_33280	<i>galE</i>	UDP-glucose 4-epimerase GalE
blr6334	4.4	Bdiaspc4_33405	<i>lpcA</i>	dihydrolipoyl dehydrogenase
blf6354	-7.3	Bdiaspc4_33510	-	carbohydrate ABC transporter permease
blf6525	-2.1	Bdiaspc4_34395	-	hypothetical protein
bsf6639	2.4	Bdiaspc4_35005	-	hypothetical protein
blf7021	2.9	Bdiaspc4_37030	-	efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit

blf7086	-2.3	Bdiaspc4_37390	<i>hemN₂</i>	oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase
bsr7087	-3.2	Bdiaspc4_37395	-	hypothetical protein
blr7088	-2.2	Bdiaspc4_37400	-	copper chaperone PCu(A)C
blr7345	-2.9	Bdiaspc4_38745	-	hypothetical protein
blr7346	-2.1	Bdiaspc4_38750	-	OmpA family protein
blr7486	2.3	Bdiaspc4_39500	-	aminoacyl-tRNA hydrolase
blf7512	4.8	Bdiaspc4_39640	-	hypothetical protein
blf7551	-2.0	Bdiaspc4_39840	-	hypothetical protein
bsr7564	-4.2	Bdiaspc4_39910	-	hypothetical protein
blr7618	-2.2	Bdiaspc4_40200	-	DUF4173 domain-containing protein
blr7698	-5.4	Bdiaspc4_40700	-	hypothetical protein
blr7712	8.1	Bdiaspc4_40795	-	hypothetical protein
blr7713	4.3	Bdiaspc4_40805	-	DUF3147 family protein
blr7874	-2.6	Bdiaspc4_41655	-	ABC transporter permease
blr7958	3.1	Bdiaspc4_42090	-	HlyD family secretion protein
blf7986	-2.1	Bdiaspc4_42230	-	HlyD family efflux transporter periplasmic adaptor subunit
blf7987	-2.5	Bdiaspc4_42235	-	ABC transporter permease
blf7988	-3.3	Bdiaspc4_42240	-	ABC transporter ATP-binding protein
blf7989	-2.6	Bdiaspc4_42245	<i>mat</i>	methionine adenosyltransferase
blf7990	-3.2	Bdiaspc4_42250	-	hypothetical protein
blf7991	-2.8	Bdiaspc4_42255	-	isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase family protein

bsl7992	-2.7	Bdiaspc4_42260	-	DUF2933 domain-containing protein
blI7993	-2.8	Bdiaspc4_42265	-	hypothetical protein
blI8046	-2.8	Bdiaspc4_42590	-	HAD family hydrolase
trnK-UUU	2.1	Bdiaspc4_24130	-	tRNA-Lys

^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 C183D-*fixK*₂ strain in comparison to the WT, both cultured under microoxic conditions (0.5% O₂).

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

^d Gene name according to the NCBI annotation (GenBank acc. # CP032617); Fernández et al., 2019. Modifications are shaded in light grey.

^e Protein/gene product according to the NCBI annotation (GenBank acc. # CP032617); Fernández et al., 2019. Modifications are shaded in light grey.

Data sheet B. List of 54 genes that showed a differential expression in the C183D-*fixK₂* strain but not in the D*fixK₂* strain in comparison with the WT, all cultivated microoxically.

Query ^a	FC (C183D- <i>fixK₂</i> vs. WT) ^b	Locus_tag ^c	Gene name ^d	Product ^e
blI0271	-2.9	Bdiaspc4_01005	-	MBL fold metallo-hydrolase
blI0658	2.1	Bdiaspc4_03035	-	histidine phosphatase family protein
blI1008	-3.5	Bdiaspc4_04890	-	hypothetical protein
blr1277	4.5	Bdiaspc4_06330	<i>madL</i>	malonate transporter subunit MadL
bsr1505	2.1	Bdiaspc4_07580	-	hypothetical protein
bsl1637	-2.0	Bdiaspc4_08260	-	hypothetical protein
bsr2164	-4.8	Bdiaspc4_11055	-	hypothetical protein
blr2170	2.9	Bdiaspc4_11100	-	TRAP transporter substrate-binding protein
blr2505	-2.3	Bdiaspc4_12860	-	nuclear transport factor 2 family protein
blI2849	-3.6	Bdiaspc4_14730	-	exonuclease VII large subunit
blr3168	-2.1	Bdiaspc4_16395	-	2-hydroxy-3-oxopropionate reductase
blI3191	-3.1	Bdiaspc4_16510	-	ABC transporter permease
blI3301	2.8	Bdiaspc4_17070	-	LacI family transcriptional regulator
blr3303	2.8	Bdiaspc4_17080	-	CoA transferase
blr3305	-2.4	Bdiaspc4_17090	-	acyl dehydratase
blr3358	-6.6	Bdiaspc4_17355	-	Rieske (2Fe-2S) protein
blI3377	-2.0	Bdiaspc4_17450	-	xanthine dehydrogenase family protein subunit M
blI3471	-2.0	Bdiaspc4_17935	-	transporter
blI3662	-4.3	Bdiaspc4_18895	-	branched-chain aa ABC transporter permease

bsi3687	7.0	Bdiaspc4_19025	-	hypothetical protein
bsi3693	-2.6	Bdiaspc4_19060	-	hypothetical protein
blr3724	2.1	Bdiaspc4_19215	<i>phbA</i>	acetyl-CoA C-acetyltransferase
blr3976	2.2	Bdiaspc4_20575	-	RidA family protein
blr4299	4.3	Bdiaspc4_22325	-	SDR family oxidoreductase
blr4542	-8.1	Bdiaspc4_23750	-	ABC transporter ATP-binding protein
blr5145	-2.7	Bdiaspc4_27040	-	mannose-6-phosphate isomerase
blr5213	6.5	Bdiaspc4_27445	-	ATP-dependent DNA ligase
blr5237	-5.2	Bdiaspc4_27570	-	hypothetical protein
blr5279	-3.5	Bdiaspc4_27810	-	DUF2380 domain-containing protein
bsr5463	-2.5	Bdiaspc4_28800	-	hypothetical protein
blr5546	4.0	Bdiaspc4_29280	-	hypothetical protein
blr5774	-2.3	Bdiaspc4_30495	-	NAD(P)/FAD-dependent oxidoreductase
blr5821	7.1	Bdiaspc4_30735	-	hypothetical protein
blr5959	5.3	Bdiaspc4_31445	-	hypothetical protein
blr6116	-5.8	Bdiaspc4_32250	-	hypothetical protein
blr6142	-2.2	Bdiaspc4_32395	<i>ade2</i>	adenine deaminase
blr6256	-2.1	Bdiaspc4_32995	-	aldo/keto reductase
blr6312	-4.0	Bdiaspc4_33280	<i>galE</i>	UDP-glucose 4-epimerase GalE
blr6334	4.4	Bdiaspc4_33405	<i>lpdA</i>	dihydropyridyl dehydrogenase
blr6354	-7.3	Bdiaspc4_33510	-	carbohydrate ABC transporter permease
bsi6639	2.4	Bdiaspc4_35005	-	hypothetical protein

blI7021	2.9	Bdiaspc4_37030	-	efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit
blr7346	-2.1	Bdiaspc4_38750	-	OmpA family protein
blr7486	2.3	Bdiaspc4_39500	-	aminoacyl-tRNA hydrolase
blI7512	4.8	Bdiaspc4_39640	-	hypothetical protein
bsr7564	-4.2	Bdiaspc4_39910	-	hypothetical protein
blr7618	-2.2	Bdiaspc4_40200	-	DUF4173 domain-containing protein
blr7698	-5.4	Bdiaspc4_40700	-	hypothetical protein
blr7712	8.1	Bdiaspc4_40795	-	hypothetical protein
blr7713	4.3	Bdiaspc4_40805	-	DUF3147 family protein
blr7874	-2.6	Bdiaspc4_41655	-	ABC transporter permease
blr7958	3.1	Bdiaspc4_42090	-	HlyD family secretion protein
blI8046	-2.8	Bdiaspc4_42590	-	HAD family hydrolase
trnK-UUU	2.1	Bdiaspc4_24130	-	tRNA-Lys

^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 FC values of gene expression in the C183D-*fixK*₂ strain in comparison to the WT, both cultured under microoxic conditions (0.5% O₂).

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

^d Gene name according to the NCBI annotation (GenBank acc. # CP032617); Fernández et al., 2019. Modifications are shaded in light grey.

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

Data sheet C. List of 50 genes that showed a differential expression in both the C183D-*fixK*₂ and *DfixK*₂ strains in comparison with the WT, all cultivated under microoxic conditions.

Query ^a	FC (C183D- <i>fixK</i> ₂ vs. WT) ^b	FC (<i>DfixK</i> ₂ vs. WT) ^c	Locus_tag ^d	Gene name ^e	Product ^f
bsr0093	5.0	3.4	Bdiaspc4_00080	-	hypothetical protein
blI0330	-2.4	-11.0	Bdiaspc4_01315	-	DNA-binding response regulator
blI0818	-2.1	-9.3	Bdiaspc4_03880	-	hypothetical protein
blr1289	-3.2	-23.1	Bdiaspc4_06390	-	oleate hydratase
blI2517	-3.2	-10.2	Bdiaspc4_12930	-	acetate/propionate family kinase
blI2518	-2.6	-10.0	Bdiaspc4_12935	-	phosphoketolase family protein
blI2590	-2.4	-13.6	Bdiaspc4_13350	-	universal stress protein
blI2600	2.5	3.0	Bdiaspc4_13405	-	DUF4142 domain-containing protein
blI2757	5.0	2.2	Bdiaspc4_14260	<i>fixK</i> ₂	CRP/FNR family transcription factor
blr2762	-3.6	-20.4	Bdiaspc4_14285	ORF141	CBS domain-containing protein
blI3115	-9.6	-30.6	Bdiaspc4_16100	-	MBL fold metallo-hydrolase
blI3117	-2.4	-6.6	Bdiaspc4_16110	-	thymidine phosphorylase family protein
blr3353	-2.4	-2.8	Bdiaspc4_17330	-	ABC transporter substrate-binding protein

blr3458	Bdiaspc4_178 65	-2.1	-5.0	<i>ackA2</i>	acetate kinase
blr3815	Bdiaspc4_197 20	-2.2	-7.6	-	HAD family hydrolase
blr4112	Bdiaspc4_212 85	-2.4	-8.3	-	CusA/CzcA family heavy metal efflux RND transporter
blr4240	Bdiaspc4_220 05	-3.1	-25.1	-	pyridoxamine 5'-phosphate oxidase family protein
blr4241	Bdiaspc4_220 10	-2.9	-83.3	-	cytochrome <i>c</i>
blr4412	Bdiaspc4_229 80	-3.2	-20.7	-	translational machinery protein
blr4634	Bdiaspc4_242 60	-2.8	-20.2	-	efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit
blr4635	Bdiaspc4_242 65	-2.5	-29.4	<i>groL5</i> , <i>groEL5</i>	chaperonin GroEL
blr4637	Bdiaspc4_242 75	-2.6	-111.5	<i>hspC2</i>	Hsp20/alpha crystallin family protein
blr4638	Bdiaspc4_242 80	-3.9	-100.0	-	CBS domain-containing protein
blr4644	Bdiaspc4_243 20	-3.2	-20.9	-	universal stress protein
blr4645	Bdiaspc4_243 25	-2.8	-10.6	-	host attachment protein
blr4652	Bdiaspc4_243 70	-3.1	-95.2	-	nitroreductase
blr4653	Bdiaspc4_243 75	-2.8	-16.8	<i>dnaJ</i>	J domain-containing protein
blr4654	Bdiaspc4_243 80	-2.8	-30.0	-	hypothetical protein

blr4655	Bdiaspc4_243 85	-2.5	-14.2	<i>ppsA</i>	phosphoenolpyruvate synthase
blr4658	Bdiaspc4_244 00	-2.1	-13.6	<i>glk</i>	glucokinase
blr5771	Bdiaspc4_304 80	-2.3	-2.5	-	efflux RND transporter permease subunit
blr5777	Bdiaspc4_305 10	-2.2	-5.7	-	DUF302 domain-containing protein
bsr6066	Bdiaspc4_319 80	-4.0	-92.6	-	hypothetical protein
blr6067	Bdiaspc4_319 85	-2.7	-20.9	-	phage holin family protein
blr6073	Bdiaspc4_320 15	-3.5	-27.9	<i>phaC2</i>	probable poly-beta-hydroxybutyrate polymerase
blr6074	Bdiaspc4_320 20	-2.7	-90.9	-	CBS domain-containing protein
blr6525	Bdiaspc4_343 95	-2.1	-7.7	-	hypothetical protein
blr7086	Bdiaspc4_373 90	-2.3	-97.1	<i>hemN₂</i>	oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase
bsr7087	Bdiaspc4_373 95	-3.2	-53.8	-	hypothetical protein
blr7088	Bdiaspc4_374 00	-2.2	-8.1	-	copper chaperone PCu(A)C
blr7345	Bdiaspc4_387 45	-2.9	-16.8	-	hypothetical protein
blr7551	Bdiaspc4_398 40	-2.0	-75.2	-	hypothetical protein
blr7986	Bdiaspc4_422 30	-2.1	-5.6	-	HlyD family efflux transporter periplasmic adaptor subunit

bll7987	-2.5	-17.4	Bdiaspc4_42235	-	ABC transporter permease
bll7988	-3.3	-33.1	Bdiaspc4_42240	-	ABC transporter ATP-binding protein
bll7989	-2.6	-5.3	Bdiaspc4_42245	<i>mat</i>	methionine adenosyltransferase
bll7990	-3.2	-19.7	Bdiaspc4_42250	-	hypothetical protein
bll7991	-2.8	-22.8	Bdiaspc4_42255	-	isoprenylcysteine carboxymethyltransferase family protein
bsl7992	-2.7	-23.0	Bdiaspc4_42260	-	DUF2933 domain-containing protein
bll7993	-2.8	-8.5	Bdiaspc4_42265	-	hypothetical protein

^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 FC values of gene expression in the C183D-*fixK*₂ strain in comparison to the WT, both cultured under microoxic conditions (0.5% O₂).

^c FC values of gene expression in cells of *DfixK*₂ in comparison to wild-type cells, both grown microoxically; Mesa et al., 2008.

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

^e Gene name according to the NCBI annotation (GenBank acc. # CP032617); Fernández et al., 2019. Modifications are shaded in light grey.

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

Tabla 9.2.1. Interacciones Intra-intermoleculares en la proteína FixK₂ en complejo con ADN.

Derivado	INTRA*	INTER*							
		Total	M-M	Favorable	ADN-ADN	Total	Desfavorable		
				M-ADN		M-M	M-ADN	ADN-ADN	
Parental	619	194	58	55	81	15	6	0	9
W135A	723	191	55	55	81	15	6	0	9
T138A	724	194	58	55	81	15	6	0	9
E141A	616	198	62	55	81	13	4	0	9
L142A	616	195	59	55	81	15	6	0	9
E146A	724	195	59	55	81	13	4	0	9
M149A	616	193	57	55	81	15	6	0	9

Favorables: Electrostático, enlace de carbono, puentes de hidrógeno e hidrofóbico (P-P, alquilo, P-alquilo).

Desfavorables: Aceptor-aceptor, donador-donador y estérico.

INTRA* = Interacciones intramoleculares favorables entre residuos del mismo monómero o el ADN.

INTER* = Interacciones intermoleculares entre residuos de monómeros opuestos o el ADN.

M-M = Interacciones entre monómero A y monómero B.

M-ADN = Interacciones monómero-ADN.

ADN-ADN = Interacciones ADN-ADN.

Tabla 9.3.1. Conjunto de 418 metabolitos seleccionados en el proceso de acoplamiento dinámico.

Nombre ^a	InterScore ^b	IntraScore ^c	ScoreRestr ^d
2-hydroxyputrescine	-29,49	5,04	0,01
4-deoxystreptamine	-33,47	2,71	0,16
L-2-amino-2-carboxyethane-sulfonamide	-28,93	-2,87	0,13
aldehido bacillosamine	-30,39	2,87	0,00
1-hydroxy-2-phosphorylethylphosphonate	-31,67	-1,41	0,00
1-amino-2-phosphorylethylphosphonate	-30,16	8,66	0,05
alpha-L-fructofuranose	-29,49	-1,87	0,02
3-dehydro scyllo-inosose	-29,40	0,49	0,02
1-oxo-2-phosphorylethylphosphonate	-29,24	2,47	0,00
(3R)-3-hydroxy-L-arginine	-31,35	4,02	0,10
valienamine	-28,71	2,44	0,10
scyllo-inosose	-28,50	0,98	0,03
4-hydroxy-L-glutamate	-25,93	0,28	0,04
2-carboxy-L-xylonolactone	-28,55	1,75	0,09

D-serine-phosphoethanolamine	-30,50	9,20	0,09
an N-acetyl-D-hexosamine	-30,57	-0,11	0,03
L-tryptophanhydroxamate	-32,51	2,15	0,01
3-phosphonomethylmalate	-28,08	0,08	0,05
L-histidinol phosphate	-27,78	2,82	0,12
meso-2,6-diamino-3-hydroxypimelate	-27,61	9,94	0,08
5'-amino-5'-deoxyuridine	-31,63	0,30	0,77
gamma-L-glutamyl-L-orornithine-delta-lactam	-31,29	3,20	0,08
tunicamine	-38,40	0,32	0,54
a [DsrC]-S-sulfo-L-cysteine	-33,34	6,59	0,00
deoxyribose triphosphate	-36,63	0,19	0,05
monapterin	-31,27	3,27	0,17
2-amino-4-oxo-6-(1',2',3'-trihydroxypropyl)- diquinoid-7,8-dihydroxypterin	-33,80	-4,65	0,09
norbelladine	-31,95	5,33	0,06
D-glycero-D-althro-octulose 8-phosphate	-33,24	10,84	0,04
Nalpa-gamma-L-glutamyl/histamine	-27,92	5,24	0,10

queuine	-32,72	2,68	0,24
phenyl-1-thio-beta-D-galactopyranoside	-29,39	-0,71	0,07
3-hydroxy-D-kynurenine	-26,00	-0,81	0,12
7,8-dihydroneopterin	-29,20	2,75	0,25
pyridoxamine 5'-phosphate	-25,93	-0,32	0,13
3-iodothyronamine	-29,17	2,59	0,00
9-[6(S)-9-diamino-5,6,7,8,9-pentadeoxy-beta-D-ribo-nonafuranosyl]-9H-purin-6-amine	-38,86	0,09	0,55
5-S-cysteinyl dopamine	-28,78	3,36	0,12
tubercidin	-30,18	0,35	0,16
6-O-methylnorlaudanosoline	-34,85	1,20	0,11
beta-D-apiofuranosyl-(1->6)-D-glucose"	-32,79	4,51	0,02
5'-chloroformycin	-31,12	-1,03	0,20
2'-deoxycytoformycin	-29,28	1,02	0,72
bacilysin	-28,99	1,29	0,00
guanosine	-30,42	-0,22	0,01
adenosine	-28,76	-0,10	0,10
2-hydroxyeriodictyol	-33,26	2,40	0,11

(4S)-2,3-dehydro-leucocyanidin	-33,10	3,92	0,12
benzimidazole ribotide phosphate	-32,82	3,06	0,93
(+)-dihydromyricetin	-33,72	2,73	0,15
(-)-gallocatechin	-32,15	3,09	0,01
2-(cystein-S-yl)-2-(1H-indol-3-yl)-acetoneitrile	-27,42	6,78	0,00
N1-(5-phospho-beta-D-ribose)glycinamide	-25,31	9,02	0,17
4-deoxy-beta-L-erythro-hex-4-enopyranuronosyl-(1,4)-D-N-sulfoglucosamine	-37,50	7,33	0,00
N-(4-nitrophenyl)validamine	-29,15	1,81	0,08
nordihydroguaiaretate	-30,50	0,59	0,05
N2-formyl-N1-(5-phospho-beta-D-ribose)glycinamide	-27,58	2,92	0,33
ribavirin-5'-monophosphate	-28,88	-3,17	0,81
5-S-cysteinyl-dopaquinone	-28,85	3,25	0,09
N6-(D-psicosyl)-L-lysine	-28,72	6,74	0,01
p-nitrophenyl-alpha-D-galactopyranoside	-28,71	0,99	0,01
2'-deoxyuridine 3'-monophosphate	-26,85	6,07	0,88

4-demethyl-7-(3-amino-3-carboxypropyl)xyosine	-40,21	0,43	0,65
4-[[[(2S,5S)-5-[(4-hydroxyphenyl)methyl]piperazin-2-yl]methyl]phenol	-29,45	3,31	0,01
bracteatin	-29,10	5,53	0,01
3,3',4',5',7-pentahydroxy-8-methoxyflavone	-31,16	1,77	0,01
a 2-oxindole-3-acetyl-hexose	-32,41	5,73	0,09
ATPgammaS	-40,14	7,30	0,48
melibionate	-30,64	2,28	0,00
leucomelone	-31,79	0,92	0,53
S-(hydroxysulfenamide)glutathione	-27,90	1,51	0,00
7,8-dihydroneopterin 3'-phosphate	-27,84	6,43	0,18
G(5')ppp-mRNA	-41,49	15,44	0,06
rCdRP	-28,61	3,65	0,06
5-amino-6-(5-phospho-D-riboseylamino)uracil	-28,29	1,25	0,09
dXMP	-27,86	1,49	0,97
queuosine	-35,11	2,23	0,12

anguibactin		-29,01	0,91	0,10
R-vicianin		-36,14	1,57	0,05
5-carboxymethylaminomethyluridine		-27,62	2,03	0,20
2'-deoxyuridine diphosphate	5'-alpha,beta-imido-	-28,77	8,46	0,00
chrysobactin		-30,61	-2,09	0,00
UTP		-34,01	-4,11	0,00
cytidine hydroxyethyl)phosphonoyl]phosphate}	5'-{[hydroxy(2-	-31,51	7,30	0,00
lupinate		-25,51	2,05	0,11
trans-5-O-caffeoyl-D-quinat		-28,69	5,94	0,13
mizoribine 5'-monophosphate		-25,23	-2,41	0,55
2'-dehydrokanamycin A		-37,38	16,75	0,00
dUDP		-27,04	-0,23	0,00
alpha-chitobiose 6'-phosphate		-30,27	16,35	0,22
an [RNA]-3'-uridine-2',3'-cyclophosphate		-27,83	2,95	0,08
succinylo-toyocamycin phosphate		-36,40	0,32	0,95
pretenellin A		-28,46	4,27	0,04

chitobiose 6'-phosphate	-29,52	9,13	0,12
glutaminy-beta-ketophononate-adenosine	-34,67	0,85	0,00
CTP	-30,93	13,75	0,14
piceid	-29,74	2,16	0,08
[1-(2-amino-7-methyl-4-oxo-7,8-dihydro-3H-pteridin-6-yl)]ethyl-(4-aminophenyl)-1-deoxy-D-riitol	-32,90	7,85	0,06
cyanidin 3-O-(beta-D-xylosyl-(1->2)-beta-D-galactoside)	-43,09	-0,08	0,00
a ring-opened 7-methylguanine in DNA	-32,20	1,75	0,68
7-O-methyl-luteone epoxide	-28,82	1,48	0,47
coelenterazine	-32,79	1,15	0,00
O-demethylpuromycin	-33,73	3,46	0,11
violaceinate	-28,41	0,91	0,03
3-O-(6-O-alpha-D-xylosylphospho-alpha-D-mannopyranosyl)-alpha-D-mannopyranose	-36,49	-0,84	0,05
an N-acyl-neuraminate 9-phosphate	-25,13	2,21	0,13

dITP	-29,63	2,78	0,01
CMP-5'-N-hydroxy-3-(aminopropyl)phosphonate	-28,51	1,76	0,08
methylsalicylate O-beta-D-xylopyranosyl-(1->6)-O-beta-D-glucopyranoside	-30,39	4,50	0,20
2'-azido-dCTP	-30,30	-1,03	0,09
2'-azido-2'-deoxyuridine-5'-diphosphate	-25,98	-1,08	0,13
linalyl 6-O-alpha-L-arabinopyranosyl- beta-D-glucopyranoside	-29,66	1,04	0,05
N-acetyl-O-demethylpuromycin	-34,33	0,86	0,19
XTP	-30,50	0,90	0,08
7-[(3S)-(3-amino-3-carboxypropyl)-4-methyl]wyosine	-29,48	1,27	0,29
8-oxo-dADP	-25,52	4,49	0,04
an N1-hydroxyethyladenine in DNA	-29,20	3,38	0,17
4-demethylwyosine37 in tRNAPhe	-30,96	2,18	0,76
tobramycin 2''-phosphate	-33,67	9,12	0,07

ciceritol	-32,66	6,72	0,17
queosine at position 34 of a tRNA ^{Asp}	-36,16	0,80	0,31
N-acetyl-tunicaminy-uracil	-28,51	-1,44	0,12
5'-[p-(fluorosulphonyl)benzoyl]adenosine	-28,49	3,06	0,03
(E)-1-(glutathion-S-yl)-N-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)ethan-1-imine	-28,12	-13,48	0,01
2-GDP-[(2S,3S,6R)-5-amino-6-methyl-3,6-dihydro-2H-pyran-3-ol]	-33,46	-0,40	0,00
hypholomine B	-32,52	6,88	0,02
ADP-ribose 2'-phosphate	-35,73	3,62	0,10
a [glutamine synthetase]-O4-(5'-adenyl)-L-tyrosine	-32,07	0,00	0,07
estriol-16a-glucuronide	-27,84	2,32	0,10
dHAPT	-26,96	-1,07	0,05
CDP-D-xylulose	-29,19	-1,21	0,08
uridine-5'-diphosphate bromoaceto	-25,41	1,73	0,00

UDP-2,6-dideoxy-2-acetamidino-beta-L-galactose	-31,93	-0,40	0,00
N-acetylde-methylphosphinothricin adenylate	-29,11	1,43	0,12
(D-firefly luciferyl)adenylate	-33,09	6,01	0,02
M1	-28,68	7,47	0,00
2-methylbacteriohopanetetrol	-32,52	6,63	0,10
(+)-neocarzinostatin aglycone	-30,05	4,81	0,02
apigenin 7-O-[beta-D-riposyl-(1->2)-beta-D-glucoside]	-32,20	-0,66	0,02
luteolin 7-O-beta-D-digluconide	-36,22	10,55	0,02
CDP-1L-myo-inositol	-28,85	5,98	0,05
alpha-D-xylosyl-(1->6)-beta-D-glucosyl-(1->4)-[alpha-D-xylose-(1,6)]-beta-D-glucose	-32,59	-0,18	0,08
amentoflavone	-31,62	4,99	0,00
mannose-(1D-myo-inositol 1-phosphate)2	-32,86	0,78	0,91
a 5-taurinomethyluridine in tRNA	-27,23	8,38	0,70
ribosyl hopane	-30,09	3,17	0,18

fagopyritol A3	-34,66	13,73	0,02
maysin	-31,39	-1,75	0,52
4-amino-2-(methanethiyl)-5-oxo-3-sulfanylpiperidine-2-carboxyl-[H]mE non-ribosomal peptide synthetase]	-31,12	8,18	0,26
UDP-alpha-D-sulfoquinovopyranose	-29,55	-2,20	0,00
neocaratteraose 4-O-sulfate	-35,32	5,69	0,05
nocardicin A	-26,99	-8,93	0,10
hordatine A	-29,77	6,92	0,18
7-[(3S)-(3-amino-3-carboxypropyl)]-wyosine37 in tRNAPhe	-30,30	6,10	1,00
17-alpha-(N-acetyl-alpha-D-glucosaminy)estradiol 3-D-glucuronoside	-33,40	2,80	0,10
an osmoregulated periplasmic glucan with phosphoglycerol substituent	-31,18	5,68	0,70
quercetin-3-rhamnoside-7-rhamnoside	-29,57	1,64	0,14
1-(5-phospho-beta-D-ribose)-5-[(5-phosphoribosyl(amino)methylideneamino]imidazole-4-carboxamide	-25,98	-17,38	0,31

UDP-N-acetyl-D-galactosamine bissulfate	4,6-	-32,42	3,03	0,00
a tunicamycin		-30,69	2,15	0,00
ginsenoside C-Y		-36,14	2,62	0,19
ADP ribose 1"-phosphate		-26,51	-0,21	0,96
a [DNA]-(3')-diphospho-(5')-guanosine		-26,39	-1,91	0,00
(S)-3-aminobutanoyl-CoA		-33,71	6,70	0,18
alpha-L-colitoyl-[1->2]-beta-D-galactosyl- [1->3]-N-acetyl-beta-D-glucosaminy-[1->3]- alpha-D-galactosyl-[1->3]-N-acetyl-D- galactosamine		-37,01	-2,50	0,01
isoniazid-NADP		-33,92	8,95	0,00
1,2,3,6-tetrakis-O-galloyl-beta-D-glucose		-33,72	23,02	0,03
a [phycoerythrocyanin Cys155-phyocyanobilin (R)-NADPHX beta-subunit]-		-29,53	5,88	0,06
4-hydroxyphenylacetyl-CoA		-32,64	7,15	0,08

alpha-NADPH	-26,30	0,41	0,11
2,3-diaminopropanoate	-30,11	1,79	0,13
imidodiphosphate	-31,05	0,81	0,00
methylenediphosphonate	-30,64	0,61	0,05
(2R,4S)-2, 4-diaminopentanoate	-29,79	4,94	0,04
3-phosphonopropanoate	-29,60	-0,99	0,01
D-ornithine	-29,57	1,61	0,07
2-amino-3-phosphonopropanoate	-32,86	-3,09	0,02
D-erythronate	-28,63	1,91	0,00
glyphosate	-31,40	4,44	0,00
2,5-diaminohexanoate	-30,98	1,85	0,07
L-beta-lysine	-30,09	3,92	0,03
(3S)-beta-arginine	-35,34	3,24	0,00
phospholactate	-28,78	-0,67	0,00
carboxynorspermidine	-34,51	3,04	0,16
pamidronate	-37,17	-4,38	0,15
thiocitrulline	-32,83	2,60	0,00
1-deoxy-1-imino-D-erythrose 4-phosphate	-32,12	-0,02	0,00
2-phosphono-3-sulfopropionate	-31,98	1,72	0,00
2-amino-4-phosphonobutanoate	-28,95	-2,20	0,00

(2R,3S,6S)-2,6-diamino-3-hydroxy-diaminopimelate	-35,66	4,16	0,01
trimetaphosphate	-30,10	0,00	0,01
Nomega-phosphotaurocyamine	-34,59	-1,51	0,00
Nomega-hydroxy-L-arginine	-30,88	0,43	0,00
2-amino-2-deoxy-D-gluconate	-30,13	1,29	0,07
[5-(aminomethyl)furan-3-yl]methyl diphosphate	-39,26	9,22	0,00
(2S)-2-amino-3-oxo-4-phosphoxybutanoate	-29,67	-3,91	0,00
diaminobiotin	-31,60	-0,09	0,00
a 1-acyl-sn-glycerol 3-phosphate	-29,18	1,32	0,00
a 1-O-(alk-1-enyl)-sn-3-phosphoglycerol	-29,05	3,22	0,07
D-lombricine	-37,91	4,29	0,00
4-methylene diaminopimelate	-31,11	2,00	0,01
a [receptor protein] (L-serine/L-threonine) phosphate	-28,81	0,75	0,00
deoxyribose 1-phosphate	-28,76	0,72	0,00
7,8-diaminopelargonate	-28,70	-0,50	0,00
D-cystathionine	-30,81	4,58	0,00
quisqualate	-28,61	0,18	0,02

N-delta-(phosphonoacetyl)-L-ornithine	-35,17	4,61	0,01
Nomega-phospho-L-arginine	-35,15	1,60	0,03
ribose 1,3-cyclic phosphate	-28,47	-0,23	0,02
aldehydo-D-iduronate	-28,40	1,46	0,00
D-erythro-imidazole-glycerol-phosphate	-32,42	3,09	0,00
gamma-L-glutamyl 5-phosphate	-29,48	0,18	0,07
(E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate	-31,50	1,94	0,02
hexanediol 1,6-bisphosphate	-33,15	2,89	0,15
gamma-glutamyl-L-putrescine	-30,93	4,48	0,00
imidazole acetol-phosphate	-28,73	1,74	0,00
5-phospho-D-arabinonhydroxamate	-32,71	4,31	0,18
proclavamate	-28,51	3,26	0,01
an isoprenoid diphosphate	-30,22	1,44	0,00
2-deoxy-2-amino glucitol-6-phosphate	-31,99	4,25	0,00
D-ribulose-1,5-bisphosphate	-35,91	8,02	0,00
N-nitro-L-arginine	-29,62	1,78	0,00
L-Ala-D-Gln	-29,54	2,78	0,00

risedronate	-33,39	-0,09	0,00
3-phospho-D-glyceroyl-phosphate	-29,44	4,15	0,06
glycerophosphoserine	-31,40	5,39	0,00
dopamine 3-O-sulfate	-29,16	-1,47	0,01
D-tryptophan	-29,10	1,82	0,00
ornaline	-34,92	4,75	0,07
D-octopine	-32,88	6,77	0,00
5-S-cysteinyl-dopa	-40,47	8,19	0,07
5-(methylsulfanyl)-ribulose 1-phosphate	-28,58	1,22	0,00
herbicide 14A	-34,21	-2,69	0,00
6-sulfo-alpha-D-quinovose	-28,43	1,19	0,09
phosphorylated His189-[PtsI]	-30,27	-0,49	0,00
minodronate	-37,83	-3,40	0,11
4-(beta-D-ribofuranosyl)hydroxybenzene 5'-phosphate	-37,56	1,96	0,00
N'-phosphoguanidinoethyl phosphate	-30,00	3,14	0,06
bromohydrin of isopentenyl pyrophosphate	-29,79	-0,14	0,00

D,L-6-methyltryptophan	-29,75	1,77	0,00
6-chloro-D-tryptophan	-29,64	1,64	0,00
N-malonylanthranilate	-29,61	3,04	0,06
N-acetylglutaryl-phosphate	-31,08	2,80	0,00
L,L-homocystine	-29,02	1,79	0,08
demethyldehydrophos	-34,45	1,29	0,00
epsilon-(D-ornithyl)-L-lysine	-32,53	6,60	0,00
4-amino-2-methyl-5-(diphosphooxymethyl)pyrimidine	-32,52	0,53	0,00
stizolobinate	-28,64	3,07	0,00
7,8-dihydroneopterin 2'-phosphate	-38,39	4,75	0,00
diphosphoglycolyl proline	-34,88	2,92	0,00
thymidine 3'-monophosphate	-36,28	1,10	0,05
serotonin O-sulfate	-29,27	1,37	0,03
L-saccharopine	-32,66	8,20	0,00
2-(formamido)-N1-(5-phospho-beta-D-ribose)acetamidine	-34,37	4,14	0,00
alpha-D-glucuronate 1-phosphate	-29,07	5,83	0,09
S-indole-L-cysteine	-30,78	1,42	0,00

(R)-N-formyl-beta-hydroxy-L-kynurenine	-30,57	-2,76	0,02
a S-3-hydroxyacylhydrolipoate	-28,65	-0,38	0,16
a purine triphosphate	-36,89	-0,19	0,00
L-arginino-succinate	-32,50	4,58	0,00
a 2,4-dioxotetrahydropyrimidine D-ribonucleotide	-34,08	-4,65	0,00
beta-nicotinate D-ribonucleotide	-35,55	1,74	0,00
L-seryl-L-phenylalanine	-29,05	-1,13	0,01
1-(5'-phospho-beta-D-ribofuranosyl)barbiturate	-35,19	3,68	0,03
indol-3-ylmethylisothiocyanate-L-cysteine	-31,66	2,84	0,00
a [DNA]-nucleotide-3'-phosphate	-28,42	1,82	0,09
epsilon-(gamma-L-glutamyl)-L-lysine	-29,83	4,59	0,03
BPH-674	-37,59	7,78	0,00
8-oxo-dAMP	-35,56	1,11	0,16
7,8-dihydroneopterin 2',3'-cyclic phosphate	-32,47	2,51	0,10
1-(5-phosphoribosyl)imidazole-4-acetate	-33,92	-1,59	0,00
dideoxythymidylate	-30,78	-0,03	0,00

L-arginyl-4-hydroxy-5-phosphonopentanoate	-36,55	1,20	0,10
hydroxymethyl-dCDP	-39,58	7,25	0,00
L-glutamyl-L-glutamate	-28,62	2,85	0,00
formycin 5'-PO4	-34,55	-5,02	0,00
a 5'-triphospho-purine-[mRNA]	-38,76	0,51	0,00
a [protein]-N6-(O3-phospho-D-erythrosyl)-L-lysine	-32,68	7,33	0,00
alpha-ribose 5'-phosphate	-35,65	-2,27	0,06
BPH-652	-37,04	3,03	0,13
2-amino-4-[5-(2-amino-2-carboxylatoethyl)-2-hydroxyphenyl]pentanedioate	-33,93	4,13	0,17
rhizoctin A	-33,84	5,43	0,07
2'-deoxyadenosine 3'-monophosphate	-32,23	5,07	0,00
2'-chloro-2'-deoxyuridine 5'-diphosphate	-36,36	-0,69	0,01
6-(2-amino-2-carboxylatoethyl)-7-hydroxy-8-oxo-1,2,3,4,7,8-hexahydroquinoline-2,4-dicarboxylate	-34,86	2,15	0,00

(2E,6E,10E)-12-hydroxy-3,7,11-trimethyldodeca-2,6,10-trien-1-yl phosphonatoxyphosphonate	-36,26	5,59	0,00
dGDP	-39,00	-3,30	0,00
cyclic 3',5'-thymidine monophosphate	-28,89	1,38	0,00
5-hydroxymethylcytidine 5'-phosphate	-33,18	-2,69	0,00
alpha-D-ribose (acetamidomethylphosphonate) 1-5-triphosphate	-43,23	3,43	0,01
6-azauridine diphosphate	-35,79	-0,64	0,02
L-tyrosyl-L-arginine	-34,29	6,39	0,07
(citril)-N-(3-aminopropyl)-N-hydroxyacetamide	-29,87	0,81	0,00
mannopine	-29,81	4,64	0,19
deacetoxycephalosporin C	-33,86	-0,11	0,01
[1-(2-amino-7-methyl-4-oxo-7,8-dihydro-3H-pteridin-6-yl)ethyl] diphosphate	-33,80	1,67	0,00
alpha-D-ribose-1-(methyl)phosphonate-5-triphosphate	-36,59	0,27	0,07

3'-azido-3'-deoxythymidine 5'-phosphate	-32,15	0,66	0,00
5-iodo-dCTP	-40,24	-1,58	0,00
7,8-dihydrornapterin triphosphate	-41,41	6,13	0,00
5-taurinomethyluridine	-34,45	-2,41	0,00
2-carboxy-3-keto-D-arabinitol-1,5-bisphosphate	-28,91	-2,64	0,00
dTTP	-39,60	0,37	0,00
peregrinol diphosphate	-40,95	4,80	0,13
N-(5-phosphoribosyl)-anthranilate	-31,25	-2,29	0,00
adenosine 5'-phosphosulfate	-36,33	0,35	0,06
steroid O sulfate	-30,94	0,43	0,07
an [RNA]-3'-adenosine-3'-phosphate	-37,57	-1,22	0,00
2-fluoro-dCTP	-38,58	4,23	0,00
2'-amino-2'-deoxyATP	-41,22	2,79	0,10
mugineate	-29,18	5,19	0,00
(4-{4-[2-(gamma-L-glutamylamino)ethyl]phenoxyethyl}furan-2-yl)methanamine	-35,73	3,72	0,06
glutathione sulfinate	-28,87	2,65	0,08

8-oxo-dGTP	-41,94	5,27	0,00
(2-oxindol-3-yl)acetyl-L-aspartate	-28,68	-0,02	0,17
CMP-5'-3-(aminopropyl)phosphonate	-36,38	8,68	0,07
5-hydroxy-CTP	-38,81	2,71	0,00
dATP	-38,68	-1,23	0,00
urate D-ribonucleotide	-32,02	-5,60	0,04
validoxylamine A 7'-phosphate	-34,21	1,53	0,00
N2-hydroxyguanosine 5'-monophosphate	-31,63	8,22	0,00
A9145C	-34,11	1,48	0,11
alpha-D-ribose-1-[N-(phosphonomethyl)glycine] 5-triphosphate	-38,86	3,01	0,05
(3-hydroxy-2-oxindol-3-yl)acetyl-L-aspartate	-28,75	0,67	0,01
a 7,8-dihydro-8-oxoguanine in DNA	-37,49	6,32	0,00
2-hydroxy-dATP	-38,74	-0,41	0,09
pyridin-1-ium-3-carboxylate-5-thiocarboxylate mononucleotide	-30,59	0,44	0,00
(S)-S-adenosyl-L-methionine	-33,02	7,50	0,04

8-oxo-GTP	-40,33	5,51	0,05
2-amino-4-oxo-6-(erythro-1',2',3'-trihydroxypropyl)-7,8-dihydroxypteridine triphosphate	-38,87	1,21	0,00
a pseudouridine65 in tRNA	-32,53	7,53	0,18
dCTP	-33,73	0,47	0,00
5,12-dihydroxanthommatin	-37,34	-1,25	0,00
(2R,4E)-2-amino-5-(((2S,3R)-2-hydroxy-3-(1H-indol-3-yl)butanamido)methanimidoyl)amino)pent-4-enoate	-32,22	3,03	0,00
2,6-dichloro-3-(glutathion-S-yl)-hydroquinone	-35,77	3,50	0,00
1-methyl-dATP	-36,85	5,47	0,07
cephalosporin C	-33,18	2,08	0,00
8-demethyl-8-formylriboflavin 5'-phosphate	-37,58	7,93	0,15
a [lysine-biosynthesis-protein LysWJ-C-terminal-gamma-(6-phospho-L-2-aminoacidp-2-yl)-L-glutamate	-29,14	4,79	0,07
an 18S rRNA N1-methylpseudouridine1191	-32,34	9,49	0,19

a 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine in DNA	-33,34	0,36	0,06
an N3-hydroxypropylcytosine in DNA	-34,34	9,78	0,04
S-Inosyl-L-homocysteine	-29,73	1,77	0,14
a lysidine ³⁴ in tRNA ^{Ile2}	-41,06	8,37	0,00
2-(glutathion-S-yl)-2-methylbut-3-enal	-29,61	0,70	0,01
(8S)-3',8-cyclo-7,8-dihydroguanosine 5'-triphosphate	-36,28	-4,48	0,00
7,8-dihydropterin-6-ylmethyl-4-(beta-D-ribofuranosyl)aminobenzene 5'-phosphate	-36,88	-3,64	0,01
2-cis,6-trans,10-trans-geranylgeranyl diphosphate	-32,35	6,86	0,00
5'-O-[N-(L-glutamyl)-sulfamoyl]adenosine	-35,44	-0,36	0,00
fluvastatin	-32,92	3,43	0,00
L-valyl-L-arginyl-4-hydroxy-5-phosphonopentanoate	-33,80	-0,95	0,00
5'-O-[N-(L-aspartyl)sulfamoyl]adenosine	-33,72	3,12	0,00

an NDP-2,6-dideoxy-L-erythro-4-hexulose	-29,33	9,64	0,01
glutamyl-beta-ketophosphonate-adenosine	-34,24	2,14	0,00
indol-3-ylmethylisothiocyanate-glutathione	-35,10	4,46	0,00
3'-phosphoadenylyl-sulfate	-32,96	4,40	0,12
aspartyl-phosphonate-adenosine	-32,91	3,35	0,01
N5-(cytidine 5'-diphosphoramidyl)-L-glutamine	-35,76	0,00	0,00
5''-phosphoribostamycin	-36,42	2,68	0,00
nocardicin C	-36,37	2,06	0,00
glutathionylspermidine	-30,03	7,11	0,09
a 1,N2-ethenoguanine in DNA	-31,99	3,05	0,00
an N1-methyladenine in DNA	-29,84	5,25	0,00
N10-formyl-2,4-diaminodideazaflolate	-34,58	0,35	0,10
(glutathion-S-yl)(1H-indol-3-yl)acetoneitrile	-32,28	-0,28	0,00
an N6,N6-dimethyladenine in rRNA	-31,03	4,59	0,22

a 5'-phospho-(ribonucleotide)-[DNA]	-30,83	-1,54	0,03
(glutathion-S-yl)-4-hydroxy-2-nonenal	-30,44	3,20	0,00
N-(beta-glucosyl)-(oxindol-3-yl)acetyl-aspartate	-32,23	0,34	0,00
tartrazine	-29,91	-0,44	0,02
7'-O-phosphohyromycin B	-38,39	0,15	0,00
[1-(2-amino-7-methyl-4-oxo-7,8-dihydro-3H-pteridin-6-yl)ethyl-(4-aminophenyl)-1-deoxy-D-ribose] 5'-phosphate	-33,54	7,62	0,07
dTDP-4-formamido-4,6-dideoxy-alpha-D-glucose	-35,27	6,40	0,06
diaminobutryl-citryl-ethanolamino-alpha-ketoglutarate	-30,50	-4,00	0,03
10-methyl-5,6,7,8-tetrahydropteroylglutamate	-31,37	-2,13	0,08
[1-(2-amino-7-methyl-4-oxo-7,8-dihydro-3H-pteridin-6-yl)ethyl-4-(beta-D-ribofuranosyl)aminobenzene 5'-phosphate	-33,26	-0,53	0,05

a	5-carboxymethylaminomethyl-2'-O-methyluridine ³⁴ in tRNA ^{Leu}	-32,13	3,20	0,26
	trifidothyroacetate ester glucuronide	-31,02	3,54	0,07
a	5-(methoxycarbonylmethoxy)uridine ³⁴ in tRNA	-30,01	1,85	0,65
	prenylated FMN ^{H2}	-32,03	5,47	0,00
	4-(glutathion-S-yl)-fencloirim	-29,32	5,65	0,00
	ADP-5-ethyl-4-methylthiazole-2-carboxylate	-33,45	1,86	0,00
	1843U89	-31,50	-0,99	0,23
	reduced coenzyme F420-1	-37,09	7,09	0,11
	2-methylsulfanyl-N6-dimethylallyladosine ³⁷ in Trna	-30,30	4,63	0,29
	5-beta-scymnol sulfate	-30,75	3,51	0,06
	coelenterazine disulfonate	-32,83	-1,07	0,00
	beta-glucosyl-hydroxymethylcytosine in DNA	-29,47	5,94	0,08
	1-(5-O-phospho-beta-D-ribofuranosyl)-5-(sulfanylcarbonyl)pyridin-1-ium-3-carbonyl adenyate	-35,47	3,66	0,67

7-[(3S)-4-methoxy-(3-amino-3-carboxypropyl)]-wyosine37 in tRNAPhe	-31,66	8,61	0,31
7,8-H2pterin-6-ylmethyl-(4-aminophenyl)-1-deoxy-5-[1-alpha-D-ribofuranosyl 5-phosphate]-D-ribose	-30,19	-2,26	0,00
gamma-L-glutamyl-butirosin B	-33,55	-1,89	0,06
reduced reactive black 5	-38,37	-2,11	0,01
luteolin 7-O-[beta-D-glucosyluronate-(1,2)-beta-D-glucosiduronate]-4'-O-beta-D-glucosiduronate	-38,76	9,56	0,11
Nomega-(ADP-D-ribosyl)-L-arginine	-30,89	-4,36	0,00
3-hydroxybenzoyl-CoA	-36,53	4,41	0,03
[1-(2-amino-7-methyl-4-oxo-7,8-dihydro-3H-pteridin-6-yl)ethyl-(4-aminophenyl)-1-deoxy-5-[1-alpha-D-ribofuranosyl triphosphate]-D-ribose]	-33,29	-1,12	0,01
7,8-dihydrmethanopterin	-29,98	4,37	0,06

adenylcoelenterazine disulfonate	-33,90	-2,67	0,00
GMP	-30,23	6,64	0,00
cyclic-GMP	-26,36	0,45	0,00
CMP-5'-3-(N-acetyl-N-hydroxy)aminopropylphosphonate	-30,92	-3,95	0,00
3'-amino-3'-deoxy/AMP	-32,37	-1,17	0,91
dAMP	-32,75	0,56	0,00
cyclic-AMP	-30,03	-0,18	0,00
acetyl AMP	-27,58	10,23	0,00
riboflavin cyclic-4',5'-phosphate	-36,92	1,89	0,10
8alpha-(N(3)-histidyl)riboflavin	-31,05	3,69	0,00
a 12-hydroxyjasmonate sulfate	-25,02	6,37	0,00
ATP	-35,44	-1,72	0,00
dCMP	-31,70	0,64	0,00
CMP	-31,40	-7,93	0,00
CMP-5'-phosphonofornate	-33,10	-3,42	0,12
5-hydroxy-CMP	-35,38	-5,10	0,00
1-(5-phospho-beta-D-ribose)-AMP	-29,72	-4,00	0,02

6-S-cysteinyflavin mononucleotide	-27,82	0,86	0,00
reduced dinucleotide			
3-acetylpyridine adenine	-28,55	2,32	0,00

^a Nombre de las moléculas según las bases de datos *Plant Metabolic Network* (<https://www.plantcyc.org/>) y *MetaCyc Metabolic Pathway Database* (<https://metacyc.org/>).

^b Parámetro del programa rDock (<http://rdock.sourceforge.net/>) que representa la puntuación de interacción proteína-ligando. Para la selección, se consideraron aquellos con un valor < -25.

^c Parámetro del programa rDock (<http://rdock.sourceforge.net/>) que representa la energía relativa de la conformación del ligando y el ajuste espacial a la conformación de la cavidad. Se consideraron aquellos con un valor < 10 para etapas posteriores.

^d Parámetro del programa rDock (<http://rdock.sourceforge.net/>) que representa las sanciones por restricción externa del espacio del metabolito ocupado en la cavidad. Sólo se consideraron aquellos con un valor próximo a cero.

Tabla 9.3.2. Conjunto de 147 metabolitos seleccionados en el proceso de desacoplamiento dinámico.

Nombre ^a	InterScore ^b	IntraScore ^c	ScoreRestr ^d	W _{QB} ^e
3' 4' 5' 7-pentahydroxy-8-methoxyflavone	-31,16	1,77	0,01	3,03
queuosine	-35,11	2,23	0,12	3,07
piceid	-29,74	2,16	0,08	3,07
4-hydroxy-L-glutamate	-25,93	0,28	0,04	3,14
beta-nicotinate D-ribonucleotide	-35,55	1,74	0,00	3,26
D L-6-methyltryptophan	-29,75	1,77	0,00	3,28
phosphorylated His189-[P _{ts}]	-30,27	-0,49	0,00	3,29
(2R 4S)-2,4-diaminopentanoate	-29,79	4,94	0,04	3,31
lupinate	-25,51	2,05	0,11	3,34
(4S)-2,3-dehydro-leucocyanidin	-33,10	3,92	0,12	3,35
an N3-hydroxypropylcytosine in DNA	-34,34	9,78	0,04	3,36
a 12-hydroxyjasmonate sulfate	-25,02	6,37	0,83	3,36

1-(5-phosphoribosyl)imidazole-4-acetate	-33,92	-1,59	0,00	3,38
beta-glucosyl-hydroxymethylcytosine in DNA	-29,47	5,94	0,08	3,39
indol-3-ylmethylisothiocyanate-L-cysteine	-31,66	2,84	0,00	3,40
glutathione sulfinate	-28,87	2,65	0,08	3,40
a [DsrC]-S-sulfo-L-cysteine	-33,34	6,59	0,00	3,47
2-methylsulfanyl-N6-dimethylallyladenine37 in tRNA	-30,30	4,63	0,29	3,53
epsilon-(gamma-L-glutamyl)-L-lysine	-29,83	4,59	0,03	3,58
cytidine 5'-[hydroxy(2-hydroxyethyl)phosphonyl]phosphate}	-31,51	7,30	0,00	3,63
phenyl-1-thio-beta-D-galactopyranoside	-29,39	-0,71	0,07	3,67
an N1-hydroxyethyladenine in DNA	-29,20	3,38	0,17	3,69
D-cystathionine	-30,81	4,58	0,00	3,72
hordatine A	-29,77	6,92	0,19	3,75
2-hydroxy-dATP	-38,74	-0,41	0,09	3,75

Nomega-phospho-L-arginine	-35,15	1,60	0,03	3,79
linalyl 6-O-alpha-L-arabinopyranosyl- beta-D-glucopyranoside	-29,66	1,04	0,05	3,82
gamma-glutamyl-L-putrescine	-30,93	4,48	0,00	3,86
(S)-S-adenosyl-L-methionine	-33,02	7,50	0,04	3,87
L-arginyl-4-hydroxy-5-phosphopentanoate	-36,55	1,20	0,10	3,89
an N6 N6-dimethyladenine in rRNA	-31,03	4,59	0,22	3,89
8alpha-(N(3)-histidyl)riboflavin	-31,05	3,69	0,00	3,90
epsilon-(D-ornithyl)-L-lysine	-32,53	6,60	0,00	3,93
4-amino-2-methyl-5-(diphosphoxymethyl)pyrimidine	-32,52	0,53	0,00	3,97
steroid O sulfate	-30,94	0,43	0,07	3,97
8-oxo-GTP	-40,33	5,51	0,05	4,00
cyclic-AMP	-30,03	-0,18	0,00	4,06
R-vicianin	-36,14	1,57	0,05	4,06
N5-(cytidine 5'-diphosphoramidyl)-L-glutamine	-35,76	0,00	0,00	4,10

Nomega-(ADP-D-ribose)-L-arginine	-30,89	-4,36	0,00	4,10
coelenterazine disulfonate	-32,83	-1,07	0,00	4,11
5-S-cysteinyldopaquinone	-28,85	3,25	0,09	4,12
a 2-oxindole-3-acetyl-hexose	-32,41	5,73	0,09	4,21
(+)-neocarzinostatin chromophore aglycone	-30,05	4,81	0,02	4,24
L-tyrosyl-L-arginine	-34,29	6,39	0,07	4,31
cyclic-GMP	-26,36	0,45	0,00	4,34
L-arginino-succinate	-32,50	4,58	0,00	4,35
ADP-ribose 2'-phosphate	-35,73	3,62	0,10	4,36
risedronate	-33,39	-0,09	0,00	4,40
[1-(2-amino-7-methyl-4-oxo-7,8-dihydro-3H-pteridin-6-yl)ethyl-(4-aminophenyl)-1-deoxy-D-ribose]	-32,90	7,85	0,06	4,44
L-histidinol phosphate	-27,78	2,82	0,26	4,46
UDP-N-acetyl-D-galactosamine 4-6-bisulfate	-32,42	3,03	0,30	4,49
a lysidine ³⁴ in tRNA ^{Leu2}	-41,06	8,37	0,00	4,51
(glutathion-S-yl)-4-hydroxy-2-nonenal	-30,44	3,20	0,00	4,51
valienamine	-28,71	2,44	0,10	4,53

gamma-L-glutamyl-butirosin B	-33,55	-1,89	0,06	4,56
cephalosporin C	-33,17	2,08	0,00	4,57
(2R 3S 6S)-2,6-diamino-3-hydroxy-diaminopimelate	-35,66	4,16	0,01	4,58
S-indole-L-cysteine	-30,78	1,42	0,00	4,58
riboflavin cyclic-4' 5'-phosphate	-36,92	1,89	0,10	4,59
Nomega-hydroxy-L-arginine	-30,88	0,43	0,00	4,66
(2R 4E)-2-amino-5-(((2S 3R)-2-hydroxy-3-(1H-indol-3-yl)butanamido)methanimidoyl)amino]pent-4-enoate	-32,22	3,03	0,00	4,71
N-acetyl-tunicaminy-uracil	-28,51	-1,44	0,12	4,72
1-oxo-2-phosphorylethylphosphonate	-29,24	2,47	0,00	4,72
minodronate	-37,83	-3,40	0,11	4,74
N'-phosphoguanidinoethyl methyl phosphate	-30,00	3,14	0,06	4,75
a 1 N2-ethenoguanine in DNA	-31,99	3,05	0,00	4,77
2-(glutathion-S-yl)-2-methylbut-3-enal	-29,61	0,70	0,01	4,78
2-fluoro-dCTP	-38,58	4,23	0,00	4,85

N-malonylanthranilate	-29,61	3,04	0,06	4,88
A9145C	-34,11	1,48	0,11	4,89
ADP ribose 1"-phosphate	-26,51	-0,21	0,96	4,99
D-lombricine	-37,91	4,29	0,00	5,02
mannopine	-29,81	4,64	0,20	5,02
a [receptor protein] (L-serine/L-threonine) phosphate	-28,81	0,75	0,00	5,08
7 8-dihydroneopterin 2' 3'-cyclic phosphate	-32,47	2,51	0,10	5,08
guanosine	-30,42	-0,22	0,01	5,11
D-tryptophan	-29,10	1,82	0,00	5,18
tartrazine	-29,91	-0,44	0,02	5,24
7"-O-phosphohyromycin B	-38,39	0,15	0,00	5,24
alpha-L-colitosyl-[1->2]-beta-D-galactosyl-[1->3]-N-acetyl-beta-D-glucosaminy]-[1->3]-alpha-D-galactosyl-[1->3]-N-acetyl-D-galactosamine	-37,01	-2,50	0,01	5,30
8-demethyl-8-formylriboflavin 5'-phosphate	-37,58	7,93	0,15	5,31
cyanidin 3-O-(beta-D-xylosyl)-(1->2)-beta-D-galactoside)	-43,09	-0,08	0,00	5,34

gamma-L-glutamyl 5-phosphate	-29,48	0,18	0,07	5,42
S-(hydroxysulfenamide)glutathione	-27,90	1,51	0,00	5,47
stizolobinate	-28,64	3,07	0,00	5,49
5-S-cysteinyldopa	-40,47	8,19	0,07	5,50
3-dehydro scyllo-inosose	-29,40	0,49	0,02	5,54
7-[(3S)-(3-amino-3-carboxypropyl)-4-methyl]wyosine	-29,48	1,27	0,29	5,64
L-seryl-L-phenylalanine	-29,05	-1,13	0,01	5,64
L-glutamyl-L-glutamate	-28,62	2,85	0,00	5,64
5-(methylsulfanyl)-ribulose 1-phosphate	-28,58	1,22	0,00	5,67
dopamine 3-O-sulfate	-29,16	-1,47	0,01	5,68
2-amino-2-deoxy-D-gluconate	-30,13	1,29	0,07	5,69
serotonin O-sulfate	-29,27	1,37	0,03	5,71
2 3-diaminopropanoate	-30,11	1,79	0,13	5,73
(4-{4-[2-(gamma-L-glutamylamino)ethyl]phenoxymethyl}furan-2-yl)methanamine	-35,73	3,72	0,06	5,73
carboxynorspermidine	-34,51	3,04	0,16	5,79

D-ornithine	-29,57	1,61	0,07	5,80
glycerophosphoserine	-31,40	5,39	0,00	5,80
(3-hydroxy-2-oxindol-3-yl)acetyl-L-aspartate	-28,75	0,67	0,01	5,80
4-deoxy-beta-L-erythro-hex-4-enopyranuronosyl-(1 4)-D-N-sulfoglucosamine	-37,50	7,33	0,00	5,93
adenosine	-28,76	-0,10	0,10	5,94
[1-(2-amino-7-methyl-4-oxo-7 8-dihydro-3H-pteridin-6-yl)]ethyl-(4-aminophenyl)-1-deoxy-D-ribitol 5'-phosphate	-33,54	7,62	0,07	5,95
N-nitro-L-arginine	-29,62	1,78	0,00	5,97
5-carboxymethylaminomethyluridine	-27,62	2,03	0,20	6,01
glutathionylspermidine	-30,03	7,11	0,09	6,09
N6-(D-psicosyl)-L-lysine	-28,72	6,74	0,01	6,11
5 12-dihydroxanthommatin	-37,34	-1,25	0,00	6,23
adenosine 5'-phosphosulfate	-36,33	0,35	0,06	6,29
S-Inosyl-L-homocysteine	-29,73	1,77	0,14	6,30
3'-amino-3'-deoxyAMP	-32,37	-1,17	0,91	6,43
[5-(aminomethyl)furan-3-yl]methyl diphosphate	-39,26	9,22	0,00	6,55

5-taurinomethyluridine	-34,45	-2,41	0,00	6,65
nocardicin C	-36,37	2,06	0,00	6,71
(E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate	-31,50	1,94	0,02	6,82
L-saccharopine	-32,66	8,20	0,06	6,90
L L-homocystine	-29,02	1,79	0,08	7,02
2-methylbacteriohopanetetrol	-32,52	6,63	0,10	7,09
4-(beta-D-ribofuranosyl)hydroxybenzene 5'-phosphate	-37,56	1,96	0,00	7,09
L-2-amino-2-carboxyethane-sulfonamide	-28,93	-2,87	0,13	7,14
a 1-O-(alk-1-enyl)-sn-3-phosphoglycerol	-29,05	3,22	0,07	7,15
5'-O-[N-(L-aspartyl)sulfamoyl]adenosine	-33,72	3,12	0,00	7,17
D-erythronate	-28,63	1,91	0,00	7,20
trifluoroacetate ester glucuronide	-31,02	3,54	0,07	7,20
2-(cystein-S-yl)-2-(1H-indol-3-yl)acetonitrile	-27,42	6,78	0,00	7,23
aldehyde-D-iduronate	-28,40	1,46	0,00	7,28
5-iodo-dCTP	-40,24	-1,58	0,01	7,33

adenylylcoelenterazine disulfonate	-33,90	-2,67	0,00	7,41
2-carboxy-3-keto-D-arabinitol-1 5-bisphosphate	-28,91	-2,64	0,00	7,65
luteolin 7-O-[beta-D-glucosyluronate-(1 2)-beta-D-glucosiduronate]4'-O-beta-D-glucosiduronate	-38,76	9,56	0,12	7,74
2 5-diaminohexanoate	-30,98	1,85	0,07	7,75
demethyldehydrophos	-34,45	1,29	0,00	7,77
(2E 6E 10E)-12-hydroxy-3 7 11-trimethyldodeca-2 6 10-trien-1-yl phosphonatoxyphosphonate	-36,26	5,59	0,00	7,79
acetyl AMP	-27,58	10,23	0,00	7,99
mugineate	-29,18	5,19	0,00	8,15
scyllo-inosose	-28,50	0,98	0,03	8,19
5-beta-scymnol sulfate	-30,75	3,51	0,06	8,21
2-amino-3-phosphonopropanoate	-32,86	-3,09	0,02	8,33
monapterin	-31,27	3,27	0,17	8,36
4-(glutathion-S-yl)-fenclorim	-29,32	5,65	0,00	8,39
N-(5-phosphoribosyl)-anthranilate	-31,25	-2,29	0,00	8,51
8-oxo-dAMP	-35,56	1,11	0,16	8,90

glutamyl-beta-ketophosphonate-adenosine	-34,24	2,14	0,00	9,08
D-octopine	-32,88	6,77	0,00	9,38
(R)-N-formyl-beta-hydroxy-L-kynurenine	-30,57	-2,76	0,02	9,57
a 7 8-dihydro-8-oxoguanine in DNA	-37,49	6,32	0,00	9,59

^a Nombre de las moléculas según las bases de datos *Plant Metabolic Network* (<https://www.plantcyc.org/>) y *MetaCyc Metabolic Pathway Database* (<https://metacyc.org/>).

^b Parámetro del programa rDock (<http://rdock.sourceforge.net/>) que representa la puntuación de interacción proteína-ligando. Para la selección, se consideraron aquellos con un valor < -25.

^c Parámetro del programa rDock (<http://rdock.sourceforge.net/>) que representa la energía relativa de la conformación del ligando y el ajuste espacial a la conformación de la cavidad. Se consideraron aquellos con un valor < 10 para etapas posteriores.

^d Parámetro del programa rDock (<http://rdock.sourceforge.net/>) que representa las sanciones por restricción externa del espacio del metabolito ocupado en la cavidad. Sólo se consideraron aquellos con un valor próximo a cero.

^e Trabajo (en Kcal/mol) necesario para romper el enlace y alcanzar un estado *cuasi* ligado entre el ligando y el átomo de nitrógeno ND1 de H100 de FixK₂.

9.2. Abreviaturas y símbolos

aa	Aminoácido
AAA+	<i>ATPases Associated with diverse cellular Activities</i>
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ADN/DNA	Ácido desoxirribonucleico
ADNc/cDNA	ADN complementario
ADP	Adenosin difosfato
AEBSF	<i>4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride</i>
AMPc	AMP ciclico
AOA	Arqueas oxidantes de amonio
Ap	Ampicilina
APS	Persulfato amónico
ARN/RNA	Ácido ribonucleico
ASD	<i>Anti-sigma domain</i>
Asp	Aspártico
ATP	Adenosin trifosfato
b	Base nitrogenada
bp/pb	Par de bases
Biofenol	Fenol/cloroformo/alcohol isoamílico
Biot	Biotina
BOA	Bacterias oxidantes de amonio
BON	Bacterias oxidantes de nitrito
CBD	<i>Chitin Binding Domain</i>

Chx	Cicloheximida
Cm	Cloranfenicol
CRP	<i>Cyclic AMP receptor protein</i>
C-terminal	Carboxi terminal
Cu	Cobre
Cys	Cisteína
DEPC	Dietil policarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNRA	Reducción desasimilativa de nitrato/nitrito a amonio
DO/OD	Densidad óptica
Dpi	<i>Days post-inoculation</i>
DTT	Ditiotreitol
Duck	Desacoplamiento dinámico
E	Glutamato
ECF	<i>Extracytoplasmic function</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetra-acético
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift DNA assay</i>
FBN	Fijación biológica de nitrógeno
FC	<i>Fold change</i>
Fe	Hierro
Fe-S	Grupo hierro-azufre
FNR	<i>Fumarate-nitrate reductase regulator</i>
For	<i>Forward</i>

GAF	<i>cGMP-specific phosphodiesterases, adenylyl cyclases and FhlA</i>
GEIs	Gases de efecto invernadero
Gm	Gentamicina
GSH	Glutación
H ₂ Od	Agua desionizada
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
H-V-H/H-T-H	Hélice-Vuelta-Hélice
IMPACT	<i>Intein-Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag</i>
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
ITC	Calorimetría isotérmica de titulación
IVT	Transcripción <i>in vitro</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
Ka	Constante de asociación
Kd	Constante de disociación
KD	Constante de equilibrio
Km	Kanamicina
Lb	Leghemoglobina
N	<i>Nitrogen shoot content</i>
N-terminal	Amino terminal
NF	Factores Nod
Nap	Nitrato reductasa periplásmica
Nar	Nitrato reductasa de membrana

NCBI	<i>National center for biotechnology information</i>
NDW	<i>Nodule dry weight per plant</i>
NDW/NN	<i>Dry weight per nodule</i>
NEB	<i>New England Biolabs</i>
Nir/NiR	Nitrito reductasa
NN	<i>Nodule number per plant</i>
NnrR	<i>Nitrite/nitric oxide reductase regulator</i>
Nor	Óxido nítrico reductasa
cNor	tipo c
Nos	Óxido nitroso reductasa
nt	Nucleótido
N-terminal	Amino terminal
ONPG	Orto-nitrofenil- β -galactósido
pb/bp	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
r	Resistencia
Rev	Reverso
RNAP	ARN polimerasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RPS	Resonancia de plasmón de superficie
SA	Estreptavidina
SDS	Dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS
SDW	<i>Shoot dry weight</i>
SEC	<i>Size-exclusion chromatography</i>
Sm	Estreptomicina
Spc	Espectinomicina
Tc	Tetraciclina
TEMED	Tetra-metiletilendiamina
UFC	Unidades formadoras de colonia
UM/MU	Unidades Millers
UR/RU	Unidades de respuesta
UTP	Uridin trifosfato
UV	Ultravioleta
V	Volúmenes de columna
W_{qb}	Trabajo necesario para romper un cuasi-enlace
WT	<i>Wild type</i>
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósido
Δ	Delta, delección
σ	Factor sigma
χ^2	Chi cuadrado

Aminoácidos

A	Alanina
C	Cisteína
G	Glicina
H	Histidina

L	Leucina
M	Metionina
P	Prolina
R	Arginina
S	Serina
T	Treonina
V	Valina
W	Triptófano

Moléculas

$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$	Acetato de potasio
CO	Monóxido de carbono
CO_2	Dióxido de carbono
$\text{CO}_3 \text{Na}_2$	Carbonato sódico
CuSO_4	Sulfato cúprico
FeCl_3	Cloruro férrico
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
H_3BO_3	Ácido bórico
HCl	Ácido clorhídrico
HNO_3	Ácido nítrico
$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})]_6$	Ferricianuro potásico
KCl	Cloruro potásico
KH_2PO_4	Fosfato monopotásico
MgCl_2	Cloruro magnésico
MgSO_4	Sulfato magnésico

MnCl_2	Cloruro de manganeso
N_2	Nitrógeno molecular
N_2O	Óxido nitroso
Na_2HPO_4	Fosfato disódico
Na_2MoO_4	Molibdato de sodio
NaCl	Cloruro sódico
NaH_2PO_4	Fosfato monosódico
NaHCO_3	Bicarbonato sódico
NaOH	Hidróxido sódico
NH_2OH	Hidroxilamina
NH_3	Amoniac
NH_4^+	Amonio
$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	Persulfato amónico
NO	Óxido nítrico
NO_2^-	Nitrito
NO_3^-	Nitrato
O_2	Oxígeno molecular
O_3	Ozono
RbCl	Cloruro de rubidio
ZnSO_4	Sulfato de zinc

Prefijos

M	Mega
k	Kilo
m	Mili

μ	Micro
n	Nano
p	Pico

Unidades

Å	Ángstrom
°C	Grado centígrado
°K	Grado Kelvin
Da	Dalton
g	Gramo
g	Fuerza gravitatoria
h	Hora
l	Litro
M	Molar
mA	miliamperio
mAU	Unidades de absorbancia
min	Minuto
MPa	Megapascal
s	Segundo
UM	Unidades Miller
V	Voltio

9.3. Abreviaturas de especies

<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	<i>A. ferrooxidans</i>
<i>Aliivibrio fischeri</i>	<i>A. fischeri</i>
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>A. caulinodans</i>

<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	<i>B. diazoefficiens</i>
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>B. japonicum</i>
<i>Carboxydotherrnus hydrogenoformans</i>	<i>C. hydrogenoformans</i>
<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i>	<i>D. dehalogenans</i>
<i>Ensifer meliloti</i>	<i>E. meliloti</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i>
<i>Glycine max</i>	<i>G. max</i>
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	<i>L. ferrooxidans</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Ph. vulgaris</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<i>Rhizobium etli</i>	<i>R. etli</i>
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>R. leguminosarum</i>
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	<i>R. rubrum</i>
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	<i>S. meliloti</i>

9.4. Índice de figuras

Figura 2.1.1. Representación ilustrativa del ciclo biogeoquímico del nitrógeno.....	50
Figura 2.2.1. Representación gráfica de la producción de soja a nivel mundial.....	57
Figura 2.2.2. Representación esquemática del proceso de nodulación y formación de bacteroides	59
Figura 2.2.3. Estructura del complejo proteico Fe y MoFe de la nitrogenasa de <i>Azotobacter vinelandii</i>	63

Figura 2.2.4. Representación esquemática de los mecanismos involucrados en la protección de la nitrogenasa contra el O ₂ en nódulos de raíces de leguminosas	64
Figura 2.3.1. Redes de regulación en respuesta a microoxia que controlan genes esenciales para la fijación de N ₂ y la respiración del bacteroide en <i>B. diazoefficiens</i> (A) y <i>S. meliloti</i> (B) (adaptado de Rutten y Poole, 2019).....	70
Figura 2.3.2. Componentes de las proteínas reguladoras implicadas en la respuesta a microoxia de rizobios	71
Figura 2.3.3. Red de regulación en respuesta a microoxia que controla genes implicados en la fijación de N ₂ en <i>R. leguminosarum</i> (A) y <i>R. etli</i> (B) (adaptado de Rutten y Poole, 2019)	76
Figura 2.3.4. Interacción de la holoenzima de la ARN polimerasa bacteriana con la región promotora de ADN.....	82
Figura 2.3.5. Diferentes clases de proteínas pertenecientes a la familia σ^{70}	83
Figura 2.4.1. Dominios estructurales de las proteínas CRP/FNR.....	86
Figura 2.4.2. Distribución filogenética de las proteínas de la familia CRP/FNR (adaptado de Körner et al., 2003)	87
Figura 2.4.3. Cofactores de la familia CRP/FNR	88
Figura 2.4.4. Mecanismo del control alostérico de CRP	92
Figura 2.4.5. Estructura de CRP-AMPC en complejo con ADN ...	93
Figura 2.4.6. Estructura cristalina de la holoenzima FNR de <i>Aliivibrio fischeri</i>	95
Figura 2.4.7. Estructura de CoxA sin efector de <i>R. rubrum</i>	97
Figura 2.5.1. Árbol filogenético de las 16 proteínas tipo CRP/FNR de <i>B. diazoefficiens</i>	102
Figura 2.5.2. Red de regulación que responde a microoxia en <i>B. diazoefficiens</i>	104

Figura 2.5.3. Dominios estructurales de FixK ₂	108
Figura 2.5.4. Visualización de la carga eléctrica de superficie de la proteína FixK ₂	110
Figura 2.5.5. Vistas superior y lateral de ClpAP de <i>E. coli</i>	113
Figura 2.5.6. Representación en superficie complejo C183S FixK ₂ -His ₆ con ADN.....	114
Figura 4.5.1. Sistema IMPACT	205
Figura 4.6.1. Esquema gráfico de la configuración de un biosensor SPR	215
Figura 4.7.1. Selección de dominios de interés de la proteína FixK ₂ para el estudio de sus interacciones moleculares	220
Figura 4.3.1. Estructura secundaria de FixK ₂	222
Figura 4.3.2. Solventes utilizados para la obtención de puntos farmacofóricos	223
Figure 5.1.1. IVT activation from the <i>fixNOQP</i> promoter mediated by different FixK ₂ protein derivatives	244
Figure 5.1.2. Comparative SEC of native FixK ₂ and C183S, and C183D FixK ₂ variants at different protein concentrations.....	246
Figure 5.1.3. <i>In vitro</i> interaction of C183S and C183D FixK ₂ derivatives with the <i>fixNOQP</i> promoter tested by EMSA (A) and surface plasmon resonance (SPR) (B) approaches.....	248
Figure 5.1.4. Expression data for a chromosomally integrated <i>fixNOQP'</i> - <i>lacZ</i> fusion in different <i>B. diazoefficiens</i> backgrounds	250
Figure 5.1.5. Denitrifying growth of the <i>B. diazoefficiens</i> C183D- <i>fixK₂</i> strain (triangles)	251
Figure 5.1.6. Expression of <i>fixK₂</i> at protein (A and B) and transcriptional (C) levels	253

Figure 5.1.7. Workflow of microarray data analyses of the C183D- <i>fixK</i> ₂ strain	255
Figura 5.2.1. Comparación de las proteínas CoxA, CRP, FNR y FixK ₂	267
Figura 5.2.2. Representación tridimensional de las interacciones intermoleculares existentes entre los monómeros de FixK ₂	268
Figura 5.2.3. Mutaciones en el dominio de dimerización de FixK ₂	270
Figura 5.2.4. Esquema de la construcción de los plásmidos pMB1265, pMB1266, pMB1272, pMB1271, pMB1270 y pMB1268.....	272
Figura 5.2.5. Estrategia de construcción de plásmidos de expresión de derivados FixK ₂ -Mxe-Inteína-CBD.....	273
Figura 5.2.6. Estrategia de construcción plásmidos para complementación <i>in trans</i> de una cepa Δ <i>fixK</i> ₂ con la fusión <i>fixP</i> '-' <i>lacZ</i> . 276	276
Figura 5.2.7. Esquema de la estrategia de construcción de los plásmidos pMB1295, pMB1298, pMB1296, pMB1299 y pMB1297..	278
Figura 5.2.8. Representación esquemática de la construcción de las cepas 1295, 1296, 1297 y 1298 de <i>B. diazoefficiens</i>	280
Figura 5.2.9. Sobre-expresión de derivados de la proteína FixK ₂ -Mxe-Inteína-CBD.....	281
Figura 5.2.10. Análisis en PAGE-SDS de distintas etapas de la purificación de los derivados de proteína FixK ₂ con el sistema IMPACT.....	282
Figura 5.2.11. Análisis del estado oligomérico de diferentes derivados de FixK ₂ por cromatografía de exclusión molecular.....	285
Figura 5.2.12. Interacción de los derivados de FixK ₂ con mutaciones en la hélice de dimerización con la caja FixK ₂ presente en el promotor de los genes <i>fixNOQP</i>	287

Figura 5.2.13. Transcripción del promotor <i>fixNOQP</i> mediado por diferentes derivados de FixK ₂	290
Figura 5.2.14. Actividad β-galactosidasa de la fusión <i>fixNOQP</i> '- <i>lacZ</i> en la cepa Δ <i>fixK</i> ₂ de <i>B. diazoefficiens</i> complementada con diferentes versiones de la proteína FixK ₂	292
Figura 5.2.15. Curva de crecimiento en condiciones desnitrificantes de células de la cepa Δ <i>fixK</i> ₂ de <i>B. diazoefficiens</i> complementada con una batería de plásmidos.....	294
Figura 5.2.16. Actividad β-galactosidasa de la fusión <i>fixNOQP</i> '- <i>lacZ</i> en cepas de <i>B. diazoefficiens</i> parental y mutantes en <i>fixK</i> ₂	295
Figura 5.2.17. Crecimiento en condiciones desnitrificantes de las cepas <i>B. diazoefficiens</i> parental y mutantes en <i>fixK</i> ₂	297
Figura 5.2.18. Niveles de derivados de FixK ₂ en células de <i>B. diazoefficiens</i> cultivadas en condiciones de microoxia	299
Figura 5.3.1. Visualización de la superficie eléctrica de la proteína FixK ₂	304
Figura 5.3.2. Imagen de la estructura de la proteína FixK ₂ en complejo con ADN.....	305
Figura 5.3.3 Control de solvatación y marcaje de zonas apolares, polares, aniónicas y catiónicas	306
Figura 5.3.4. Puntos farmacofóricos en superficie de FixK ₂	308
Figura 5.3.5 Puntos farmacofóricos de la cavidad de los monómeros A y B de FixK ₂	309
Figura 5.3.6. Estudio comparativo de la superficie electroestática de FixK ₂	310
Figura 5.3.7. Alineamiento de las estructuras cristalinas de FixK ₂ y CRP en complejo con ADN.....	311
Figura 5.3.8. Superposición de las cavidades de FixK ₂ y CRP..	312

Figura 5.3.9. Comparativa de las áreas sensoras CRP y FixK ₂	313
Figura 5.3.10. Mapeo tridimensional de la cavidad de FixK ₂	314
Figura 5.3.11. Acoplamiento cAMP-FixK ₂	314
Figura 5.3.12. Acoplamiento dinámico (<i>docking</i>) de FixK ₂ con diferentes metabolitos	317
Figura 5.3.13. Desacoplamiento dinámico con FixK ₂	318
Figura 5.3.14. Imagen del fragmento alrededor del enlace de hidrógeno de ND1	319
Figura 5.3.15. Ruptura de la interacción proteína-ligando.....	320
Figura 5.3.16. Esquema de la construcción del plásmido pMB1293	324
Figura 5.3.17. Crecimiento en condiciones desnitrificantes de diferentes cepas de <i>B. diazoefficiens</i>	325
Figura 6.1. Modelización de diferentes variantes de la proteína FixK ₂ con la caja FixK ₂ presente en el promotor de los genes <i>fixNOQP</i>	333
Figura 6.2. Representación gráfica de la hélice de dimerización de FixK ₂	338
Figura 6.3. Representación gráfica del estudio <i>in silico</i> de las interacciones intermoleculares en la hélice de dimerización de distintos derivados de FixK ₂	341
Figura 6.4. Representación esquemática de las interacciones intermoleculares de la hélice de dimerización de FixK ₂ en la proteína parental.....	343
Figura 6.5. Estructura de CRP en complejo con AMPc	348
Figura 6.6. Acoplamiento <i>in silico</i> de la molécula de AMPc en la cavidad cargada negativamente de FixK ₂	349
Figura 6.7. Visualización tridimensional de los dominios de dimerización y de interacción de ADN de FixK ₂	253

Figura 9.1.1. SDS-PAGE analysis of FixK₂, C183S FixK₂, and C183D FixK₂ recombinant purified proteins 398

Figura 9.1.2. Calibration curve for SEC 399

9.5. Índice de tablas

Tabla 4.1. Cepas bacterianas 125

Tabla 4.2. Plásmidos 128

Tabla 4.3. Oligonucleótidos 133

Tabla 4.4. Composición y referencia de los medios de cultivos empleados en este trabajo..... 142

Tabla 4.5. Antibióticos..... 143

Tabla 4.6. Composición y uso de las soluciones usadas en este trabajo..... 144

Tabla 4.7. Endonucleasas de restricción 180

Tabla 4.8. Reactivos de PCR para ADN polimerasas Phusion y Dream Taq..... 182

Tabla 4.9. Programas de PCR adecuados para ADN polimerasas Phusion y Dream Taq 183

Table 5.1.1. Symbiotic phenotype of different *B. diazoefficiens* strains on soybean plants 252

Table 5.1.2. List of the 37 genes belonging to 26 putative FixK₂ box-associated transcription units whose expression is downregulated in both the C183D-*fixK*₂ and Δ *fixK*₂ strains in comparison to the wild type (WT), both cultured microoxically (0.5% O₂) 257

Tabla 5.3.1. Listado de 27 metabolitos seleccionados para ensayos de interacción FixK₂-ligando *in vitro*..... 321

Tabla 6.2.1. Interacciones intermoleculares entre residuos de la hélice de dimerización de la proteína FixK₂..... 339

Tabla 6.2.2. Compilación de las propiedades de derivados de FixK ₂ con mutaciones en la hélice de dimerización	345
Tabla 9.1.1. Comparative transcriptomic profile in the C183D- <i>fixK</i> ₂ strain.....	401
Tabla 9.2.1. Interacciones Intra-intermoleculares en la proteína FixK ₂ en complejo con ADN	414
Tabla 9.3.1. Conjunto de 418 metabolitos seleccionados en el proceso de acoplamiento dinámico	415
Tabla 9.3.2. Conjunto de 147 metabolitos seleccionados en el proceso de desacoplamiento dinámico.	445

